



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Caracterización del mecanismo de tráfico interno retrogrado del
virus del Zika”**

Tesis que presenta

M. en C. Dan Israel Zavala Vargas

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

BIOQUÍMICA

Director de la Tesis: Dr. Edgar Morales Ríos

Ciudad de México

Abril, 2023

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el estímulo otorgado durante el desarrollo de esta tesis realizada en laboratorio No. 2 del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto de Bebidas para el Bienestar y la Salud A. C. por promover y contribuir al desarrollo de la ciencia básica.

Agradezco la ayuda y disposición del personal del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE).

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Doctor Edgar Morales Ríos por la paciencia, comprensión y apoyo que ha demostrado durante mi estancia en el doctorado.

A mi comité de asesores, el Doctor Jaime Ortega López, Doctor Guillermo Ávila Flores, Doctor Jesús Alberto Olivares Reyes, Doctor Ricardo Mondragón Flores, y el Doctor Ismael Bustos Jaimes, porque su apoyo y experiencia fue fundamental para realizar esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio por todos los buenos momentos compartidos y el gran apoyo que día con día me brindaron; Jessica, Nicole, Sergio, etc.

A mi familia por su apoyo y ayuda en las diferentes formas en las que me lo brindaron.

DEDICATORIAS:

A mi esposa Rebeca y mi hijo Ian por su apoyo incondicional.

A mi mamá y papá por su paciencia y fortaleza.

ÍNDICE

1.0 RESUMEN	11
1.0 ABSTRACT	12
2.0 INTRODUCCIÓN	13
2.1 Epidemiología del ZIKV	13
2.2 Virología, estructura y maduración	14
2.3 El flavivirus y su interacción con el citoesqueleto	18
2.4 Microtúbulos	22
2.5 Proteínas motoras	26
2.6 Cinesinas	27
2.7 Dineína	30
2.8 Estructura	31
2.9 Clasificación de las dineínas	33
2.10 Ciclo mecano químico	34
2.10 Dineína y adaptadores de carga	36
2.11 Dineína y la replicación viral	38
2.12 Interacciones de la dineína	39
2.13 Virus transportados por motores moleculares	41
3.0 Antecedentes directos	44
3.1 ZIKV y su interacción con el citoesqueleto	44
3.2 Algunas similitudes entre el ZIKV y DENV	46
3.3 Tráfico del retrogrado del DENV-2	48
4.0 JUSTIFICACIÓN	49
5.0 HIPOTÉISIS	49
6.0 OBJETIVOS	49
6.1 Objetivo general	49
6.2 Objetivos específicos	49
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS	50
7.1 Ensamble in vivo	50
7.2 Estructura del plásmido de la proteína pE 409	51
7.3 Secuencias y oligonucleótidos	52
7.4 Reacción de PCR	53
7.5 Digestión con DPN1	54
7.6 Transformación	54
7.7 Macro cultivos	55
7.8 Purificación de la proteína del envoltorio	55
7.9 Purificación de la NTDyn y NDD	56
7.10 Interacción NTDyn-ZIKV en columna IMAC	56
7.11 Ensayos de retardamiento	57
7.12 Far western blot NTDyn-E proteína recombinante	57
7.13 Colocalización de la dineína y la proteína del envoltorio	58

<u>7.14 Cinética de expresión de proteínas de envoltura y dineína</u>	<u>58</u>
<u>7.15 Ensayo de proximidad de ligandos</u>	<u>59</u>
<u>7.16 Inmunoprecipitación E-Dineína</u>	<u>60</u>
<u>7.17 Producción de pAbs anti-NTDyn y anti-NDD</u>	<u>60</u>
<u>7.18 Interacción ZIKV-NTDyn por resonancia superficial de plasmones en un equipo Biacore T200</u>	<u>61</u>
<u>8.0 RESULTADOS</u>	<u>62</u>
<u>La Dineína y la proteína E del ZIKV interacción de forma natural</u>	<u>62</u>
<u>8.1 Ensayo de colocalización de Envoltorio-dineína</u>	<u>63</u>
<u>8.2 Cinética de la expresión de la pE y dineína en células Vero-infectadas con ZIKV</u>	<u>64</u>
<u>8.3 Ensayo de proximidad de ligando pE-dineína</u>	<u>65</u>
<u>8.4 Inmunoprecipitación del complejo de envoltorio-dineína</u>	<u>67</u>
<u>8.5 Purificación de las proteínas recombinante NTDyn y NDD</u>	<u>68</u>
<u>8.6 Los viriones de Zika interactúan con NTDyn</u>	<u>61</u>
<u>8.7 Perfiles cromatográficos de filtración en gel complejos de NTDyn-anticuerpos</u>	<u>71</u>
<u>8.8 Ensayo de retardamiento NTDyn-pE</u>	<u>72</u>
<u>8.8 Sobreexpresión, replegamiento y purificación de la pE</u>	<u>73</u>
<u>8.8.1 Perfiles de expresión de la pE</u>	<u>73</u>
<u>8.8.3 Perfiles de expresión de la proteína pE-409</u>	<u>75</u>
<u>8.8.4 Macro cultivo de la pE-409</u>	<u>76</u>
<u>8.9 Far western blot de las recombinantes NTDyn- proteína E</u>	<u>80</u>
<u>9.0 Discusión</u>	<u>81</u>
<u>10.0 CONCLUSIONES</u>	<u>85</u>
<u>11.0 PERSPECTIVAS</u>	<u>86</u>
<u>12.0 BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>87</u>

ABREVIATURAS

aa, Aminoácido

ATP, Trifosfato de adenina

BICD2, Proteína homóloga 2 bicaudal

CHIKV, Virus del Chikungunya

DBICDR1, Proteína homóloga relacionada BICD

DENV, Dengue virus

β M, β -mercaptoetanol

bp, Pares de bases

BSA, Albúmina sérica bovina

CCMB80, Amortiguador 80 del Centro de Biología celular y molecular

Dineína, Dineína citoplásmica humana 1

Dineína phi, Forma autoinhibida

DO600, Densidad óptica a 600 nm.

DTT, Ditioneitol

EBI, European Bioinformatics Institute

EC, Comisión de enzimas

FPLC, Cromatografía líquida directa de proteínas

GDP, Difosfato de guanina

GTP, Trifosfato de guanina

HC, Cadena Pesada

HCl, Ácido clorhídrico

Hook3, Proteína 3 de anclaje a microtúbulos

HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución

IC, Cadena intermedia

IDA, Brazo interno de la dineína axonemal

IF, Filamentos intermedios

IMAC, Columna de afinidad a iones metálicos

JEV, Virus de encefalitis japonesa

Kb, Kilobases
LC, Cadena ligera
Lc8, Cadena ligera de 8 kDa
LIC, Cadena intermedia ligera
MAP, Proteínas asociadas a microtúbulos
MgCl₂, Cloruro de Magnesio
MgSO₄, Sulfato de Magnesio
Min, Minutos
MT, Microtúbulo
MTOC, Centro organizador de los microtúbulos
MW, peso molecular
NaCl, Cloruro de Sodio
NDD, Dominio de dimerización de la dineína
Nm, Nanómetro
NS, Proteína no estructural
NTD_{yn}, Fragmento amino terminal de la dineína
NWV, Virus del este del nilo
OV, Toda la noche
PAGE, Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR, Reacción en cadena de la polimerasa
PDB, Protein Data Bank
pE, Proteína del envoltorio
PEG, polietilenglicol
PLA, Ensayo de proximidad de ligandos
PMSF, Fluoruro de benzilsulfonilo
PN, Región perinuclear
prM, Proteína de membrana
PSA, Persulfato de amonio
PVDF, Fluoruro de polivinilideno

Rab, Proteína relacionada a RAS
Rfc, Fuerza centrífuga relativa
RNA, Ácido ribonucleico
Robl, Roadblock
rpm, Revoluciones por minuto
SDS, Dodecilsulfato de sodio
s, Segundos
SLEV, Virus de la encefalitis de San Luis
Supl, Suplementario(a)
TA, Temperatura ambiente
TBE, Tris-borato-EDTA
TBEV, Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TcTex, Proteína homóloga 1 a complejo testicular humano T
TEMED, N, N, N, N-Tetrametiletilendiamina
TES, Ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico
TEV, Virus del mosaico del tabaco
TGN, Red trans-Golgi
Tris-base, 2-amino-2-(hidroximetil)-1-3-propanediol
UV, Ultravioleta
VHS, Virus del herpes simple
VNO, Virus del Nilo occidental
YFV, Virus de la fiebre amarilla
ZIKV, Virus del Zika

RESUMEN

La infección ocasionada por el virus del Zika (ZIKV) se caracteriza por generar síntomas similares en algunos de los presentes en pacientes con gripe subclínica. Sin embargo, se han descrito manifestaciones graves, como el síndrome de Guillain-Barre en adultos y la microcefalia en bebés nacidos de madres infectadas. Se ha observado que los flavivirus ocasionan un rearrreglo profundo en el citoesqueleto de las células infectadas. Específicamente, se ha descrito la interacción de la proteína de la envoltura (pE) del virus del Dengue (DENV), un flavivirus muy cercano filogenéticamente al ZIKV, con la dineína citoplásmica humana (Dyn). La Dyn es un motor molecular asociado a microtúbulos, encargado del transporte intracelular retrogrado de diferentes cargamentos, tanto fisiológicos como virales. Los virus necesitan de motores moleculares para transportarse, una vez que el ZIKV ingresa a la célula hospedera y comienza a sintetizar sus proteínas que necesitan ser transportadas hacia vesículas compuestas de membranas del retículo endoplásmico. Ahí se ensamblan y pasan al aparato de Golgi donde madurarán y saldrán a infectar a nuevas células. En este proyecto encontramos que el ZIKV interactúa con la Dyn. Para estudiar la interacción del virus con el motor molecular dentro de las células, se analizó colocalización por inmunofluorescencia, además de ensayos de proximidad de ligandos (PLA), donde pudimos obtener una cinética de interacción entre el ZIKV y la Dyn en células infectadas, observando que interacción se presenta en un punto muy específico en el ciclo de replicación viral. En este sentido, la inmunoprecipitación pE- Dyn nos confirmó que la interacción se daba *in vivo*. Además, observamos una sobreexpresión de la Dyn en células infectadas con el virus en un espacio temporal específico. En una segunda etapa de la investigación determinamos que el fragmento amino terminal de la cadena pesada de la Dyn (NTDyn) interactúa con viriones del ZIKV. Finalmente, delimitamos la zona de interacción, localizándola en el dominio de dimerización de la Dyn (NDD) (residuos 1-201). Al analizar las estructuras ya reportadas, observamos que este dominio se encuentra libre para la interacción durante el tráfico celular retrógrado. En conjunto, nuestros datos sugieren un nuevo paso en el ciclo de replicación del ZIKV descrito anteriormente, introduciendo una proteína como blanco molecular adecuado para el tratamiento de la infección por ZIKV.

ABSTRACT

The infection caused by the Zika virus (ZIKV) is generally characterized by generating similar symptoms of those present in patients with subclinical influenza. However, serious manifestations have been described, such as Guillain-Barre syndrome in adults and microcephaly in babies born from infected mothers. Flaviviruses cause profound rearrangement in the cytoskeleton of infected cells. Also, it has been described an interaction of the envelope protein (pE) from Dengue virus (DENV), a flavivirus very close phylogenetically related to ZIKV, with the human cytoplasmic dynein (Dyn). Dyn is a molecular motor associated with microtubules, it is responsible for the retrograde intracellular transport of different cargoes, both physiological, and viral. Viruses need molecular motors to transport themselves, once ZIKV enters to the host cell and begins to synthesize its proteins, it need to be transported to vesicles made up of endoplasmic reticulum membranes where the viral proteins are assembled and passed to the Golgi apparatus, where they will mature and go out to infect new cells. In this project we found that ZIKV interacts with Dyn. To study the interaction of the virus with the molecular motor inside the cells, we analyzed Vero-infected cells by colocalization with immunofluorescence, in addition to proximity ligand assays (PLA), where we were able to analyze the kinetics of the interaction between ZIKV and Dyn, observing that the interaction occurs at a specific time in the viral replication cycle. Also, we performed pE-Dyn immunoprecipitation, which confirmed that the interaction occurred *in vivo*. In addition, we observed an over-expression of Dyn in cells infected with the virus in the same specific temporal space. In a second stage of the investigation, we determined that the amino terminal fragment of Dyn heavy chain (NTDyn) interacts with ZIKV virions. Finally, we delimit the interaction zone, locating it in the Dyn dimerization domain (NDD) (residues 1-201). When analyzing the structures already reported, we observed that this domain is free for the interaction during retrograde cell traffic. Taken together, our data suggest a new step in the previously described ZIKV replication cycle, introducing a suitable molecular target for treatment of ZIKV infection.

INTRODUCCIÓN

En el año 1947 fue aislado por primera vez el virus del Zika (ZIKV), de un mono Rhesus (*Macaca mulatta*) capturado en el bosque de Zika, una región al sur de Uganda, de donde este patógeno toma su nombre (Dick et al., 1952). Hasta hace unos años, el ZIKV había pasado desapercibido confinado a un estrecho cinturón ecuatorial que se extendía por África y Asia. Este virus circuló principalmente en primates silvestres y mosquitos arbóreos como *Aedes africanus* y rara vez causó infecciones en seres humanos, incluso en áreas con alto índice de zoonosis. Debido a esto, un brote repentino en centro y Sudamérica llamó la atención, y lo colocó como un evento notable. Al mismo tiempo, algunos investigadores notaron que las epizootias del ZIKV transmitidas por mosquitos del género *Aedes*, inexplicablemente tendieron a seguir epizootias y epidemias de Chikungunya transmitidas por mosquitos de este mismo género. Un patrón análogo comenzó en 2013, cuando el virus del Chikungunya se extendió de forma pandémica de oeste a este, y posteriormente fue seguido por el ZIKV. Es de vital importancia señalar que el ZIKV ha alcanzado tal capacidad de dispersión a nivel global, llegando no sólo a América sino también, en septiembre del 2017, al país de Cabo Verde en África Occidental, la que es considerada como su presunta cuna (Petersen et al., 2016).

2.1 Epidemiología del ZIKV

En el año de 1954, en el pueblo de Afikpo, al este de Nigeria, durante una investigación de un brote de ictericia que se sospechaba era fiebre amarilla, se aisló el ZIKV de tres pacientes que mostraron un aumento de títulos de anticuerpos séricos contra este virus (MacNamara, 1954). Hasta el 2007 no se habían reportado brotes del ZIKV y durante este año solo se diagnosticaron catorce casos de pacientes infectados por este virus. Médicos en la isla de Yap en Micronesia, informaron de un brote de enfermedad caracterizada por erupción cutánea, conjuntivitis y artralgia. Aunque el suero de algunos pacientes tenía anticuerpos IgM contra el virus del Dengue (DENV), la enfermedad parecía clínicamente distinta del DENV detectado previamente. Pruebas posteriores con el uso de cebadores consenso detectarían ARN del ZIKV en el suero de los pacientes sin lograr confirmar

ARN del DENV u otro ARN arboviral (Duffy et al., 2009). En octubre de 2013, se produjo otro gran brote con 10,000 casos registrados en la Polinesia Francesa. También se informó de un aumento en la incidencia de complicaciones neurológicas que incluyen síndrome de *Guillain-Barré*, meningoencefalitis y complicaciones autoinmunes como la púrpura trombocitopénica al mismo tiempo que el brote de Zika. Este brote se extendió rápidamente a otras islas del Pacífico, incluidas Nueva Caledonia, Islas Cook, Isla de Pascua, Vanuatu y las Islas Salomón en 2014 (Mo et al., 2016). En el año 2015, el ZIKV se había extendido a los estados del noreste de Brasil. En Bahía, un estado brasileño, se aisló por primera vez el ZIKV en mayo de 2015, aunque el análisis genético sugiere que el virus puede haber aparecido en Sudamérica en 2013, para diciembre de 2015 el ZIKV se había extendido a otros 18 estados brasileños. De octubre a diciembre de 2015, la Organización Panamericana de la Salud publicó alertas que informaban la presencia del ZIKV en varios países de América Latina: Colombia, Surinam, Guatemala, El Salvador, México, Paraguay, Venezuela y Panamá. Fuera de América, en octubre de este mismo año Cabo Verde África anunció su primera epidemia de ZIKV. Los estudios genómicos mostraron que la cepa brasileña es más cercana a los virus de la Polinesia Francesa y las Islas del Pacífico, por lo que pertenecen al linaje asiático (Mo et al., 2016). La hipótesis más fuerte de la introducción del virus Zika en Brasil es la ocasionada por viajeros africanos durante la Copa Mundial de 2014, ya que el ZIKV tiene transmisión por pacientes asintomáticos. Además, se produjo un aumento significativo del 132 % en el flujo de turistas internacionales a Brasil en junio del 2014 comparado con junio del 2013 (Salvador & Fujita, 2016).

2.2 Virología, estructura y maduración

El ZIKV es un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) clasificado en el género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Los flavivirus son virus de ARN positivo monocatenario con envoltura pequeña; en este grupo están incluidos patógenos de humanos y animales como el virus de la fiebre amarilla (YFV), DENV, virus del Nilo occidental (VNO), virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Sirohi et al., 2016).

En 2016 se obtuvo la estructura del ZIKV con una resolución de 3.8 Å por medio de Crio Microscopía Electrónica (Cryo-EM) (Figura 1). En comparación con el DENV, se encontró que, en el ZIKV, el tamaño del virion y los ectodominios de la envoltura eran similares. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias básicas, como la densidad de las protuberancias que sobresalen en la superficie del virus (rojo en la Figura 1B), estas están formadas por peptidoglicanos de la proteína de la envoltura (pE) que exhibe una forma característica de "espina" en el virión. Otra diferencia entre las estructuras de los dos virus en relación con la pE, es que únicamente en DENV ésta presenta una glicosilación en la Asn67. Este es un sitio de unión para varios tipos de células que se ha demostrado son objetivos de infección *in vivo* (Sirohi et al., 2016).

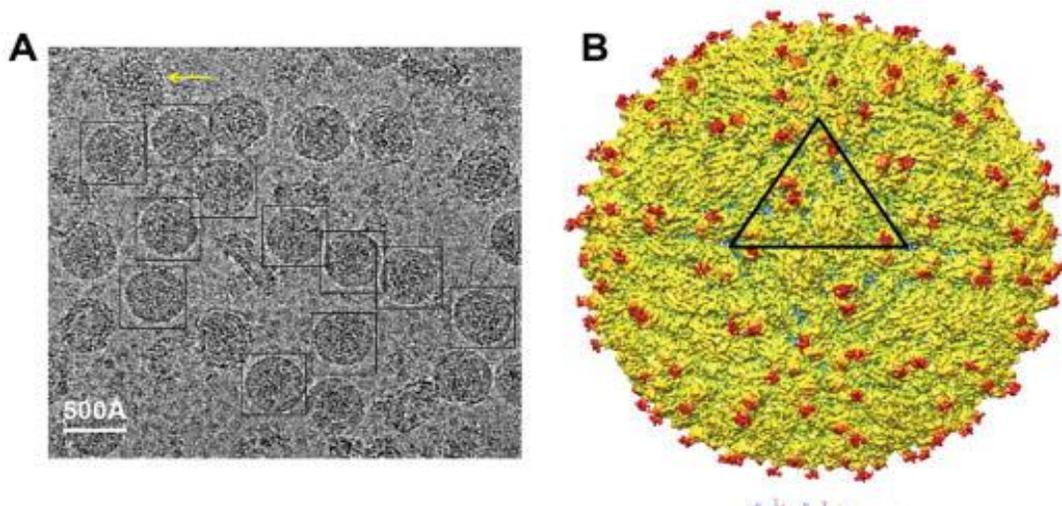


Figura 1. Estructura molecular del ZIKV. A) Se muestra una imagen del cryo-EM en donde se puede ver la distribución de diferentes fenotipos de viriones, las partículas virales maduras se encuentran marcadas por un cuadro negro, se puede observar una partícula parcialmente madura marcada con una flecha amarilla. B) Se observa una representación de ZIKV en donde se puede apreciar su profundidad debido al sombreado de la superficie que se ve en el eje bidimensional icosaédrico. La unidad asimétrica se identifica por el triángulo negro (Sirohi et al., 2016).

El ZIKV, con su genoma de una sola cadena positiva de RNA, es traducido a una sola poliproteína de 3423 aminoácidos de longitud, en la que se encuentran tres proteínas codificantes: cápside "C", membrana "M" y la proteína envoltorio "E". A su vez, la proteína M se genera por la escisión de una proteína precursora de membrana "prM". La poliproteína del ZIKV también contiene otras siete proteínas

no estructurales que son; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Figura 2). Las proteínas no estructurales asisten en la replicación y empaquetado del genoma, así como en las alteraciones de las vías del hospedero a favor del virus. La generación de las 10 proteínas individuales de la poliproteína está regulada por proteasas virales y del hospedero, la eficacia de la furina (proteasa del hospedero) en la escisión de los objetivos virales (prM) es variable y puede desempeñar un papel en la patogénesis (Sirohi et al., 2016).

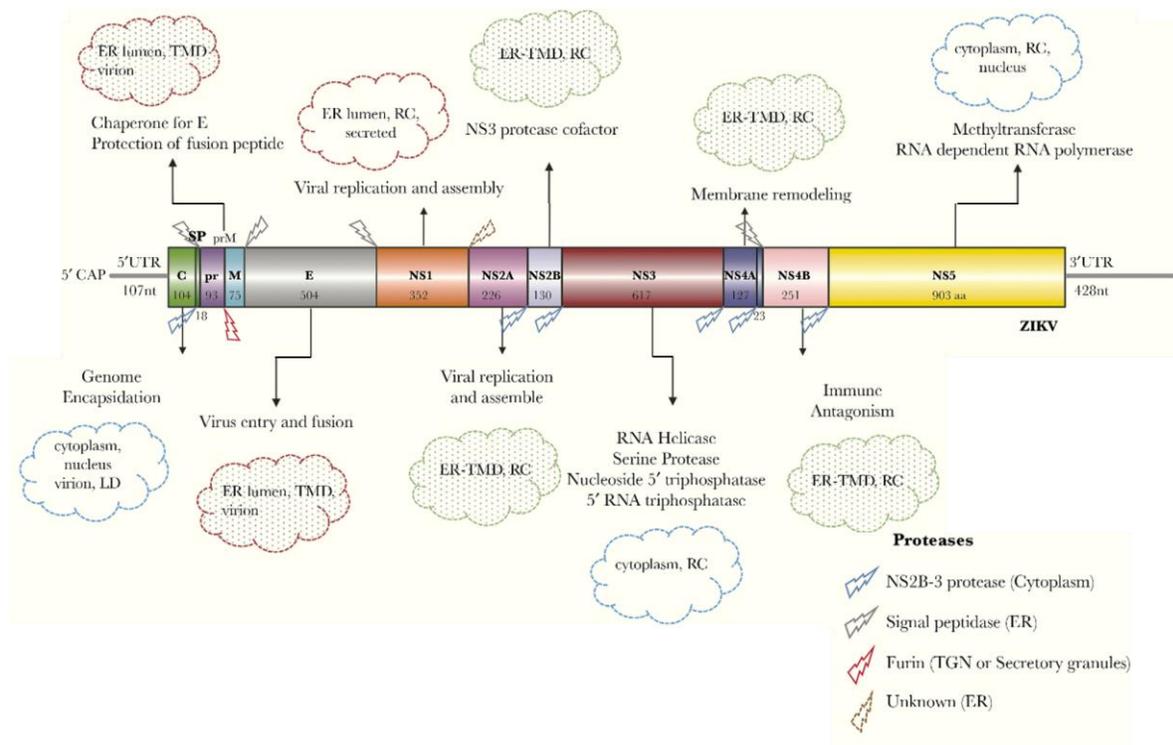


Figura 2. Arquitectura del genoma del ZIKV. Se muestra el RNA genómico traducido en una poliproteína, en esta imagen se puede observar la función, escisión y localización de las proteínas que conforman este virus, su genoma también cuenta con un CAP, pero carece de un segmento de Poli A, las líneas grises representan regiones no traducidas 5' y 3' (UTR), además se observa el perfil de segmentación de la poliproteína, las proteasas implicadas en este, así como el papel y la ubicación subcelular de las proteínas individuales. Abreviaturas: ER, retículo endoplásmico; LD, gota de lípido; nt, nucleótido; RC, complejo de replicación; SP, péptido señal; TGN, Trans-Golgi Network; TMD, dominio transmembranal. **Nota; La información mostrada en esta figura es veraz para diferentes flavivirus, pero tiene que comprobarse experimentalmente para ZIKV** (Sirohi & Kuhn, 2017).

La partícula viral mide aproximadamente 50 nm, en esta se encuentran 180 copias de la pE y M asociadas en la superficie del virus, ancladas en la bicapa lipídica a través de sus regiones transmembranales. La pE es la principal proteína implicada en la unión al receptor celular, por otro lado, la proteína M es pequeña y está oculta debajo de la pE. Este par de proteínas están organizadas en una simetría icosaédrica que consta de 60 unidades repetitivas, cada unidad asimétrica contiene tres proteínas E individuales. Las proteínas E están dispuestas como dímeros, con tres dímeros que se encuentran paralelos entre sí formando una balsa; hay 30 de esas balsas que cubren la superficie viral. El ectodominio E contiene tres dominios: DI, DII y DIII.

Los detalles del ensamblaje de las partículas y la gemación en la luz del RE no se conocen bien para ningún flavivirus, pero se cree que al igual que otros flavivirus, la proteína C se asocia con el ARN genómico de polaridad positiva recién sintetizada. Posteriormente estos se fusionan con la cara citoplásmica de la membrana del RE que contiene los heterodímeros prM-E, estas interacciones entre moléculas que conforman el virus, conducen a la formación de partículas virales inmaduras en la luz del RE, dichas partículas son no infecciosas y de aproximadamente 60 nm. El ZIKV inmaduro tiene 3 heterodímeros prM-E que se unen y se proyectan hacia afuera desde la membrana con el asa de fusión distal de la pE en su ápice (Figura 3, panel izquierdo). El dominio pr de la glicoproteína prM se coloca en la parte superior de este pico y cubre el circuito de fusión, lo que evita la fusión prematura de pE mediada por pH bajo alrededor de 6.7. Esta partícula puntual del virus inmaduro se glicosila en el RE para posteriormente transportarse a la red Golgi y Trans-Golgi (TGN), donde estas glicosilaciones se cortan y el medio se vuelve aún más ácido, con un pH alrededor de 5.5. Este pH del TGN inicia una reorganización del trímero prM-E de forma que los homodímeros de la pE se colocan paralelos a la membrana (Figura 3, panel central). Esta reorganización expone el sitio de corte para que la furina del hospedero actúe en la unión pr-M, y pueda darse la escisión que madurará al virus. Una vez escindido, el dominio pr permanece unido al extremo distal de la pE hasta que la partícula se libera en el entorno de pH neutro aproximado al 7.0 en el medio extracelular (Figura 3, panel derecho) (Sirohi & Kuhn, 2017).

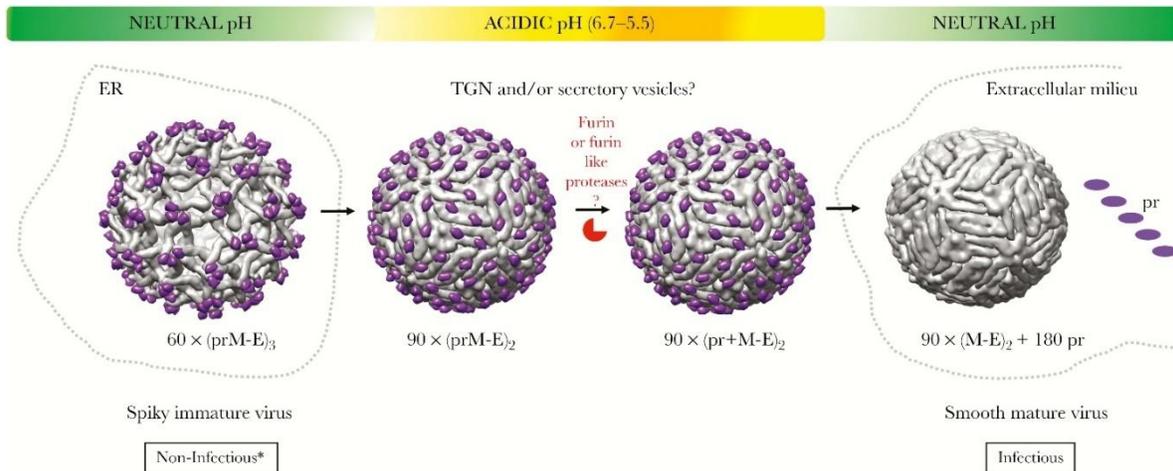


Figura 3. Etapas de maduración de los Flavivirus. Se muestran los cambios conformacionales en las glicoproteínas de la superficie viral, estos cambios dependientes de pH llevan a la partícula viral "puntiaguda" inmadura y no infecciosa desde el RE a través del TGN en donde se realiza una escisión de la glicoproteína prM y posteriormente es exocitado como una partícula viral madura infecciosa (Sirohi & Kuhn, 2017).

2.3 El flavivirus y su interacción con el citoesqueleto

Se ha observado que el citoesqueleto de las células humanas tiene un contacto estrecho con las partículas del virus, de la misma manera el rendimiento en la capacidad de infección y replicación viral se ve afectado por la alteración del citoesqueleto. Esto dio pie a estudios en los que se utilizaron virus como herramientas para comprender su relación con la célula hospedera, así como el funcionamiento de algunos elementos del citoesqueleto durante la entrada del virus, además del tráfico intracelular, y el proceso de ensamblaje viral.

Otro ejemplo de esta interacción es la desorganización del citoesqueleto que se observa a causa de la infección por el DENV, lo que ha generado un nuevo auge en el estudio de este patógeno para comprender la causa de este desorden. Los microtúbulos y sus proteínas asociadas, como parte estructural del citoesqueleto, desempeñan un papel importante en el tráfico de partículas virales en las células huésped, incluyendo su función como herramienta de transporte de viriones en células infectadas. Un ejemplo de esto es que los microtúbulos sirven como vía bidireccional entre los organelos celulares y la interacción de la poliproteína viral del

JEV con los microtúbulos, conduce al transporte intracelular de las proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi durante la replicación de JEV (Dodding & Way, 2011).

Durante el estudio de algunos motores moleculares, en asociación con los microtúbulos, como la dineína, se ha encontrado que las cápsides virales utilizan el sistema de transporte dineína-microtúbulos para su movimiento dentro de la célula. Como ejemplo están tres flavivirus, el DENV, JEV y WNV (virus del este del Nilo), en los cuales se ha comprobado cómo la interacción de la proteína M con la dineína, desempeña un papel en el ciclo de vida flaviviral, durante el tráfico de partículas flavivirales dentro de las células infectadas (Braut et al., 2011). Por otro lado, se ha observado que la dineína es utilizada por la pE del DENV para su tráfico interno retrogrado; en esa investigación se sugirió que las proteínas E recién sintetizadas se trafican al sitio de ensamblaje y se disocian del motor de dineína a medida que continúa la infección. Esto se investigó mediante la interrupción de la actividad motora de la dineína por la dinamina, observándose que posteriormente se ve afectada la expresión de pE y C del DENV 2 (Shrivastava et al., 2011).

Fuera del ámbito de los flavivirus, existen muchos más ejemplos de la interacción entre el virus y el citoesqueleto, uno de ellos, es el virus del Herpes simple tipo 1 (HSV1). En este, durante el establecimiento inicial de la infección, las cápsides citosólicas de HSV1 sin envoltura, experimentan movimientos bidireccionales dependientes de microtúbulos que finalmente dan como resultado una movilidad retrógrada neta hacia el núcleo, donde el virus puede establecer una infección latente. La actividad del complejo motor dineína-dinactina, que es reclutado por estas cápsides entrantes, es necesaria para establecer la infección. Las cápsides de HSV1 purificadas a partir de viriones extracelulares también se pueden unir y traficar a lo largo de los microtúbulos de manera dependiente de la dinactina *in vitro*, pero únicamente en presencia de ATP (Dodding & Way, 2011). En la figura 4 se observa una representación que muestra la entrada y el egreso del virus del herpes, todo esto es dependiente de los motores moleculares kinesina y dineína, que se encuentran a manera de complejo con los microtúbulos.

Durante la entrada del virus a la célula, dependiendo del tipo de célula, los virus se incorporan (Figura 4A) fusionándose directamente con la membrana plasmática o (Figura 4B) a través de un mecanismo endocítico. Independientemente del modo de entrada, los virus dentro de los endosomas o comúnmente presentes como cápsides sin envoltura reclutan, tanto cinesina como dineína. Dependiendo de la posición de MTOC (centro de organización de los microtúbulos) y de la organización de los microtúbulos del citoesqueleto en relación con el núcleo, también es posible que se requiera el desplazamiento del extremo positivo dependiente de cinesina a lo largo de los microtúbulos (Figura 4C) para que el virus alcance la envoltura nuclear. Egreso: después de su salida del núcleo, el tegumento de las cápsides sin envoltura recluta a la cinesina y la dineína para facilitar su transporte bidireccional en los microtúbulos (Figura 4D y E). Los virus se moverán a lo largo de los microtúbulos hasta que se encuentren con compartimentos de membrana en los que pueden brotar para formar viriones envueltos (Figura 4F y G). La ubicación de estos compartimentos de membrana variará según la posición del MTOC y la organización del citoesqueleto, que dependerá del tipo de célula. Los movimientos virales hacia estos compartimentos de membrana pueden requerir un transporte neto final (dineína) o extremo final (cinesina-1) dependiendo del sitio de involucramiento (Figura 4F y G) con respecto al MTOC. Es posible que algunos virus nunca encuentren el compartimento correcto de la membrana y continúen moviéndose como cápsides sin envoltura por toda la célula (Figura 4E y H). Después del involucramiento, los virus dentro de los compartimentos vesiculares (Figura 4I) serán transportados en una forma anterógrada neta, posiblemente por la cinesina-1, hacia la membrana plasmática, donde se fusionan y se liberan (Dodding & Way, 2011).

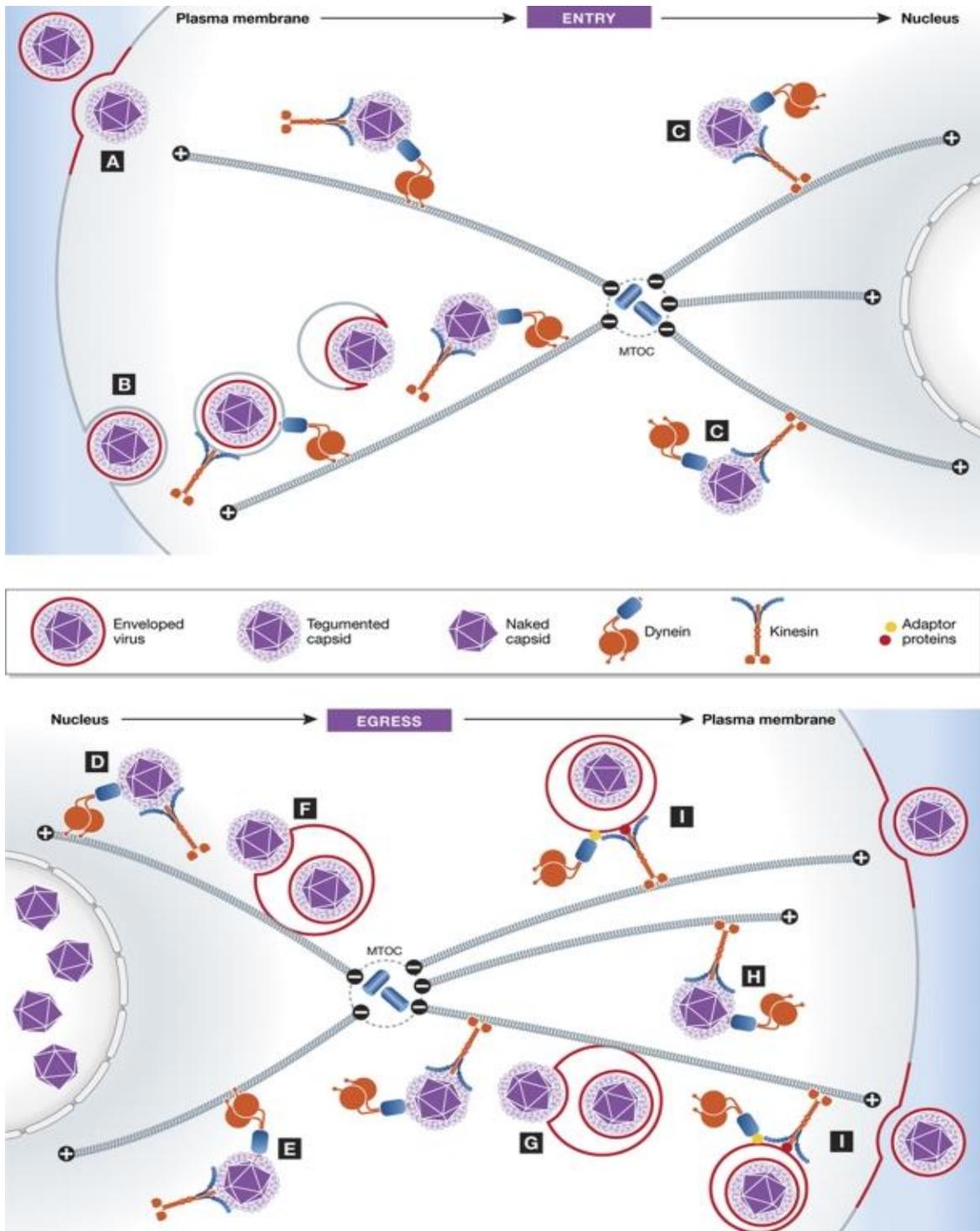


Figura 4. Transporte de virus del herpes durante la entrada y la salida. En la figura superior se observa el ingreso del virus, una vez dentro de la célula hospedera el virus es transportado hacia el núcleo. En la figura inferior se observa el egreso del virus a través del citoesqueleto (Dodding & Way, 2011). MTOC.

2.4 Microtúbulos

Las células como unidades fundamentales de cualquier organismo son capaces de realizar diferentes funciones. Además de mantener diferentes formas dependiendo de las necesidades que se presenten para cada tejido y cada organismo, dadas las diferentes condiciones y requerimientos celulares es necesario un excelente sistema de tráfico interno y una perfecta organización celular, los microtúbulos desempeñan un papel crucial en la organización de todas las células eucariontes. Estos son tubos proteicos huecos, largos y relativamente rígidos, que tienen la capacidad de desensamblarse con rapidez en un sitio y ensamblarse de nuevo en otro. Los microtúbulos se originan en centrosomas, estas estructuras se encuentran cerca del núcleo celular, partiendo de estas, se extienden hacia la periferia para formar un sistema de guías intracelulares a lo largo de las cuales se desplazan vesículas, orgánulos y otros componentes. Este sistema también es responsable de anclar los orgánulos asociados a membranas dentro de la célula y guiar el transporte intracelular (Alberts & Hopkin Bray, 2011).

El estudio detallado de la estructura de los microtúbulos revela que están constituidos generalmente, por 13 subunidades globulares. Los microtúbulos se han aislado de diversos órganos, siendo el tejido nervioso una de las principales fuentes de obtención, dado el gran número de microtúbulos presente en los axones de células nerviosas. Químicamente, están formados por una proteína dimérica llamada tubulina, de aproximadamente 110,000 daltones, y cada dímero está formado, a su vez, por dos polipéptidos denominados alfa tubulina y beta tubulina (Figura 5). Cuando las moléculas de tubulina se ensamblan para formar a los microtúbulos, constituyen los llamados protofilamentos de tubulina, los cuales se disponen de manera escalonada en hileras formadas con la molécula de alfa tubulina de un dímero, alineada junto a la molécula de beta tubulina de la siguiente hilera (Figura 6). Varias isoformas de las tubulinas α y β se derivan de modificaciones postraduccionales de los aminoácidos tales como destirosinación o fosforilación. Subpoblaciones de tubulinas forman microtúbulos que, de acuerdo con su composición, participan en funciones específicas. Todos los protofilamentos de

un microtúbulo están orientados de la misma manera, lo que hace al microtúbulo una estructura polarizada. Se denomina extremo negativo al formado por las α -tubulinas y positivo al formado por las β -tubulinas. Los nuevos dímeros de tubulina se añaden con mayor probabilidad al extremo positivo, que es el lugar preferente de crecimiento del microtúbulo (Jiménez García, 2011).

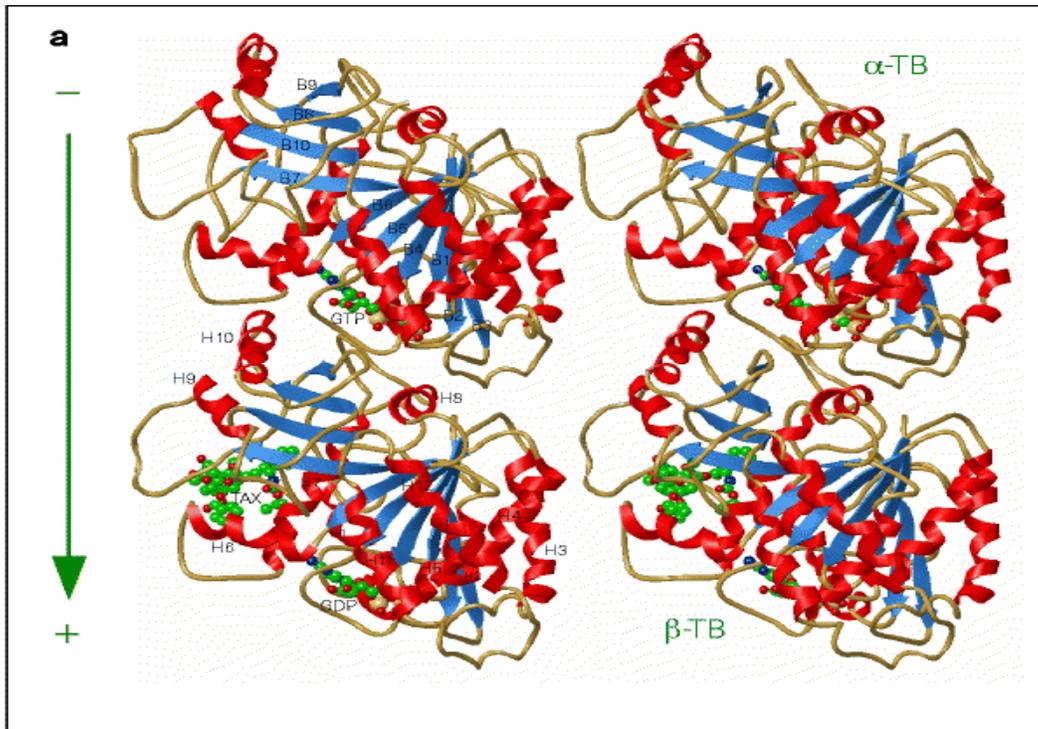


Figura 5. Estructura del dímero de compuesto por α y β tubulinas. Se muestran dos estructuras de dímeros de tubulinas α y β en representación de listones, ambas estructuras son iguales, únicamente las diferencia una ligera rotación (Eva Nogales, 1989).

Las α y β tubulinas comparten 40% de identidad en sus secuencias de aminoácidos, ambas existen en varias formas de isotipo, y ambas experimentan una variedad de modificaciones postraduccionales. En la figura 5 se muestra un modelo atómico del dímero de tubulina α - β ajustado a un mapa de densidad de 3.7 Å obtenido por cristalografía de electrones de láminas de tubulina. Las estructuras de α - y β -tubulina son básicamente idénticas: cada monómero está formado por un núcleo de dos láminas β rodeado por α -hélices. La estructura monomérica es muy compacta,

pero se puede dividir en tres dominios funcionales: el dominio amino-terminal que contiene la región de unión a nucleótidos, un dominio intermedio, el dominio carboxi-terminal, que probablemente constituye la unión superficie para las proteínas motoras (Nogales et al., 1998).

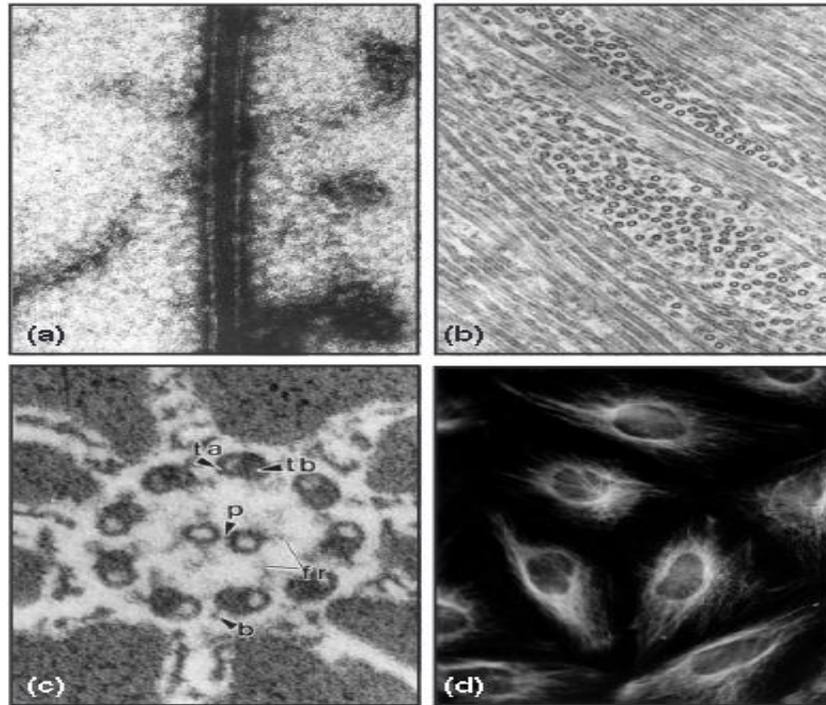


Figura 6. Organización de microtúbulos. a) Microtúbulo polimerizado *in vitro* y teñidos por tinción negativa. X 300,000. b) Pastilla de microtúbulos polimerizados *in vitro* preparada para microscopía electrónica de transmisión. Se observa el corte longitudinal y transversal de los microtúbulos. X 80,000. c) Axonema de un flagelo de espermatozoide de cobayo en corte transversal. Los microtúbulos se disponen en un arreglo cilíndrico, de un par de microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos. Las principales figuras que lo integran son fr, fibras radiales; ta, túbulo A; tb, túbulo B; p, puente; b, brazos de dineína. X 240,000. d) Inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo antitubulina que permite la localización de la red micro tubular a partir de la región perinuclear, donde se organiza, hacia la periferia, y en donde los microtúbulos siguen el contorno celular. X 1,600 (Jiménez García, 2011; Paniagua, 2007).

Además de las tubulinas, en los microtúbulos existen otras proteínas denominadas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). Entre ellas, están incluidas las proteínas que se unen específicamente a los microtúbulos de los centriolos y cilios, como la nexina y la dineína. Las MAP parecen colaborar en el ensamblaje de los

dímeros para formar microtúbulos, aunque no son imprescindibles para la formación de microtúbulos *in vitro*, se considera que también participan en la estabilización del microtúbulo y en su relación con los microtúbulos adyacentes. Cada proteína tiene un dominio por el que se une al microtúbulo (contribuyendo a su estabilidad) y otro por el que se puede unir a otro componente citoesquelético o estructura citoplásmica. Las MAP se clasifican en dos grupos, según su peso molecular; MAP de alto peso molecular (200-1000 kDa). Algunas pueden verse con el microscopio electrónico, especialmente si las preparaciones han sido contrastadas con hidróxido de lantano. Las MAP se aprecian como proyecciones de unos 10 nm de longitud, perpendiculares a la pared del microtúbulo y separadas unos 40-50 nm entre sí; por tanto, no todos los dímeros las poseen. Estas proyecciones dejan alrededor de cada microtúbulo un halo de unos 10 nm que impide el contacto entre los microtúbulos adyacentes que forman haces, se conocen cuatro tipos diferentes de MAP, numeradas del 1 al 4, las MAP-1 comprenden, al menos, tres proteínas diferentes: A, B y C. MAP1A y B tienen patrones de expresión recíprocos. MAP1A se expresa principalmente en neuronas adultas y se localiza en las dendritas, mientras que MAP1B se expresa predominantemente en los axones de neuronas en desarrollo en el embrión. Recientemente, también se descubrió que MAP1B se expresa en las dendritas, las densidades postsinápticas y las espinas dendríticas de las neuronas adultas, donde contribuyen a la plasticidad sináptica. MAP1B es importante para la formación y maduración de las espinas dendríticas al regular el citoesqueleto de actina (Mohan & John, 2015). La C es especialmente importante en el transporte retrógrado de vesículas y se denomina también dineína citoplásmica, las MAP-2 se encuentran, en el cuerpo celular y en las dendritas de neuronas, donde están asociadas a filamentos intermedios, las MAP-4 aparecen en la mayoría de las células y estabilizan los microtúbulos (Paniagua, 2007).

El segundo tipo de MAP, las proteínas τ (tau), son de bajo peso molecular (55-62 kDa), su estequiometría es; una proteína τ por cada seis tubulinas, no forman proyecciones, pero conforman una capa rugosa que recubre el microtúbulo. Se encuentran también en neuronas, pero sólo en el axón, y establecen uniones entre microtúbulos (Paniagua, 2007).

2.5 Proteínas motoras

Como se mencionó en el apartado anterior, los microtúbulos sirven como andamio para las proteínas motoras que transportan cargamentos en el interior de la célula. Las proteínas motoras de una célula convierten la energía química (almacenada en forma de ATP) en energía mecánica, que se utiliza para mover el cargamento celular que se encuentra unido al motor. Existen diferentes tipos de cargamentos celulares que estas proteínas pueden transportar, entre estos se encuentran; vesículas, mitocondrias, lisosomas, cromosomas además de otros filamentos del citoesqueleto. Una sola célula puede contener distintos tipos de proteínas motoras diferentes, cada una especializada en una actividad distinta, como el movimiento de tipos particulares de cargamento en una región específica de la célula. Las proteínas motoras pueden agruparse en tres grandes familias: cinesinas, dineínas y miosinas (Alberts & Hopkin Bray, 2011). Las cinesinas y las dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos, en tanto que las miosinas lo hacen a lo largo de microfilamentos. No se conoce ningún motor proteico que utilice los filamentos intermedios como rieles, lo que no resulta extraño si se considera que los filamentos intermedios no están polarizados, esto no proporcionaría señales direccionales al motor. Las proteínas motoras se mueven por pasos en una sola dirección a lo largo del riel de citoesqueleto, de un sitio de unión al siguiente. Conforme la proteína avanza, experimenta varios cambios en la conformación que constituyen un ciclo mecánico. Los pasos del ciclo mecánico se coordinan con los pasos de un ciclo químico (o catalítico), el cual proporciona la energía necesaria para impulsar la actividad del motor. Los pasos del ciclo químico abarcan la unión de una molécula de ATP con el motor, la hidrólisis de ATP, la liberación de ADP y Pi, (difosfato de adenosina y fosfato) del motor y la unión de una nueva molécula de ATP. La unión e hidrólisis de una sola molécula de ATP se emplea para mover al motor alrededor de 8 nm sobre el riel (Kinoshita et al., 2018). Conforme la proteína motora se mueve a los sitios sucesivos sobre el polímero del citoesqueleto, los ciclos mecánico y químico se repiten una y otra vez, esto mueve el cargamento a través del citoesqueleto (Jiménez García, et al 2011). Es necesario recordar que son motores de tamaño

molecular y que, a diferencia de cualquier otro tipo de máquinas, estas son completamente dependientes de su ambiente además de que están sometidas a una gran resistencia por fricción, esto ocasiona que la proteína motora se detenga casi de inmediato una vez que no hay aporte de energía (Karp, 2011).

2.6 Cinesinas

En 1985 Ronald Vale y colaboradores aislaron una proteína motora constituida de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (Figura 7a). Una molécula de cinesina tiene dos cabezas globulares que se unen a un microtúbulo y actúan como motores estos son llamados dominios motores y tienen la capacidad de hidrolizar ATP para generar su propio movimiento. Cada dominio motor se conecta con un cuello a un tallo cilíndrico y posteriormente a un domino de unión con forma de abanico que se une al cargamento que transportará en el citoplasma usando los microtúbulos como rieles. La cinesina inicialmente fue descubierta en axones de calamar gigante y luego se encontró en casi todas las células eucariontes. Esta proteína motora tiene una estructura muy similar a la de la miosina. A pesar del hecho de que la cinesina es una proteína mucho más pequeña, y los dos tipos de motores operan en rieles distintos, se cree que la cinesina y la miosina evolucionaron de una proteína ancestral común presente en alguna célula eucariota primitiva. En pruebas de motilidad *in vitro*, se ha observado que las cinesinas se mueven a lo largo de microtúbulos hacia su extremo positivo, por lo que se dice que la cinesina es un motor microtubular dirigido al lado positivo (anterógrado). En un axón, donde todos los microtúbulos están orientados con su extremo negativo hacia el cuerpo celular, la cinesina transporta cargamentos hacia las terminaciones sinápticas.

Una sola molécula de cinesina se mueve, sobre un solo protofilamento de un microtúbulo a una velocidad proporcional a la concentración de ATP, hasta una velocidad máxima de 1 μm por segundo. Cuando la concentración de ATP es baja, las moléculas de cinesina se desplazan lentamente, y gracias a la disminución de la velocidad dependiente de la concentración de ATP se confirmó que se mueve por pasos (Figura 7b vista lateral).

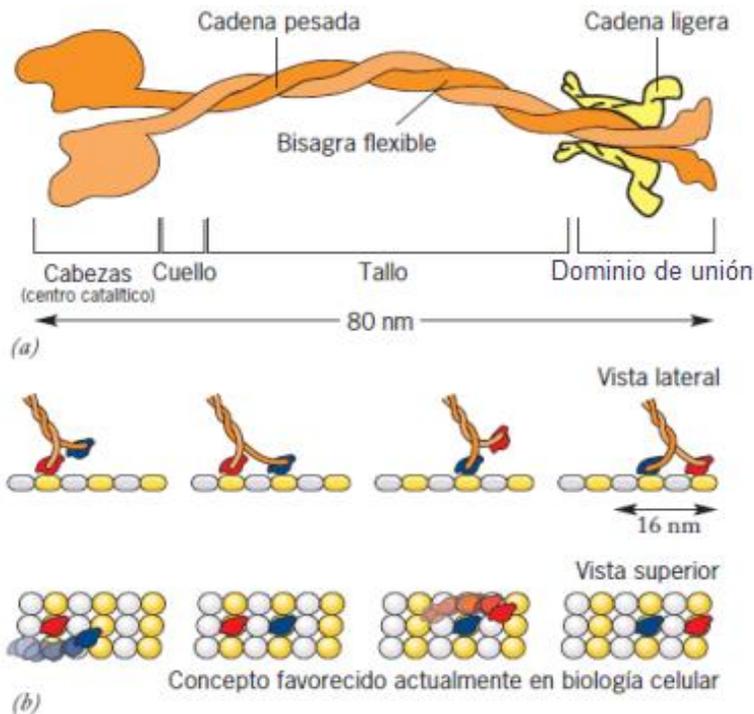


Figura 7. Cinesina. (a) Arquitectura de la molécula de cinesina, que consiste en dos cadenas pesadas que se entrelazan de forma helicoidal en la región del tallo y dos cadenas ligeras relacionadas con los extremos globulares de las cadenas pesadas. Las cabezas o dominio motor se unen con el microtúbulo y el dominio de unión interacciona con el cargamento que se transporta. (b) Esquema de una molécula de cinesina que se mueve a lo largo de un riel microtubular. Se observa el modelo de movimiento de mano sobre mano, las dos cabezas realizan movimientos idénticos, pero alternados, similares a los de una persona que camina sobre una cuerda (Paniagua, 2007).

Cada paso es de unos 8 nm de largo, que corresponde a la longitud de un dímero de tubulina en un protofilamento. Para producir cada paso, se requiere la hidrólisis de una sola molécula de ATP. A este movimiento se le denomina “mecanismo mano sobre mano” (Figura 7b vista superior), esto porque asemeja a una persona que sube por una cuerda, las dos cabezas se alternan para tomar la primera o la segunda posición sin una rotación acompañante del tallo y la carga en cada paso. El movimiento de las moléculas de cinesina, tanto *in vitro* como *in vivo*, es muy progresivo, lo que significa que la proteína motora tiende a moverse a lo largo de un microtúbulo individual por distancias considerables mayores a $1\mu\text{m}$ sin desprenderse. Una de las cabezas de la cinesina está unida con el microtúbulo en todo momento. La cinesina está bien adaptada para el transporte independiente y por largas distancias de pequeños paquetes de cargamento, las dos cabezas de la

molécula de la cinesina se comportan en forma coordinada, de modo que siempre están en diferentes etapas de sus ciclos químicos y mecánicos en cualquier momento dado. Cuando una cabeza se une al microtúbulo, los cambios de conformación resultantes en la región del cuello adyacente de la proteína motora hacen que la otra cabeza se mueva hacia adelante al siguiente sitio de unión en el protofilamento, es probable que la cabeza con desplazamiento anterógrado encuentre su sitio de unión preciso mediante una búsqueda aleatoria rápida. (Karp, 2011).

Tabla 1. Clasificaciones funcionales de las proteínas motoras de los microtúbulos. En esta tabla se muestra las diferentes clases de motores clasificados por sus cargas (Harvey, 2006).

Clase	Miembros comunes	Carga	Dirección del movimiento
Motores citosólicos	Cinesinas (I, KIFIA, KIFIB)	Vesículas/organelos citosólicos	(+)
	Dineína citosólica	Vesículas/organelos citosólicos	(-)
	Cinesina II	Vesículas/organelos citosólicos	(+)
Motores mitóticos	Cinesina BimC (bipolar)	MT del huso y los ásteres	(+)
	Cromocinesinas	Cromosomas (brazos)	(+)
	MCAK	Cinetocoros	(+)
	CENPE	Cinetocoros	(+)
	Cinesina Ned	MT del huso	(-)
	Dineína citosólica	Cinetocoros, centrosomas, corteza celular cerca de los polos del huso	(-)
Motores axonémicos	Dineínas del brazo externo e interno	Dobletes de microtúbulos en cilios y flagelos	(-)

Las kinesinas pueden dividirse en dos grupos funcionales, citosólicas y mitóticas, de acuerdo con la naturaleza del material que transportan (Tabla 1), las diferencias funcionales entre las kinesinas se encuentran en su dominio de unión, ya que este determinará la naturaleza de la carga. Las kinesinas citosólicas participan en el transporte de vesículas y orgánulos; entre ellos se incluye la clásica kinesina 1 axónica, que transporta lisosomas y otros organelos. Algunas kinesinas citosólicas transportan una carga específica, por ejemplo, la KIF 1b (proteínas de la superfamilia de Kinesinas) y la estrechamente relacionada KIF 1a transportan mitocondrias y vesículas sinápticas, respectivamente, a las terminaciones nerviosas. Otras kinesinas citosólicas median el transporte de vesículas secretorias a la membrana plasmática y el movimiento radial de las membranas del RE y de gránulos de pigmento, a diferencia de estas, las kinesinas mitóticas participan en el ensamblaje del huso y la separación de los cromosomas durante la división celular. Este grupo comprende numerosas proteínas, como la proteína asociada al cinetocoro CENP-E, la BimC bipolar y una proteína motora hacia el extremo (-) llamada Ned (Lodish Harvey, 2013).

2.7 Dineína

En el año de 1965 Gibbons y Rowe caracterizaron una proteína con actividad de adenosin trifosfatasa contenida en aislados ciliares de *Tetrahymena pyriformis*. En este mismo artículo propondrían el nombre “Dineína” esto por “dine” que significa fuerza e “ina” sufijo para sustancias proteicas (Gibbons & Rowe, 1965), como tal las dineínas son una gran familia de proteínas motoras que aprovechan la energía de la hidrólisis de ATP para moverse a lo largo de los microtúbulos en la dirección del extremo negativo (retrogrado) (Schmidt & Carter, 2016).

Por medio de cristalografía de rayos-X se han podido entender diferentes aspectos de la dineína, como estructura y función; para esto son necesarios modelos atómicos precisos y de alta resolución, lo que conlleva a una búsqueda constante de mejorar o desarrollar las técnicas para obtener mejores resultados. En el año 2012 Kon y colaboradores determinaron la estructura a del dominio motor citoplásmico de *Dictyostelium discoideum* a 4.5 Å de resolución, y posteriormente

lograrían una resolución de 2.8 Å (Kon et al., 2012). A su vez Carter et al, determinarían las estructuras cristalinas del dominio motor de dineína citoplásmica de *Saccharomyces cerevisiae*, primero a una resolución de 6 Å en el 2011, y un año después conseguirían una resolución de 3.3-3.7 Å (Schmidt & Carter, 2016). De acuerdo con estas estructuras, así como con los estudios de microscopía electrónica anteriores, la estructura general del dominio motor de la cadena pesada de dineína se divide en cuatro dominios: cuello, dominio de unión, cabeza y tallo (Figura 8B-E). En pocas palabras, cada dominio lleva a cabo una función esencial de una proteína motora: el cuello es el dominio de unión de carga, la cabeza es el sitio de la hidrólisis de ATP, el dominio de unión es el amplificador mecánico y el tallo es el dominio de unión a la vía.

2.8 Estructura

Como la cinesina, la dineína citoplasmática es una molécula de dos cabezas, construidos alrededor de cadenas pesadas idénticas. A causa de su gran tamaño y alta movilidad intrínseca, la dineína ha sido poco caracterizada en cuanto a su actividad mecanoquímica y estructura a resolución atómica. La cadena pesada de la dineína se divide en distintos dominios, uno de ellos es el tallo (Figura 8A), el cual es capaz de asociarse a una carga a través de la dinactina. Posteriormente, se encuentra el enlazador o linker (Figura 8, color magenta), que tiene el papel de realizar una parte de la actividad motora. Finalmente, se encuentra el dominio motor, conformado por seis módulos repetidos, que se ensamblan en forma de flor o anillo, entre los cuales se encuentra un dominio AAA ATPasa. Entre el cuarto y el tercer modulo AAA se encuentra el puntal (Figura 8, color amarillo), el cual protruye desde el dominio motor y contiene la región de unión a microtúbulos. El brazo está unido al dominio de unión, este se asocia con el primer y tercer modulo, el ATP se une al dominio AAA1 (Figura 8, color azul) generando un ligero cambio conformacional del anillo, esto a su vez ocasiona que el enlazador se asocie con el primer y quinto modulo. Este cambio conformacional, rota la molécula para acercar el brazo y el puntal, resultando en el transporte de la carga hacia el extremo negativo de los microtúbulos (Lodish Harvey, 2013).

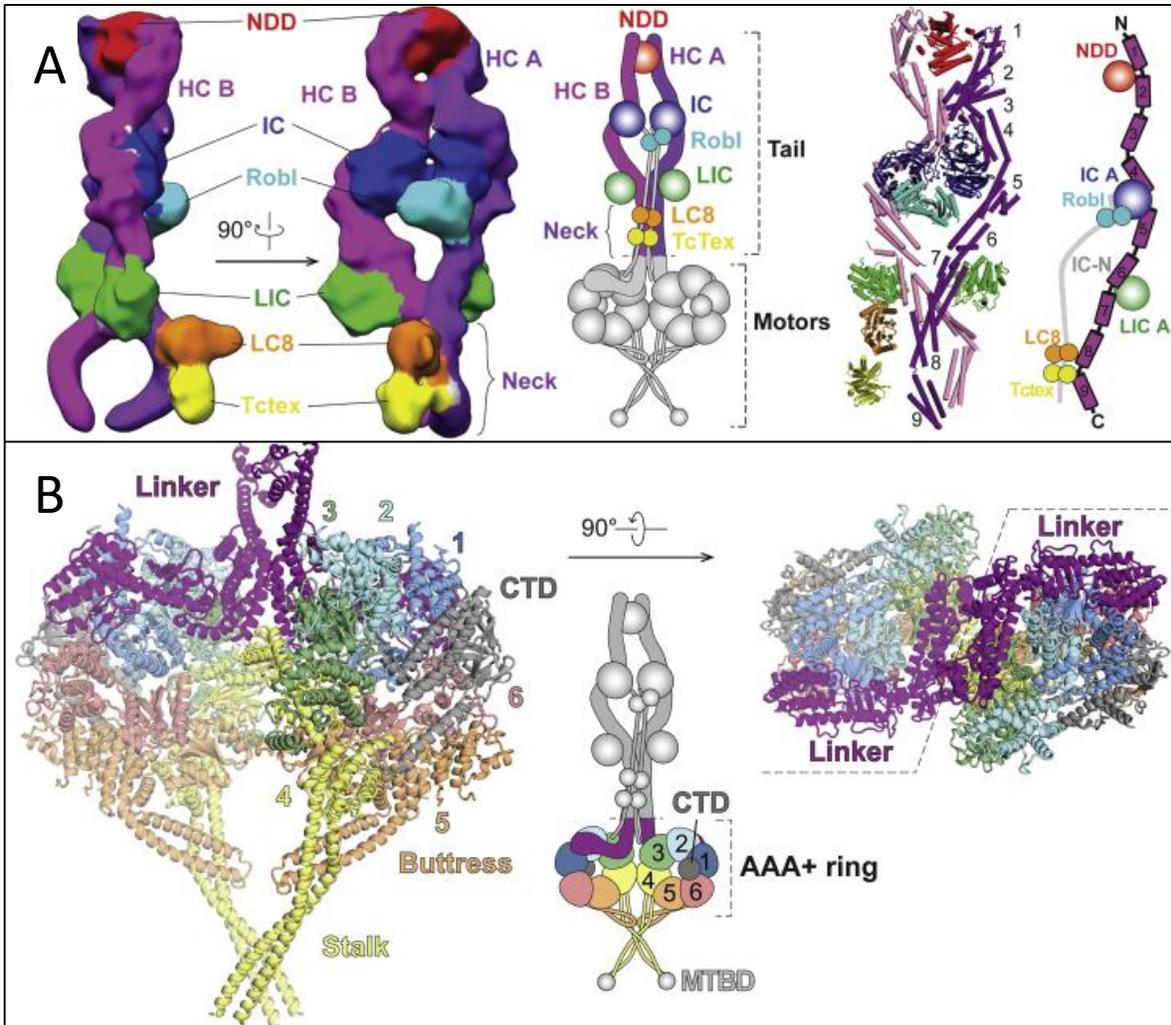


Figura 8. Arquitectura general del dominio motor de la dineína. A Dominio del tallo. Está formada por dos copias de la cadena pesada (HC) de la dineína, cada una de las cuales contiene un dominio de dimerización N-terminal (NDD) (color rojo) de 200 aminoácidos, seguido de nueve haces de helices α . La cada dineína HC se une a una cadena intermedia de dineína (IC) y una cadena intermedia ligera (LIC). El dominio IC C-terminal WD40 contacta con los paquetes HC 4 y 5. LIC se une a los paquetes HC 6 y 7 usando una serie de residuos hidrofóbicos conservados cerca de su N terminal. El dominio del tallo en su extremo amino terminal se encarga de la oligomerización de dineína, unión de carga y regulación, aunque este no es parte del dominio motor ni es capaz de producir movimiento *in vitro*. **B Dominio motor.** Se muestran los dominios motores diméricos desde el lateral (izquierda) y la parte superior (derecha), que muestran el enlazador o linker (púrpura), el anillo de seis dominios AAA+ (coloreados como en la caricatura), el tallo (amarillo), el contrafuerte (naranja), y dominio C-terminal (CTD, en gris). MTBD, dominio de unión a microtúbulos (Zhang et al., 2017).

2.9 Clasificación de las dineínas

Las dineínas funcionan como complejos proteicos contruidos alrededor de subgrupos generadores de fuerza denominados cadenas pesadas, denominados así debido a su gran masa molecular (típicamente ~ 500 kDa). Cada cadena pesada contiene un dominio motor que pertenece a la superfamilia AAA+ unida a un dominio de brazo amino terminal (Figura 8a). El dominio de brazo tiene propiedades de oligomerización distintas y sirve como una plataforma para la unión de varios tipos de subunidades asociadas (Figura 8b), que a su vez median las interacciones con la carga, ya sea por unión directa o mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras. Filogenéticamente, hay nueve clases principales de cadena pesada de dineína. La cadena pesada de dineína citoplásmica 1 (codificada por DYNC1H1 en humanos) se usa para casi todo el transporte dirigido en el extremo negativo en el citoplasma de la mayoría de las células eucarióticas. Sin embargo, las *Archaeplastida*, que carecen de dineínas y poseen un repertorio amplio de cinesinas dirigidas por el extremo negativo, son una excepción. La familia de la dineína se divide en axonemal, dineínas citoplasmáticas y de transporte intraflagelar (IFT). Las dineínas axonemales residen dentro de los cilios y flagelos y son responsables de la flexión rítmica y coordinada de estos organelos. Se encuentra dineína citoplasmática en toda la red de microtúbulos (MT) y son responsable del transporte retrógrado de varias cargas hacia los extremos negativos de los MT, mientras que la dineína IFT predominantemente transporta cargas a lo largo de MT en el axonema (Diamant & Carter, 2013). La dineína citoplasmática 2 (codificada por DYNC2H1 en humanos) tiene un papel especializado en el transporte de material a lo largo de cilios y flagelos móviles y sensoriales (Gleave, 2014). La dineína citoplásmica realiza una gran variedad de funciones celulares, la mayoría de estas actividades se encuentra en las células metazoas. Aunque la dineína citoplasmática también se usa en grados variables en diferentes tipos de organismos como en hongos, alveolata, stramenopila y amebozoa, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el único papel conocido de la dineína citoplásmica es posicionar el núcleo durante la

división celular, mientras que en los hongos filamentosos y en *Dictyostelium discoideum* también se usa para el transporte de vesículas (Roberts, 2013).

2.10 Ciclo mecanoquímico

El ATP induce la disociación del complejo de los microtúbulos, después de separarse de los microtúbulos, el motor se reorganiza, preparándose para un cambio estructural posterior denominado golpe de potencia, que se cree que genera fuerza, después de una búsqueda difusiva sobre el microtúbulo. El reposicionamiento del motor a un nuevo sitio en el microtúbulo estimula la liberación de productos de hidrólisis de ATP, desencadenando así el golpe de potencia. Los eventos químicos y mecánicos en el ciclo de dineína son muy semejantes con los del motor miosina 2, que utiliza la actina como base. Esto se hizo evidente a partir de los primeros estudios estructurales sobre las dineínas axiales-axiales del brazo externo (Schmidt & Carter, 2016).

De los seis dominios AAA+ del motor de dineína, solo los primeros cuatro son capaces de unir nucleótido. De estos, solo el AAA1 es estrictamente necesario para la motilidad y alberga el conjunto completo de residuos catalíticos en todas las isoformas de dineína. Los otros sitios de unión a nucleótidos muestran un grado variable de conservación y parecen tener funciones accesorias o reguladoras para la motilidad de la dineína. AAA5 y AAA6 han perdido todos los residuos catalíticos y funcionan principalmente como una base estructural para el tallo (Roberts et al., 2013).

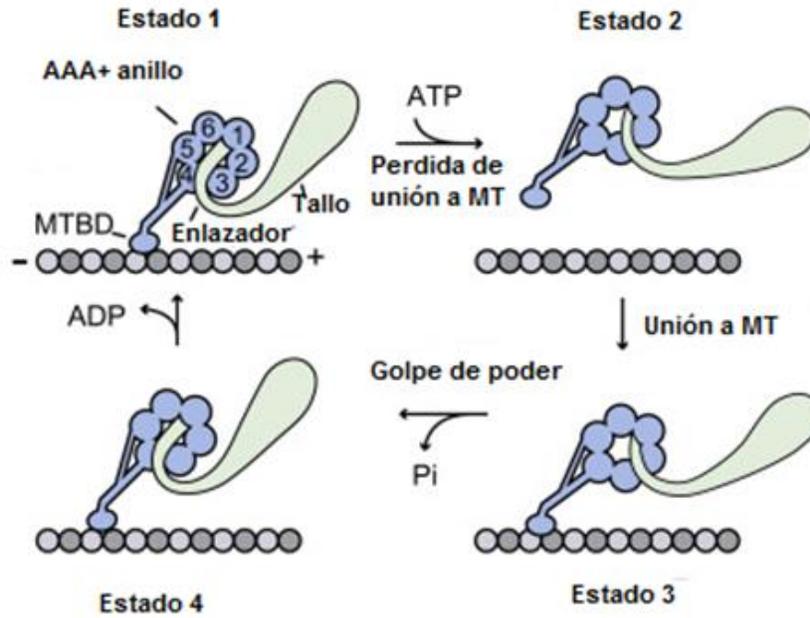


Figura 9. Ciclo mecanoquímico de la dineína. Se observan los diferentes estados en los que se encuentra el enlazador de la dineína durante su ciclo mecanoquímico, esto se debe a los cambios estructurales generados por la unión del ATP (modificada de Yildiz, 2018)

Los pasos de hidrólisis de ATP en AAA1 están acoplados al ciclo de motilidad de dineína, que se caracteriza por cambios conformacionales en el dominio de unión a los microtúbulos. En ausencia de ATP, el enlazador adopta una conformación recta con su extremo N-terminal que entra en contacto con AAA5 en el anillo AAA+ (Figura 9, estado 1). El dominio de unión a microtúbulos está fuertemente unido. Cuando el ATP se une a AAA1, este pierde la conexión con el microtúbulo y el enlazador se dobla de modo que su extremo N-terminal entra en contacto con AAA2 / AAA3 (Figura 9, estado 2). Después de la hidrólisis de ATP, el motor de dineína vuelve a unirse al microtúbulo, lo que genera el golpe de poder (Figura 9, estado 3). Esta transición del enlazador de una conformación doblada a una recta produce la fuerza para el movimiento de carga. Después del golpe de poder, el extremo N del enlazador se encuentra cerca de AAA4. El retorno del enlazador a su posición original en AAA5 se correlaciona con la liberación de ADP y restablece el ciclo de hidrólisis de ATP (Figura 9 estado 4) (Roberts et al., 2013).

2.10 Dineína y adaptadores de carga

La dineína y su cofactor, la dinactina, forman un complejo ternario con una proteína adaptadora de carga, en la que los dominios motores adoptan una conformación paralela, se mueven a velocidades similares a las de las cargas impulsadas por la dineína en las células y producen fuerzas mucho más altas (4 pN) que una dineína sola. Una característica estructural común de los adaptadores de carga es la presencia de bobinas enrolladas largas o coiled coil, a través de las cuales la cola de dineína recluta la dinactina (Elshenawy et al., 2019). Los adaptadores de carga conocidos se enumeran en la tabla 2. Urnavicius y colaboradores, en los años 2015 y 2018, observaron la capacidad de los adaptadores de carga BICDR1, BICDR2 y HOOK3 para vincularse al complejo dineína-dinactina y así poder transportar diferentes tipos de cargas. Por medio de microscopía electrónica y estudios de moléculas individuales demostraron que los adaptadores pueden reclutar una segunda dineína a la dinactina. Mientras que BICD2 únicamente recluta una sola dineína, los adaptadores BICDR1 y HOOK3 tienen la capacidad de reclutar dos dineínas. Además, también pudieron demostrar que el hecho de utilizar dos dineínas aumenta la fuerza y la velocidad del motor sobre los microtúbulos. Finalmente consiguieron una construcción basados en crio microscopia electrónica con una resolución de 3.5 Å de un complejo dineína-dinactina-BICDR1 mostrando cómo la dinactina actúa como un andamio para coordinar dos dineínas una al lado de la otra. De esta forma su trabajo proporciona una base estructural para comprender cómo diversos adaptadores reclutan diferentes cantidades de dineínas y regulan las propiedades móviles de la maquinaria de transporte celular retrogrado dineína-dinactina (Urnavicius et al., 2018).

Tabla 2. Adaptadores de cargamento y sus cargas (Reck-Peterson et al., 2018).

Adaptador de cargamento	Carga
BICD2	Vesículas del Golgi al RE, vesículas de membrana al Golgi, complejos a poros nucleares
BICDL1 (BICDR1)	Vesículas de red trasn Golgi al RE
SPDL1 (Spindly)	Cinetocoro
HOOK1	Endosomas tempranos Cargas independientes de clatrina
HOOK3	Endosomas tardíos y cargas independientes de clatrina
NIN (Ninein)	Desconocido
NINL (Ninein-like)	Vesículas que contengan adaptadores MICAL3 y RAB8A
RAB11-FIP3	Reciclaje de endosomas
BICD1	Vesículas RE al Golgi independientes de COP1
BICDL2 (BICDR2)	Vesículas con adaptador RAB13
HOOK2	Proteínas centrosomales, tráfico de espermátidas
CCDC88A (Girdin)	Desconocido
CCDC88B (Gipie)	Lisosomas secretores
CCDC88C (Daple)	Desconocido
NUMA	Extremos negativos de los microtúbulos en el huso
TRAK1	Mitocondrias
TRAK2	Mitocondria
HAP1	Cargas hacia membrana

2.11 Dineína y la replicación viral

Desafortunadamente para la célula, diversos virus son capaces de secuestrar eficientemente el transporte sobre los microtúbulos para facilitar su replicación y mejorar su propagación. El grado de uso de los microtúbulos del citoesqueleto y sus motores asociados, depende de la estrategia de replicación del virus particular. Varios virus utilizan el sistema de transporte de microtúbulos para mover sus núcleos de ácidos nucleicos y proteínas a los sitios de replicación intracelular, inmediatamente después de que hayan ingresado a la célula. Otros aprovechan los microtúbulos para mover su progenie viral recién ensamblada a la membrana plasmática facilitando así su propagación a las células y tejidos circundantes. Los virus también usan la red para transportar algunos componentes de ácidos nucleicos y proteína implicados en el ensamblaje del virión a ubicaciones celulares específicas o para mover viriones parcialmente ensamblados en etapas específicas de sus ciclos de replicación. Las cargas transportadas por la dineína están unidas al motor a través de su brazo, que consiste en una sección N-terminal de una o más cadenas pesadas y una serie de péptidos asociados. Los virus requieren un transporte activo a lo largo de los microtúbulos ya que la difusión de partículas de más de 50 nm de diámetro está restringida por la organización estructural del citoplasma. Los experimentos en los que se usaron agentes despolimerizantes de microtúbulos tales como colchicina, nocodazol o vinblastina, han demostrado que la integridad de los microtúbulos es esencial para la infección por virus (Merino-Gracia et al., 2011).

Estudios con dextran, sugieren que las moléculas menores a 500 kDa pueden difundirse libremente a través de la célula, mientras que los complejos mayores son inmóviles (Seksek et al., 1997). Como los virus varían en tamaño desde 20 a 500 nm (aproximadamente 2 a 6000 MDa), necesitan secuestrar el citoesqueleto para moverse a través de la célula. Los virus que más necesitan de la motilidad de la dineína son aquellos que tienen que llegar al núcleo o a la región perinuclear para replicarse (Dodding & Way, 2011). Algunos de estos virus pueden ser los que contienen un genoma de ADN bicatenario (ADNs) como el virus del herpes simple (VHS), el virus de la seudorrabia (PRV), los adenovirus y virus del papiloma, así

como los virus con un genoma monocatenario de ADN (ADNss), como el virus adenoasociado del parvovirus (AAV) (Castillo, 2014) y un circovirus (Cao et al., 2015). Algunos virus de ARN, como la gripe, también se replican en el núcleo y también requieren que la dineína se acumule cerca del MTOC (Lakadamyali et al., 2003). Los retrovirus transcriben de forma inversa sus genomas de ARN en ADN en el citoplasma antes de transferirlo al núcleo para su integración en el genoma del huésped. Algunos retrovirus, como el virus espumoso humano, se acumulan de manera dependiente de la dineína cerca del núcleo (Petit et al., 2003), para facilitar su proceso de replicación. Otros retrovirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), no se acumulan, aunque se ha propuesto que el VIH se mueva usando dineína (McDonald et al., 2002). Incluso algunos de los virus que se replican en el citoplasma necesitan de la dineína. Estos incluyen los virus de dsDNA de la familia de la viruela, incluidos el virus vaccinia y el virus de la peste porcina africana, que se replican en una fábrica perinuclear (Alonso et al., 2001). Un sitio de replicación perinuclear dependiente de dineína también es utilizado por algunos virus de ARN como los reovirus dsRNA (Mainou et al., 2013), el hantavirus ssRNA de sentido negativo (-ssRNA) (Ramanathan et al., 2007) y el flavivirus ssRNA de sentido positivo (+ ssRNA) DENV (Shrivastava et al., 2011).

2.12 Interacciones de la dineína

Como la interacción entre el dominio de unión a microtúbulos y los microtúbulos ya se ha descrito anteriormente en este documento, nos centraremos solo en el dominio del tallo. Son muchas las interacciones para que la dineína cumpla su función ortodoxa de transporte dentro de sus funciones celulares. Dentro del dominio del tallo, la cadena pesada tiene una alta capacidad de interacción principalmente consigo misma. (Habura et al., 1999). Su capacidad para formar multímeros parece darle estabilidad durante su función de transporte. Mediante cryo EM se ha determinado que las HC se unen al coiled coil BICDR1 y HOOK3 una vez ensamblado el complejo adaptador Dineína-Dinactina-adaptador de cargamento (Urnavicius et al., 2018). De la misma forma que a BICD2 (Urnavicius et al., 2015) la interacción del complejo se muestra en la figura 10.

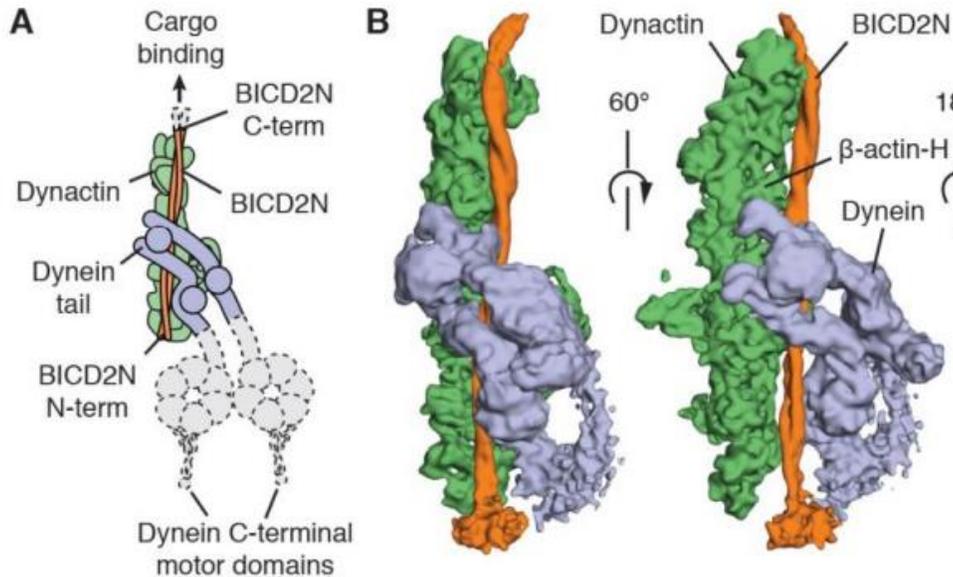


Figura 10. Interacción del complejo dineína-dinactina-adaptador de cargamento. En color morado se muestra la dineína en color verde la dinactina y naranja el adaptador de cargamento (Urnavicius et al., 2015).

Mientras tanto, durante un estado auto inhibido llamado partícula phi, la HC se une a tres sitios de contacto que son primero NDD, el segundo sitio de contacto resulta de la unión de Rob1 al terminal N extendido de IC y mantiene juntos los dominios IC WD40 del dímero de dineínas. Mientras que el tercer sitio de contacto de la HC, que no se había descrito anteriormente, está cerca de la LIC e implica una interacción directa entre los arreglos helicoidales 7 y 8 de la HC (Zhang et al., 2017). Mientras que las proteínas reguladoras de dineína, Lis1 y Nud1/Nudel parecen interactuar con el sitio AAA1 del dominio motor y con el IC del dominio del tallo (Żyłkiewicz et al., 2011).

En cuanto a la interacción entre la dineína y las proteínas virales, se ha observado que VP26 de VHS interactúa con las cadenas ligeras RP3 y Tctex1 de la dineína (Douglas et al., 2004) y se ha informado que la proteína del tegumento UL34 interactúa con la cadena intermedia de la dineína (Ye et al., 2000). También se ha observado que un péptido de la proteína UL9 puede interaccionar con la cadena intermedia (Martínez-Moreno et al., 2003). Aunque se conocen estas interacciones directas entre HSV y la dineína, aún no está claro si estas interacciones podrían

generar el movimiento retrógrado del virus (Lyman & Enquist, 2009), aunque se ha demostrado que se trata de una interacción directa (Döhner et al., 2002). En cuanto al virus de la pseudorrabia, se ha observado que la proteína VP1/2 inmunoprecipita con la cadena intermedia de dineína y la subunidad p150-glued de la dinactina (Zaichick et al., 2013). De igual manera se observó por inmunoprecipitación que el receptor celular para poliovirus CD155 interactúa con el Tctex-1 de la cadena ligera (Mueller et al., 2002). Estas interacciones son un ejemplo de la capacidad de la dineína para adaptarse a una nueva carga fuera de su ruta de transporte ortodoxa.

2.13 Virus transportados por motores moleculares

Se ha observado que el citoesqueleto celular tiene un estrecho contacto con las partículas del virus, lo que brinda soporte para los movimientos dentro de la célula para el transporte del patógeno hacia y desde la superficie celular a la región nuclear (Bearer & Satpute-Krishnan, 2002). Un signo de la interacción es el desempeño en la capacidad de infección y replicación viral que se ve afectada por la alteración del citoesqueleto (Cortese et al., 2017). La estrecha relación entre los virus y el citoesqueleto ha llevado a su análisis para comprender su relación con la célula huésped, así como el funcionamiento de algunos elementos del citoesqueleto en el ciclo de replicación viral.

Otro indicio de esta interacción es la disminución de la expresión y la desorganización del citoesqueleto de actina en células endoteliales humanas infectadas con el DENV (Kanlaya et al., 2009). Los microtúbulos y sus proteínas asociadas, como parte estructural del citoesqueleto, juegan un papel importante en el tráfico de partículas virales en las células huésped, incluido su papel como herramienta de transporte de viriones en las células infectadas.

Se ha demostrado que la despolimerización del citoesqueleto de actina en el proceso de infección inicial inhibe la infección por JEV en la célula. Sin embargo, la infección no se inhibió cuando se produjo la despolimerización en la última etapa de la infección. Como resultado, la infección por JEV en células IMR32 requería actina para facilitar el proceso de infección temprana y la red de microtúbulos, por lo que

el citoesqueleto se usa como sistema de transporte al sitio de replicación del virus y la liberación del virus maduro (Henry Sum, 2015).

Por otro lado, se ha observado que la pE del DENV utiliza a la dineína para su tráfico interno retrógrado; en esa investigación se sugirió que las proteínas E recién sintetizadas se trafican al sitio de ensamblaje y se disocian del motor de la dineína a medida que continúa la infección. Esto se investigó mediante la interrupción de la actividad motora de dinamina por dinamita, observándose que la expresión de pE y C de DENV 2 se ve afectada posteriormente (Shrivastava et al., 2011).

Fuera del dominio flavivirus, hay muchos más ejemplos de la interacción entre virus y el citoesqueleto. Durante una infección con un virus del herpes, el virus usa microfilamentos para ingresar a las células y viajar al núcleo a través de los microtúbulos; el ADN viral se replica con la ayuda de los microfilamentos del huésped; y las partículas virales comienzan a ensamblarse con una cápside en el citoplasma antes de partir (Wu et al., 2019). La relación entre el virus del herpes y la dineína ha sido determinada por diferentes autores. Ye et al. 2000 utilizaron la isoforma neuronal de la cadena intermedia (IC-1a) del complejo dineína derribada, a partir de lisados de células infectadas marcadas con [³⁵S] metionina, dos proteínas virales identificadas como los productos de los marcos de lectura abiertos de UL34 y UL31, respectivamente. La proteína UL34 es una proteína de virión asociada a las membranas celulares y fosforilada por la quinasa viral US3. La proteína UL31 es una fosfoproteína nuclear dispersada uniformemente, en gran parte insoluble, necesaria para el procesamiento y empaquetamiento óptimos del ADN viral en cápsides preformadas (Ye et al., 2000). En este caso la interacción entre las proteínas virales y la dineína parece ser directa.

Otro ejemplo es el virus de la rabia donde la infección induce la despolimerización de los microtúbulos, de esta manera la síntesis de ARNv se verá afectada por la polimerización y despolimerización de los microtúbulos (Zan et al., 2017). Existen diferentes reportes de virus que dependen de la dineína para su transporte, tales como; el adenovirus, el Hexon, una proteína principal de la cubierta, fue la única de las cinco proteínas candidatas de la cápside que demostró interactuar

bioquímicamente con la dineína citoplasmática. Hexon interactuó específicamente con dos subunidades de dineína, IC y LIC1, que residen dentro de la cola citoplasmática de dineína y participan en la unión de dineína a formas fisiológicas de carga. Los IC, en particular, interactúan tanto con el complejo dinactina como con NudE. Los resultados de los experimentos de inyección de anticuerpos y de los esfuerzos preliminares para mapear el sitio de unión del hexón dentro del IC sugieren que la unión del hexón se realiza a través de una región única del IC. La interacción de hexon con más de una subunidad de dineína es inusual y sugiere una interacción potencialmente cooperativa con múltiples sitios en la superficie del complejo de proteína motora. Una característica inusual de la interacción virus-dineína es su activación por exposición de las proteínas del virus a un pH bajo. Este comportamiento está muy en consonancia con los efectos del entorno endosomal ácido en la composición del virus y en la conformación de las subunidades constituyentes (Scherer et al., 2020).

Se ha demostrado que los virus no solo pueden interactuar con la dineína, sino también con el complejo dineína/dinactina/adaptador de carga. Carnes et al., documentaron que BICD2 interactúa directamente con la cápside viral. Observaron una asociación de BICD2 celular nativo con los ensamblajes CA de la proteína de la cápside in vitro, y BICD2 recombinante purificado también se unió a los ensamblajes. Informaron que las regiones N-terminal y C-terminal de BICD2 interactuaban con los ensamblajes de la cápside del VIH-1. Dado que el sitio N-terminal normalmente no estaría disponible para la unión hasta que la carga esté unida, es posible que la cápside del VIH-1 secuestre un complejo abierto de BICD2 unido a una carga celular a través de su dominio C-terminal. Estos nuevos datos indican que la proteína adaptadora BICD2 es importante para la infección por VIH-1. Estas observaciones sugirieron que BICD2 vincula la cápside viral al complejo dineína (Carnes et al., 2018).

En un trabajo muy interesante, Luthra et al. muestran que el virus del ébola VP35 interactúa con la cadena ligera de la dineína citoplásmica (LC8), pero las consecuencias funcionales no están claras. Demostraron que la interacción es

directa y de alta afinidad y que la unión estabiliza el dominio de oligomerización N-terminal de VP35 y mejora la síntesis de ARN viral. El análisis mutacional demuestra que se requiere la interacción de VP35 para los efectos funcionales de LC8 (Luthra et al., 2015).

Aún existen más ejemplos de interacciones entre la dineína y diferentes virus, como, por ejemplo, el virus de la hepatitis B, C, E (Boulant et al., 2008; Kannan et al., 2009; Kim et al., 2007), el virus del papiloma humano (Florin et al., 2006), el poliovirus (Mueller et al., 2002), el VIH-1 (Caly et al., 2016), y el virus de la influenza A (Banerjee et al., 2014); (Milev et al., 2018; Reck-Peterson et al., 2018). La estrecha relación entre el ciclo celular y el citoesqueleto es clara y es materia de estudio ya que puede ser clave en el control de diferentes enfermedades virales.

3. Antecedentes directos

3.1 ZIKV y su interacción con el citoesqueleto

Se ha observado que el citoesqueleto de las células tiene estrecho contacto con las partículas virales, de igual manera que el desempeño en la capacidad de infección y replicación viral se ve afectado por la alteración del citoesqueleto. Esto dio lugar a estudios en los que los virus se utilizaron como herramientas para comprender su relación con la célula huésped, así como el funcionamiento de algunos elementos del citoesqueleto durante la entrada del virus, además del tráfico intracelular y el proceso de ensamblaje viral. Otro indicio de esta interacción es la desorganización del citoesqueleto promovida por la infección por el DENV, lo que ha generado un nuevo auge en el estudio de este patógeno para comprender la causa de este trastorno. Los microtúbulos y sus proteínas asociadas, como parte estructural del citoesqueleto, juegan un papel importante en el tráfico de partículas virales en las células huésped, incluido su papel como herramienta de transporte de viriones en las células infectadas. Un ejemplo de esto es que los microtúbulos sirven como una vía bidireccional entre los orgánulos celulares, y la interacción de la poliproteína viral JEV con los microtúbulos conduce al transporte intracelular de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi durante la replicación de JEV (Dodding & Way, 2011). Durante el estudio de algunos motores moleculares,

en asociación con microtúbulos, como la dineína, se ha encontrado que las cápsides virales utilizan el sistema de transporte dineína-microtúbulos para su movimiento dentro de la célula.

Aunque existen diferentes estudios que demuestran que la interacción de la dineína humana con algunos virus es necesaria para el progreso de la infección viral, no debemos tomar como obvio el mecanismo que utiliza el ZIKV para su tráfico celular interno. Ya que existen pocas investigaciones que propongan una interacción directa de proteínas virales con dineína. Ye et al., observaron que tras la entrada del Herpes Simplex Virus 1 en las células, la proteína UL 34 queda expuesta, interactuando con el motor de la dineína y empleando la red de microtúbulos para el transporte retrógrado de la estructura del tegumento desde la cápside hasta el poro nuclear (Ye et al., 2000). Por tanto, la caracterización de dicha interacción es de vital importancia ya que, si bien se ha descrito un antecedente para la hipótesis de esta investigación, es necesario un claro entendimiento de la relación molecular entre este flavivirus y la dineína. Otro ejemplo de interacción directa con la dineína es el propuesto por Raux et al., donde las cápsides del virus de la rabia pueden unirse a los microtúbulos y utilizar la dineína para su transporte a través de las células neuronales, proceso que puede estar mediado por la interacción de la proteína P del virus de la rabia con la cadena ligera de la dineína (Raux et al., 2000). Finalmente, existe otra referencia a este dentro de la familia de los flavivirus y la de Shrivastava, donde se propone una interacción directa de la PE del DENV con la dineína (Shrivastava et al., 2011). El estudio de la interfase virus-dineína no canónica nos proporcionará información importante sobre los mecanismos generales de reclutamiento y regulación de la motricidad por cargas celulares. Además de esto, también puede ayudar a facilitar el desarrollo de herramientas terapéuticas con la capacidad de inhibir específicamente el transporte viral sin prevenir la interacción de los motores con sus cargas celulares. Pero al igual que otros flavivirus, se cree que la proteína C cargada negativamente es ARN genómico de polaridad positiva recién sintetizado. La proteína de la cápside es una proteína multifuncional, ya que además de unirse al ARN viral en el proceso de ensamblaje de la nucleocápside, también juega un papel importante en los procesos de

infección del virus al interactuar con las proteínas celulares, modulando el metabolismo celular, la apoptosis y la respuesta inmune (Shang et al., 2018). Posteriormente, el complejo C-vRNA se fusiona con la cara citoplasmática de la membrana del RE que contiene los heterodímeros prM-E, en este momento la proteína C juega un papel muy importante en el ensamblaje del virión, ya que de ella dependerá la estructura cuaternaria viral y su orientación en relación con la membrana lipídica, el ARN genómico y sus interacciones con las regiones transmembrana de las proteínas de superficie (Tan et al., 2020). La formación de partículas virales inmaduras en la luz del retículo endoplásmico, no son infecciosas y miden aproximadamente 60 nm. El ZIKV inmaduro tiene 3 heterodímeros prM-E que se unen y se proyectan hacia el exterior del virus, desde la membrana con el asa de fusión distal de la pE en su vértice. El dominio pr de la glicoproteína prM se coloca encima de este pico y cubre el circuito de fusión, evitando la fusión prematura de la pE mediada por un pH bajo (alrededor de 6.7). Esta partícula puntual del virus inmaduro es glicosilada en el RE para luego ser transportada a la red de Golgi y Trans-Golgi (TGN), donde se cortan estas glicosilaciones y el medio se vuelve aún más ácido, con un pH en torno a 5.5. A este pH del TGN, ZIKV inicia un reordenamiento del trímero prM-E, de modo que los homodímeros de pE se colocan paralelos a la membrana. Este reordenamiento expone el sitio de división para que la furina del huésped actúe en la unión pr-M, y puede ocurrir una división que hará madurar el virus. Una vez escindido, el dominio pr permanece unido al extremo distal de la pE hasta que la partícula se libera en un entorno de pH neutro de alrededor de 7.0 en el medio extracelular (Tan et al., 2020).

3.2 Algunas similitudes entre el ZIKV y DENV

La comparación de la estructura del ZIKV con otros flavivirus como el DENV y el WNV ha sido la principal base para el estudio detallado de la virología y patogénesis del ZIKV. Una de las proteínas que más se han comparado entre distintos flavivirus es la pE, la cual ha demostrado tener un sitio de glicosilación conservado necesario para la patogenicidad de estos virus (figura 11A). Las diferencias entre los residuos de aminoácidos que rodean a este sitio modulan la sensibilidad de ZIKV a anticuerpos que se unen a los epítopos en el bucle de fusión (figura 11C). Además,

esta región también es necesaria para la unión a los receptores de lectina celular, estas pequeñas diferencias entre la pE del ZIKV y otros flavivirus generan el tropismo celular y contribuyen al progreso de la enfermedad (Sirohi & Kuhn, 2017). Por otro lado, cuando alineamos la secuencia de aminoácidos de las proteínas del envoltorio del ZIKV y el DENV, obtenemos un porcentaje de identidad del 58 % (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), lo que nos indica una gran identidad entre ellas. También, es necesario remarcar la gran similitud estructural que existe entre los modelos de ambas proteínas, como podemos observarlo en la figura 11B. Con estos datos, podemos entender la similitud que existe entre ambas estructuras y de esta manera sentamos las bases de nuestra investigación entendiendo que si la pE del DENV puede interactuar con la dineína humana es muy probable que la pE del ZIKV realice esta misma interacción con la dineína humana, lo que nos da un antecedente básico para la caracterización del tráfico interno celular del ZIKV.

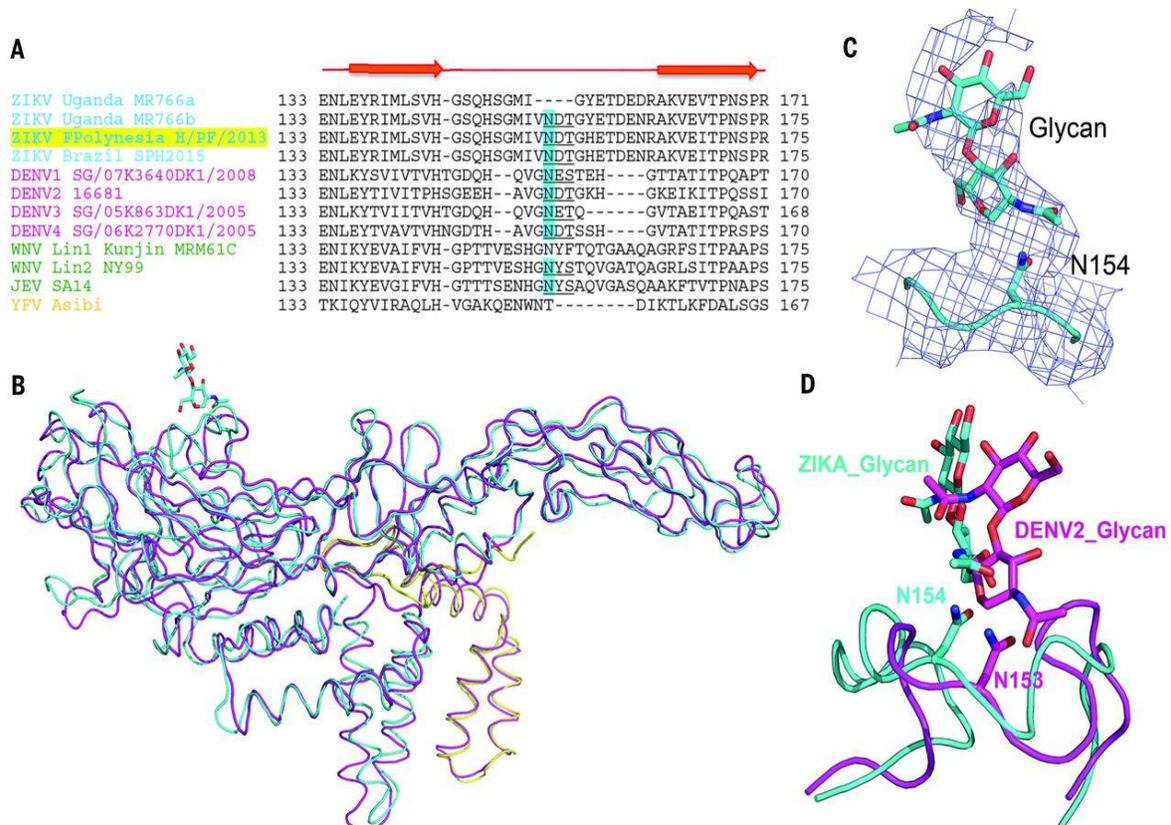


Figura 11. Comparación de la pE del ZIKV y otros flavivirus. A) Alineación de una región de 40 aminoácidos del dominio 1 de la pE, centrado el sitio de glicosilación Asn154 de distintas cepas de ZIKV también se alinearon otros flavivirus representativos transmitidos picaduras de mosquitos. El

sitio de glucosilación conservado en Asn153 / 154 se resalta en azul. Las flechas rojas representan estructuras secundarias de ZIKV. Las secuencias para diversos flavivirus se obtuvieron a partir de la Base de Datos de Patógenos de Virus y el Recurso de Análisis (ViPR). Las secuencias se alinearon manualmente en base a las estructuras de ZIKV y DENV2. B) se muestra la superposición de la cadena principal C α de las proteínas ZIKV y DENV 2 E y M. Las proteínas DENV 2 se muestran en magenta, mientras que la proteína ZIKV E se muestra en cian y la proteína M en amarillo. C) Se observa la nube de electrones que representa la glicosilación en Asn154. D) Es la superposición de la región del bucle que rodea el sitio de glicosilación (ZIKV: 144-166; DENV2: 144-161) para ZIKV (cian) y DENV2 (magenta) DENV2-E (PDB:1OKE), WNV-E (PDB:2HG0), ZIKV-E (PDB: 5JHM) (Sirohi & Kuhn, 2017).

3.3 Tráfico del retrogrado del DENV-2

Shrivastava et al., demostraron que el tráfico mediado por dineína era esencial para la replicación de DENV-2. Por medio de análisis inmunohistoquímicos, observaron como la dineína se asoció con la pE en el citoplasma durante las primeras 4 horas posteriores a la infección, y hasta las 48 horas en la región perinuclear, con una disociación a las 72 horas. La asociación de pE con dineína se corroboró mediante inmunoprecipitación. Al mismo tiempo, realizaron la detección de la pE entre las primeras 4 a 8 horas correlacionando con un aumento detectable en el ARN viral a partir de las 8 horas. La disociación de la dineína con la pE en 72 h coincidió con la liberación máxima del virus, lo que sugiere una posible retroalimentación negativa para la traducción de la proteína viral. Por último, concluyeron que los viriones obtienen la entrada a través de la endocitosis asistida por dinamina II (una subunidad del complejo dineína-dinactina), y que una vez dada la asociación del virión con la maquinaria celular, el virión se transloca de la periferia celular a la región perinuclear (PN) dentro de los endosomas. (Shrivastava et al., 2011).

JUSTIFICACIÓN

El ZIKV produce una serie de síntomas, dentro de estos los más graves son el síndrome de Guillain-Barré y la microcefalia. Debido a esto, las infecciones ocasionadas por este virus se han convertido en un problema de salud global. Dado que no existe tratamiento específico para eliminar o inhibir la infección de este patógeno, es necesario entender a profundidad sus mecanismos de infección. Entonces, es de gran interés encontrar interacciones entre moléculas humanas y virales para reducir la probabilidad de la generación de resistencia. En este trabajo, estudiaremos la interacción directa entre la proteína E del ZIKV y la dineína.

HIPOTÉISIS

Existe una interacción directa entre la proteína del envoltorio del ZIKV y la dineína, esta interacción es fundamental en el ciclo de replicación viral.

OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la interacción directa entre el ZIKV y la dineína durante el ciclo de replicación viral.

6.2 Objetivos específicos

1. Comprobar que durante el ciclo de replicación viral la proteína E y la dineína se encuentran a distancia de interacción.
2. Determinar la interacción entre las proteínas recombinante N-terminal de la cadena pesada de la dineína (NTDyn) y partículas virales del ZIKV.
3. Determinar la interacción entre las proteínas recombinante N-terminal de la cadena pesada de la dineína (NTDyn) y la pE del ZIKV.
4. Encontrar la región mínima de interacción entre la dineína y el ZIKV.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Ensamble *in vivo*

El novedoso sistema de ensamble *in vivo* ofrece una alternativa económica y rápida en comparación con las metodologías clásicas de clonación utilizadas para sintetizar proteínas recombinantes. Este sistema permite la subclonación, inserción, delección y mutagénesis dirigida, con únicamente el producto de PCR y una cepa bacteriana competente. Utilizando una vía de recombinación por homología independiente de RecA se logra el ensamble del plásmido y el gen deseado, evitando el uso de enzimas de restricción, ligasas o kits que pueden llegar a tener un alto costo, además se reduce el tiempo utilizado para la técnica (García-Nafría et al., 2016). Utilizando esta técnica realizamos una construcción subclonando la secuencia completa de la proteína E a un plásmido pRSET el diseño se muestra en la figura 10. Como resultado de estos experimentos obtuvimos una baja sobreexpresión de la proteína, por lo que decidimos, hacer algunas modificaciones a la construcción, buscando obtener un mejor rendimiento.

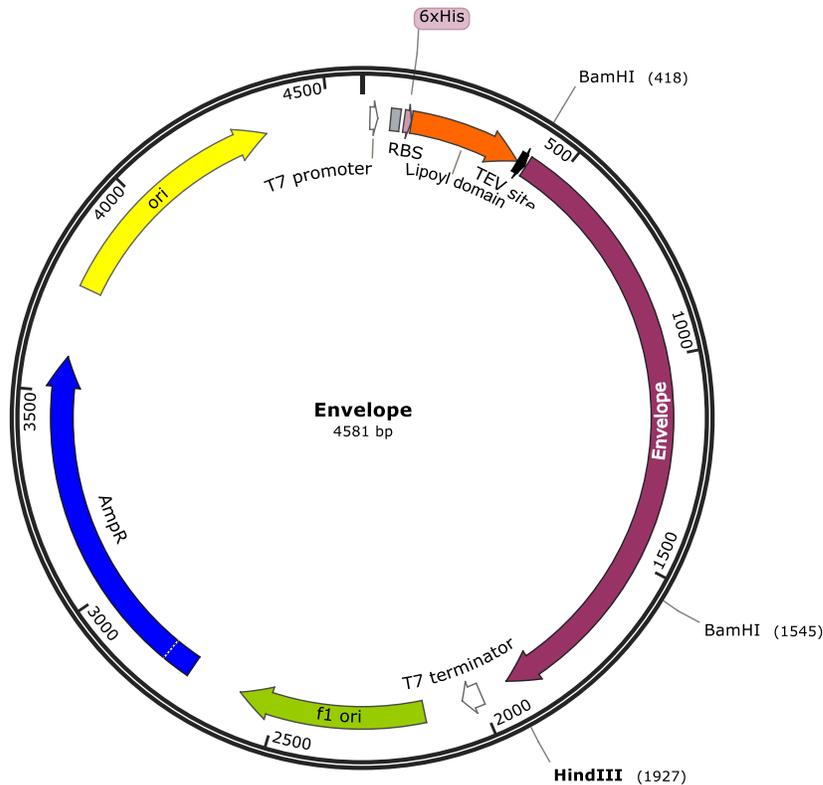


Figura 12. Diseño del plásmido pRSET-pE. Se muestra un diagrama con la secuencia de la construcción, en color morado la secuencia del gen, color amarillo el sitio de origen de replicación, color azul el gen de resistencia a ampicilina, color verde f1 ori, color rosa 6xHis, color blanco el promotor y terminador T7, color naranja dominio lipoil, color negro sitio de corte de la proteasa TEV.

7.2 Estructura del plásmido de la proteína pE 409

Una vez comprobada la baja expresión de la pE, decidimos escindir el dominio transmembranal (Lianpan, 2016). Este dominio se escindió por medio de la técnica de delección (García, 2016) con oligonucleótidos que formaran secuencias recombinantes, durante la reacción de PCR estos oligonucleótidos forman un bucle que no sería amplificado en los siguientes ciclos de la reacción eliminando la secuencia del dominio transmembranal (Figura 13A). A continuación, en la figura 13B, se muestra el diseño del plásmido pE-409, en esta secuencia se mantuvieron la bandera de histidinas, el dominio lipoil y el sitio de corte de la proteasa TEV, además de los sitios de corte de nucleasas BamHI y HindIII, la secuencia del plásmido se redujo de 4599 pares de bases a 4308 pares de bases.

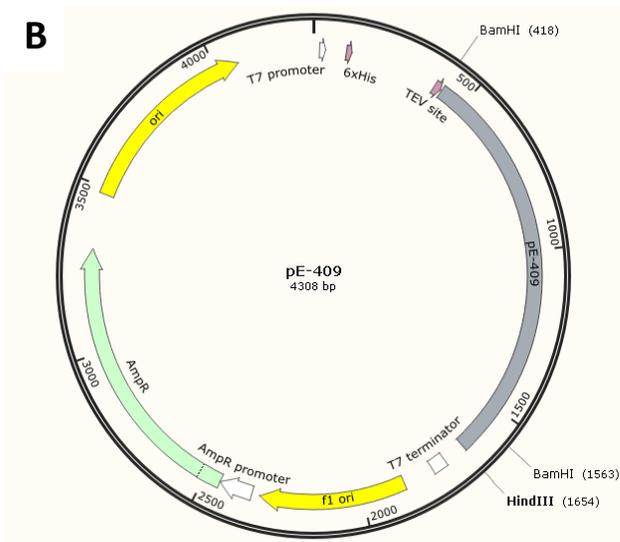
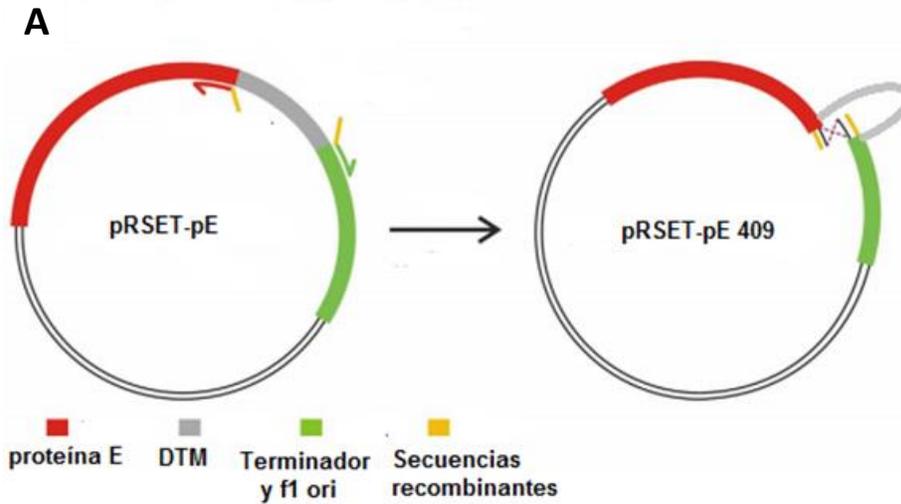


Figura 13. Esquema de escisión del DTM y diseño del plásmido pE-409. En el panel A se muestra el esquema de la deleción, en color gris se muestra el bucle formado por los oligonucleótidos que recombinaran entre ellos (color amarillo) (imagen modificada de García, 2016). En el panel B se muestra en color gris el inserto acortado en el plásmido pRSET.

7.3 Secuencias y oligonucleótidos

Los plásmidos que codifican para las diez proteínas que conforman al ZIKV, optimizadas para su expresión con el uso de codones en *E. coli* fueron amablemente donadas por el Dr. Glaucius Oliva de la Universidad de Sao Pablo, Brasil. Se realizó la subclonación de nuestros genes en el vector de expresión pRSET (A) (Schoepfer R, 1993), mediante la técnica *in vivo* assembly (IVA) (García-Nafría et al., 2016). Para subclonar estos insertos, se diseñaron cuatro oligonucleótidos que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos de la construcción PrSET-Envoltorio. Para amplificar la secuencia del inserto se utilizó el primer sentido (FZE), y el primer anti-sentido (RZE), para amplificar la secuencia del plásmido se utilizó el primer sentido (FZpE), y el anti-sentido (RZpE).

Nombre del primer	Secuencia 5' a 3'
FZE	GTGGATCCGATATGATCCGCTG
RZE	CAAGCTTGATTGCGCTAACTGC
FZpE	GCGCAATCAAGCTTGATCCGGCTG
RZpE	GATCATATCGGATCCACCCTGGAAG

7.4 Reacción de PCR

La reacción de PCR se realizó con; 5 μ L de 5X Phusion GC Buffer, 0,5 μ L 10 mM dNTPs, 1,25 μ L 10 μ M primers sentido, 1,25 μ L 10 μ M primers anti-sentido, 200 ng templado, 0,25 μ L Phusión Polymerase. Finalmente, se ajustó a 25 μ L con H2O libre de nucleasas. Se utilizó un gradiente de cinco de 70 °C a 5 °C. El diagrama de la PCR se muestra en la figura 14. El resultado se analizó por medio de un gel de agarosa al 0.8 %.

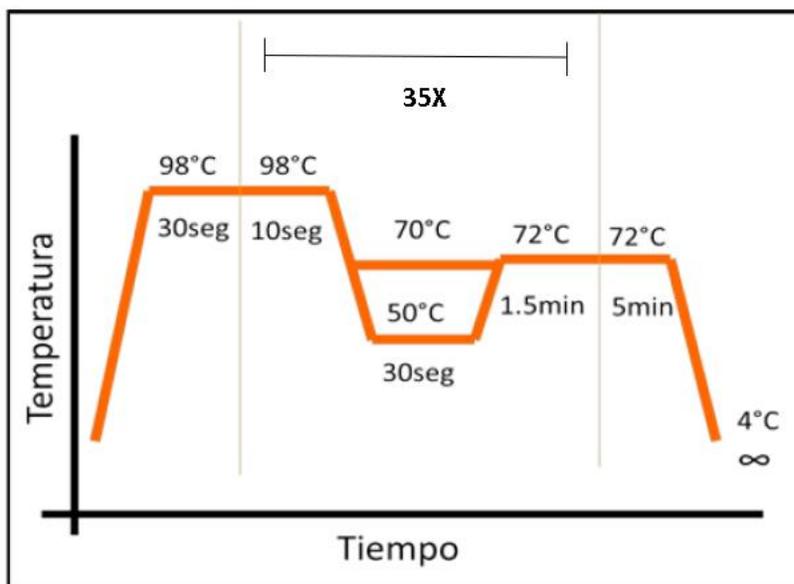


Figura 14. Temperatura de estandarización de la PCR.

La primera temperatura de la izquierda es la temperatura de desnaturalización, seguida se esta se encuentra el gradiente, y posteriormente esta la elongación, se realizaron 35 ciclos.

7.5 Digestión con DpnI

Una vez amplificado tanto el plásmido como el inserto ambas muestras deben ser tratadas con la enzima DpnI (NEB) esta es una enzima de restricción que corta el ADN metilado, por lo que es útil para degradar el ADN templado de la muestra (Johnston et al., 2013). Esta digestión se realizó con; 16 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de 10X de buffer Tango, 1 μL de ADN templado (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.5 μL de DpnI. Finalmente se incubó durante 2 h a 37 °C.

7.6 Transformación

Para esta técnica se utilizó el amplificado del inserto y el amplificado del plásmido, estos fueron mezclados en tres relaciones de concentración distintas; 1:1, 1:3 y 1:5 con 100 μL a una D.O. de 1.5, para transformar células de la cepa Top 10 de *E. coli*. Se incubaron las mezclas con las diferentes relaciones inserto:plásmido durante 30 minutos en hielo, para continuar con un choque térmico a 42 °C por 35 s, seguido de una incubación de 2 min más en hielo, posteriormente se agregó 400 μL de medio SOB y se incubó durante una hora en agitación a 37 °C, seguido de una centrifugación a 14000 rpm durante 2 min para retirar el sobrenadante y conservar la pastilla que fue resuspendida y sembrada en una caja Petri con agar y medio LB con ampicilina, finalmente se incubó durante toda la noche a 37 °C. Una vez obtenidas algunas colonias se les realizó la extracción del ADN por lisis alcalina y se verificó que los plásmidos obtenidos de estas colonias tuvieran sitios de corte con enzimas de restricción XbaI, HindIII y HinfI, estos sitios se muestran en las figuras 16 y 18. Además, a los mismos plásmidos se les realizaron PCR utilizando los primers que amplifican el inserto y el vector deseado, los resultados se analizaron mediante geles de agarosa al 2 %. Es necesario señalar que solo se trabajó con los plásmidos que dieron positivo en ambas pruebas, tanto a la prueba de enzimas de digestión como a la prueba de amplificación.

7.7 Macro cultivos

Los macro cultivos parten de una colonia de *E. coli* SoluBL21 transformada con el plásmido deseado, con estas colonias se inocularon 10 mL de medio 2XYT con 100 µg de ampicilina, estos se incubaron durante toda la noche a 37 °C, para posteriormente inocular con ellos 500 mL de medio 2XYT con 50 mg de ampicilina, a 37 °C hasta alcanzar una D.O. de 0.6-0.9, una vez alcanzada se realizó el estímulo con 500 mL de medio 2XYT, 1 mL de IPTG 1 M, 1 mL de MgSO₄, para incubar toda la noche a 37 °C, finalmente se centrifugaron a 4000 rpm durante 40 min para desechar el sobrenadante y conservar el pellet a -80 °C.

7.8 Purificación de la proteína del envoltorio

La proteína del envoltorio se expresa en forma de cuerpos de inclusión (IB) y estos deben de ser lavados y solubilizados previamente a la purificación. Una vez cosechado el cultivo se sonicó a una amplitud del 40 % con intervalos de 5 s de sonicación y 35 de descanso durante 4 min en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 9.0, NaCl 100 mM, PMFS 1 mM, DTT 1 mM) y se centrifugó a 5000 xg por 10 min, después los cuerpos de inclusión se homogenizaron dos veces con cada uno de los siguientes buffers de homogenización A (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Tritón X100 2 %, urea 2 M), B (Tris 50 mM pH 8.0, DTT 1 mM, Guanidina 1M), C (Tris 50 mM pH 8.0, DTT 1 M, Guanidina 1 M), D (Tris 50 mM pH 8.0) posteriormente los IB se solubilizaron con buffer de solubilización (Tris 50 mM (pH 8.0), urea 8 M, beta mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, Bezamidina 1 mM), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente la muestra se ultra centrifugó a 165000 xg por 45 min, y se inyectó en una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 GE, previo a la inyección se aplicó un gradiente de urea 8 M de 0.2 volúmenes de columna, en la columna equilibrada con buffer de replegamiento (Tris 50 mM pH 9,0, L-Arg HCl 400 mM, NaCl 200 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 1 mM, y glicerol al 5 %), la muestra se concentró y se inyectó una segunda vez en un columna superdex 200 10/300 Increase (GE Healthcare) equilibrada con PBS 1X. pH 7.4.

Finalmente, los resultados se analizaron por SDS-PAGE 8% observándose una banda que corresponde con el peso molecular esperado.

7.9 Purificación de la NTDyn y NDD

Los residuos de cadena pesada de dineína 1-560 (NT-Dyn) y 1-201 (NDD) se expresaron por separado en la cepa de *E. coli* SoluBL21. Ambos con etiqueta His6 N-terminal y sitio de escisión de proteasa TEV en el plásmido pRSET. Las dos proteínas utilizan el mismo protocolo para su purificación. Una vez expresadas, las células se sonicaron (procesador ultrasónico de 500 W Cold Palmer CV334), con ciclos de pulso-reposo de 5-35 segundos durante 3 minutos al 50 % de potencia con buffer A (Tris 30 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, imidazol 25 mM, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, beta-mercaptoetanol 1 mM). A continuación, el lisado celular se ultracentrifugó a 165 000 xg durante 30 min a 4 °C; el clarificado se filtró con membrana de 0.22 µm y luego se aplicó a una columna HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare) y se eluyó con buffer B (Tris 30 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, imidazol 500 mM, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, beta-mercaptoetanol 1 mM). La proteína eluida se desaló con una columna de desalinización (HiPrep 26/10 GE) y se digirió durante 18 h a 4 °C con la proteasa TEV. La etiqueta His6 eliminada y la proteasa TEV se unieron a la columna de afinidad HisTrap y la proteína E eluyó en el paso de lavado. Las fracciones se concentraron a 500 µL mediante concentradores Amicon Ultra 15 con un corte de 30 kDa y se aplicaron a una columna de filtración de gel Superdex 200 10/300 Increase (GE Healthcare). Las fracciones que contenían NTDyn se combinaron y concentraron a 10 mg/mL.

7.10 Interacción NTDyn-ZIKV en columna IMAC

His6-NT-Dyn purificado se unió a HisTrap HP 1 mL previamente equilibrado con buffer fosfato salino (PBS1X) pH 7.4 y luego se lavó con 5 mL del mismo buffer). Las partículas virales 24 h p.i. purificadas se inyectaron a través de la columna y posteriormente eluyó con 5 mL de buffer de elución (Tris 30 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, imidazol 500 mM, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, beta-

mercaptoetanol 1 mM). Después de la elución, las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE.

7.11 Ensayos de retardamiento

Con el fin de ubicar la zona de interacción, se realizaron tres experimentos diferentes, el primero fue la inyección de las proteínas NTDyn y E estas se inyectaron individualmente y después de la incubación de ambas proteínas en una proporción de 1:1 para permitir la interacción. El segundo experimento consistió en inyectar juntas y por separado las proteínas NDD y E. Mientras que para el tercer experimento se inyectaron los complejos NTDyn-Anti NDD, NTDyn-Anti NTDyn además de la incubación entre el complejo NTDyn-Anti NDD y E. Los experimentos se realizaron utilizando una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer PBS 1X pH 7.4. a temperatura ambiente a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones de resultados se analizaron en el cromatograma con respecto al volumen de salida y por SDS-PAGE.

7.12 Far western blot NTDyn-E proteína recombinante

Se analizaron cinco líneas de proteína E recombinante purificada y una de NTDyn mediante SDS-PAGE al 12 % durante 80 min a 100 V (Mini-Protean Cell; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se transfirieron a membranas de PVDF (BIO-RAD) se llevó a cabo a 120 V durante aproximadamente 2 h). Las membranas se bloquearon con PBS-Tween-5 % de leche descremada durante una hora y luego se lavaron cuatro veces con PBS-Tween. A continuación, las membranas se incubaron dos horas con 0, 10, 100, 1000 µg de NTDyn durante 120 min a TA con 1X PBS. Luego, las membranas se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios pAb anti-HCa 4 °C. Después de esta incubación, las membranas se lavaron nuevamente con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (Invitrogen) durante una hora. Después de otra ronda de 4 lavados con PBS-Tween, las membranas se revelaron en presencia del reactivo revelador de quimioluminiscencia (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent Cytiva) y se digitalizaron con Amersham Imager 600 System GE Healthcare.

7.13 Colocalización de la dineína y la proteína del envoltorio

Se sembraron células Vero un día antes de la infección a una concentración mínima de 1×10^5 células / mL en matraces de cultivo celular. Las células se infectaron con la cepa ZIKV MR766 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. La adsorción se llevó a cabo durante 1 h a 4°C para evitar la entrada de virus y sincronizar la infección de las células. Las células se lavaron dos veces con medio frío para eliminar el virus no unido. Los cultivos se tomaron a las 24, 12 y 8 h p.i. en condiciones estériles, se lavaron con PBS 1X pH 7.2 (PBS) y se fijaron en acetona helada durante 10 min a -20°C . Las células fijadas se lavaron con PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) en PBS durante 30 min. Los anticuerpos primarios contra ambas proteínas (pAb anti-HC casero y pAb anti-E Invitrogen) se agregaron simultáneamente a las células y se incubaron durante 1 h seguido de un lavado con PBS. Esto fue seguido por la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con sondas fluorescentes añadidas simultáneamente, Alexa 488 o Alexa 594. Se usó DAPI (4', 6' diamino-2-fenilindol) para teñir el núcleo en todos los experimentos. Al final del proceso de tinción, los cubreobjetos se lavaron y se montaron en portaobjetos. Las células de control, que no fueron infectadas pero sometidas a los mismos procedimientos, se incluyeron en todos los experimentos como cultivos infectados simulados (mock). Las laminillas fueron observadas en un microscopio confocal (Zeiss LSM 800). Los resultados fueron analizados con el programa ImageJ.

7.14 Cinética de expresión de proteínas de envoltura y dineína.

Con el fin de analizar la sobre expresión de la dineína y la pE, se infectaron células Vero con una confluencia del 80 % con ZIKV a una MOI de 5. Se realizaron cinéticas de infección a las 8, 12 y 24 h. Se usaron como controles células Vero no infectadas y células Vero-tratadas con virus inactivado por calor (Mock). A continuación, las células se lisaron con buffer RIPA (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, Triton X-100 al 2 %, NaCl 150 mM, KCl 0,6 M, EDTA 5 mM) en presencia del coctel inhibidor de proteasas por 25 mL (Completo, Invitrogen). Los lisados celulares se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 % durante 80 min a 100 V (Mini-Protean Cell; Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) a 120 V durante aproximadamente 2 h). Las membranas se bloquearon con PBS-Tween-5 % de leche durante una hora y luego se lavaron cuatro veces con PBS-Tween. Luego, las membranas se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios a 4 °C. Después de esta incubación, las membranas se lavaron nuevamente con PBS 1X y se incubaron con HRP secundario acoplado (Invitrogen) durante una hora. Luego de otra ronda de 4 lavados con PBS-Tween, las membranas fueron reveladas en presencia del reactivo revelador de quimioluminiscencia (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el kit ChemiDoc (BIO-RAD) y digitalizadas con el ChemiDoc XRS System (BIO -RAD).

7.15 Ensayo de proximidad de ligandos

Se sembraron células Vero un día antes de la infección a una concentración mínima de 1×10^5 células por mL en cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos. Las células se infectaron con ZIKV (cepa MR766) a una MOI:1. Luego se fijaron con formaldehído al 4 % 10 min a las 8, 12, 18, 24 y 48 h p.i. Después, el cultivo celular se lavó con buffer de lavado (PBS Tween al 0.1 %) y se permeó con PBSTween al 0.2 % durante 10 min. Una vez eliminado el buffer de permeabilización, las muestras se bloquearon con buffer de bloqueo (albúmina sérica bovina al 5 % BSA en PBS) durante 1 hora a 37 °C, se continuó con el lavado y la incubación con los anticuerpos primarios con dilución 1:100 durante la noche a 4 °C con buffer de bloqueo. Las células infectadas simuladas (Mock) incubadas con anticuerpos primarios y las células infectadas incubadas sin el Mab anti-E se analizaron en paralelo como controles negativos. Al día siguiente, se lavaron las muestras y se agregaron las sondas PLA en una dilución 1:5 con buffer de bloqueo y se dejó reposar la solución durante 1 h a 37 °C en una cámara humidificada. Luego, la muestra se lavó y se agregó la mezcla de ligadura (6 μ L del buffer de ligadura concentrado con agua para un volumen de reacción total de 30 μ L y 1 μ L de ligasa) y se incubó 30 min a 37 °C. Luego, la muestra se lavó y se agregó la mezcla de amplificación (6 μ L de buffer de amplificación concentrado con agua para un volumen de reacción total de 30 μ L y 0.5 μ L de polimerasa) y se incubó 100 min a 37 °C. Una vez aspirada la mezcla de

amplificación, las células se lavaron con buffer de lavado B y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos durante 10 min con agitación suave. A continuación, se repitió el lavado solo con buffer B y una vez con 0.01x de buffer de lavado B durante 1 min. Finalmente, las muestras fueron montadas y analizadas en microscopio confocal (Zeiss 700).

7.16 Inmunoprecipitación E-Dineína

Se sembraron células Vero un día antes de la infección a en matraces de cultivo celular. Las células se infectaron con la cepa ZIKV MR766 a una MOI de 5, 24 hrs después se removió el medio y se entrecruzó con formaldehído al 1%, y se incubó durante 10 min a 37°C, se removió entrecruzador lavando dos veces con PBS 1X frío. Y se incubaron las células con buffer RIPA durante una hora en hielo y agitación, posteriormente se centrifugó la muestra a 13000 xg por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se toman 20 µL de perlas imantadas y se lavan cuatro veces con solución A (Tris HCL 25mM pH7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM, Tritón X100 0.1%). Se adicionaron 10 µL de Anticuerpo (Anti-E, 4G2) y se incubó en agitación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se adicionó el sobrenadante de los lisados celulares y se incubó la muestra durante toda la noche a 4°C. Después las perlas magnéticas fueron recuperadas utilizando el magneto y se lavaron cuatro veces con solución de lavado B (Tris HCl 25 mM pH7.5, NaCl 125 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 2.5 mM, Tritón X100 0.5 %). Finalmente se adicionan 50 µL de sol C (Tris 25 mM, EDTA 2.5 mM, SDS 0.1 %) y se incubó a 65 °C por 30 min para recuperar el sobrenadante, que fue analizado por Western Blot con los respectivos anticuerpos Mab Anti-E, Pab Anti-NTDyn.

7.17 Producción de pAbs anti-NTDyn y anti-NDD

Ambos anticuerpos fueron producidos individualmente y usando el mismo protocolo. Se obtuvieron cuatro Conejos NZB Crl:KBL(NZW)BR de 10-12 semanas de edad de los criaderos del CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional). Todos los animales fueron alojados y

manipulados de acuerdo con las pautas institucionales y a la NOM. Los conejos fueron inmunizados con tres dosis de 100 µg de proteínas recombinantes NTDyn o NDD. Estas inmunizaciones se administraron por vía subcutánea con adyuvante completo de Freund la primera inoculación, y con adyuvante incompleto de Freund, en la primera, tercera y quinta semana. A la séptima semana, los conejos fueron sacrificados y los anticuerpos en suero fueron purificados mediante la resina proteína A – Sepharose 4B (Invitrogen).

7.18 Interacción ZIKV-NTDyn por resonancia superficial de plasmones en un equipo Biacore T200

Esta metodología se realizó en coordinación con la Ing. Lorena Ramírez, encargada de la manipulación del equipo Biacore T200 en el LaNSE del Cinvestav-Zacatenco. Para cuantificar la interacción entre la dineína y las partículas virales del ZIKV se usó un equipo Biacore T200 (GE Healthcare). De la NTDyn purificada se prepararon 15.68 µM en dilución con 118 µL de buffer de corrida para SPR, el chip series S de NTA fue fijado con el buffer HBS-P (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactante p20, pH 7.4.), la inmovilización se realizó mediante un enfoque de captura con HBS-P a un flujo de 10 µL/min. En la NTDyn un extremo queda con un sitio de unión a histidina después de quitar el tag, esto permite que el chip NTA la capture y promueva una alta estabilidad (Cytiva 2020). Para la valoración del virus, se usó un flujo celular de 1, las partículas virales fueron inyectadas a diferentes concentraciones, 50, 40, 30, 20, y 10 nM por 120 s a un flujo de 30 µL/min. La disociación fue monitoreada por 60 s. También, se usó un flujo celular de 2 como referencia para disminuir la interacción no específica del virus con el chip. La superficie fue limpiada con una inyección de 60 s de EDTA 350 mM y fue regenerada con NiCl₂ 0.5 mM inyectado por 60 s. El experimento se realizó tres veces.

8. RESULTADOS

La dineína y la proteína E del ZIKV interactúan de forma natural

8.1 Ensayo de colocalización de Envoltorio-dineína

En la Figura 15A, se muestra el patrón de colocalización del envoltorio y la dineína a las 8, 12 y 24 h. Mientras que la dineína en las células simuladas (Mock) se distribuyó uniformemente en el citoplasma, en las células infectadas se observan zonas claras de mayor intensidad alrededor de los núcleos, incluso en las células en las que la proteína de la envoltura es poco visible, este efecto fue reportado previamente (Shrivastava et al., 2011). A lo largo del experimento, mostramos una acumulación notable de dineína alrededor de la proteína E, favoreciendo la concentración de dineína. A las 8 h, la proteína E se muestra en baja cantidad y se colocaliza con dineína. A medida que avanzaba el tiempo, la cantidad de proteína E aumentó y a las 12 h Figura 15B, se observaron zonas de colocalización distribuidas en el citoplasma, con un índice de colocalización de Pearson de 0.672 (flecha naranja). A las 24 h, Figura 13C, el índice de colocalización de Pearson es de 0.698, pero el patrón de colocalización está más localizado en la zona perinuclear, esto coincide con la localización de proteínas virales en el RE, la distribución de los patrones de localización que van desde el citoplasma hasta el núcleo nos lleva a pensar en que se ha dado el tráfico retrógrado, es necesario resaltar que este es el mismo patrón observado por Shrivastava et al., de 12 a 24 h.

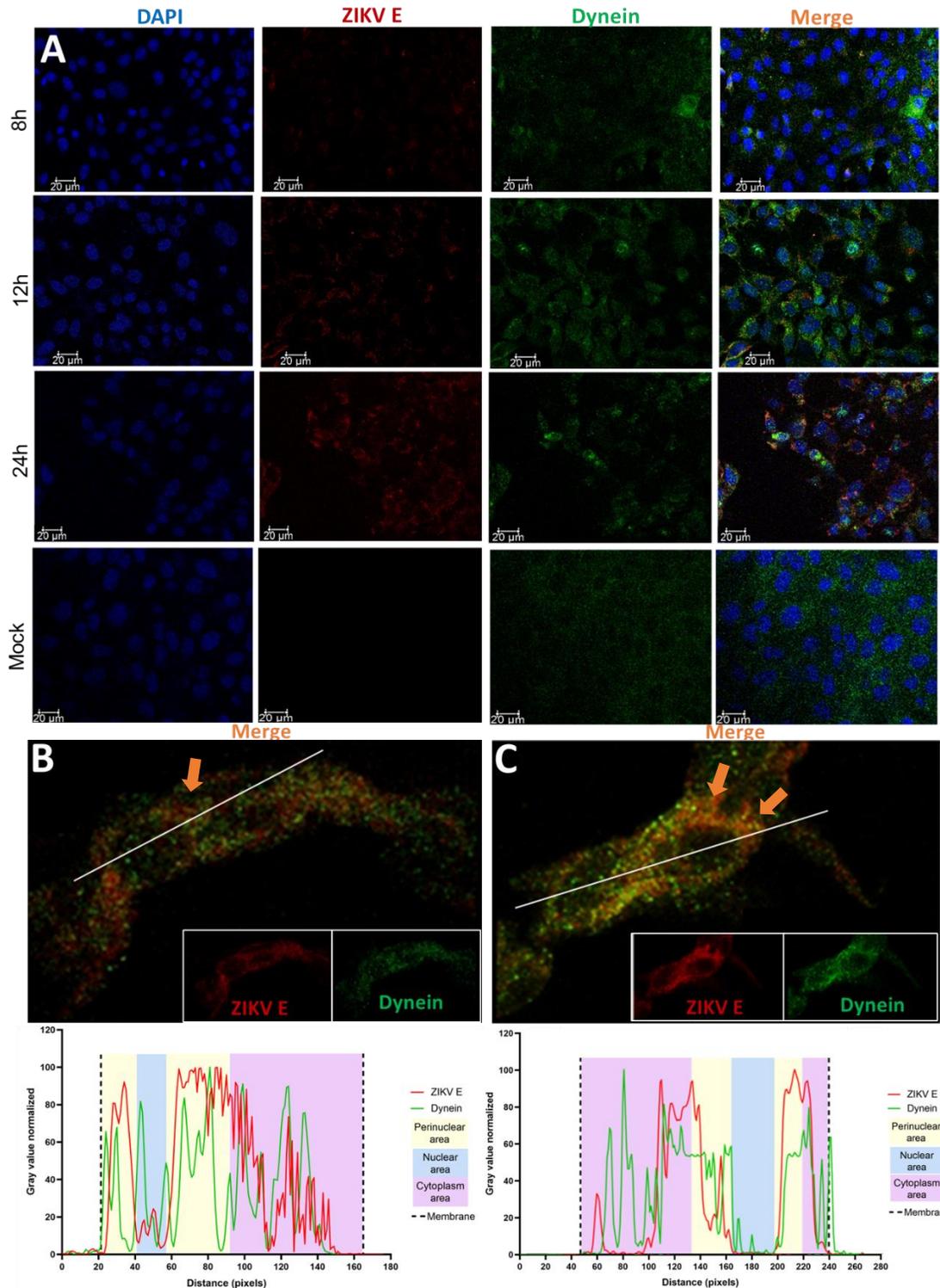


Figura 15. Ensayo de inmunofluorescencia de células infectadas por ZIKV. A, Se infectaron células Vero con ZIKV y se fijaron en diferentes momentos posteriores a la infección (p.i.). ZIKV pE se marcó con MAb de ratón y una IgG anti-ratón secundaria Alexa 488 (rojo). La dineína se marcó con Ab policlonal de conejo y una igG anti-conejo Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con

DAPI (azul). Imágenes divididas que muestran la colocalización a las 12, 24 y 48 h. Las células simuladas son células sin infección fijadas a las 48 h. B, Imagen ampliada por inmunofluorescencia 12 h después de la infección. C, Imagen ampliada por inmunofluorescencia 24 h después de la infección, n=3, flecha naranja zona de interacción.

8.2 Cinética de la expresión de la pE y dineína en células Vero-infectadas con ZIKV

Analizamos la expresión de pE y dineína, durante la infección (Figura 16), a 8, 12 y 24 h post infección por medio de un WB. A las 8 h, la proteína de la envoltura es indetectable, mientras que la dineína se observa con baja intensidad, pero a las 12 h la envoltura comienza a ser detectable mientras que la dineína presenta una mayor intensidad en su señal. Finalmente, a las 24 h la proteína de la envoltura aumenta su señal, pero la dineína parece disminuir, aunque la relación estequiométrica no parece ser equitativa, la cinética parece consistente con lo observado en la colocalización, estos resultados también con la colocalización mostrada por Shrivastava et al. Los resultados sugieren que, en una etapa temprana de la infección, la dineína tendría la función de transportar el ZIKV en la interacción directa con la proteína E, por lo que necesariamente estaría sobreexpresada. Sin embargo, cuando finaliza esta etapa, la expresión de dineína vuelve a los niveles similares a los mostrados en células no infectadas.

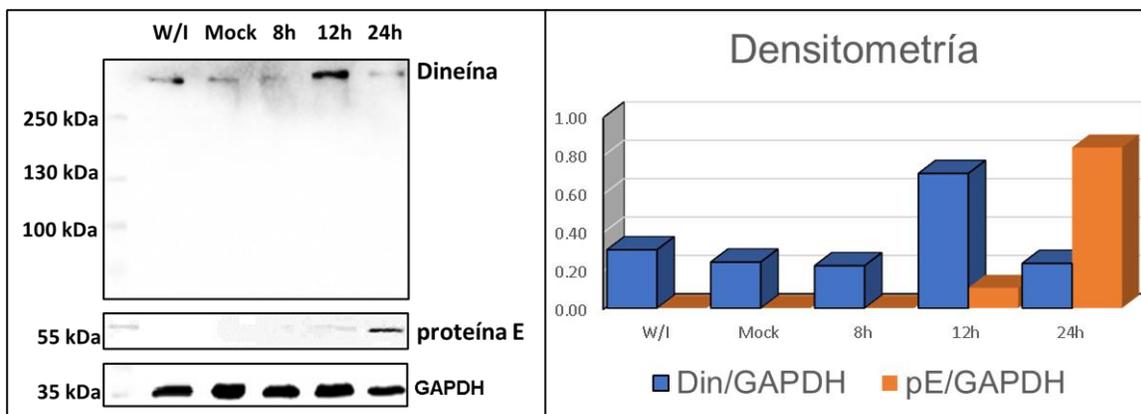


Figura 16. Cinética de proteína E y la dineína. Panel izquierdo. Primer carril, marcador de peso molecular. Carril 2, células Vero sin infección. Carril 3, células Vero-infectadas de forma simulada (Mock). Carril 4, células Vero a las 8 h.p.i.(horas post infección), Carril 5, células Vero a las 12 h.p.i. Carril 6, a las 24 h.p.i., n=2. Panel derecho análisis densitométrico relación Dineína/GAPDH, pE/GAPDH.

8.3 Ensayo de proximidad de ligando pE-dineína

Con el ensayo de proximidad de ligando (PLA), se evaluó la interacción de las proteínas a distancias <40 nm. Células infectadas con ZIKV se fijaron a 12, 18, 24 y 48 h.p.i. (Figura 17). Se observaron señales débiles (1 o menos puntos PLA por célula) cuando se marcaron la dineína y la pE entre a las 12 y 24 h.p.i., y señales intensas (6 o más puntos por célula) a las 18 h.p.i. La ausencia de cualquier señal en los 2 controles negativos utilizados corroboró la especificidad del ensayo. Estos resultados corroboran los resultados de colocalización y la cinética de expresión de proteínas que sugieren que en las células infectadas por ZIKV, la dineína y pE interactúa en una ventana de tiempo estrecha. La pérdida de la interacción después de 18 h podría significar que el ZIKV está dentro de vesículas, por lo que no hay necesidad de interacción directa de la dineína con el virus.

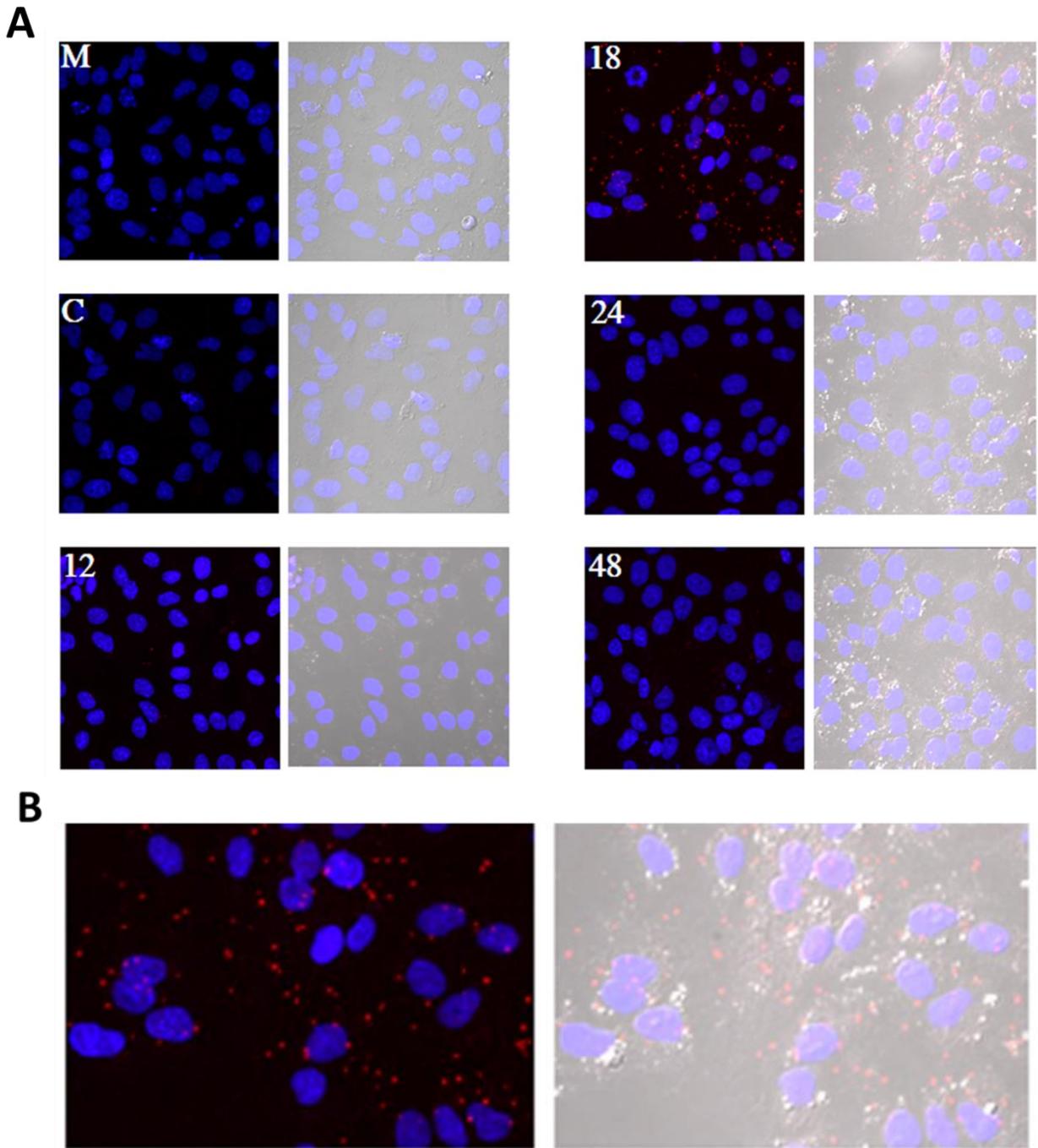


Figura 17. Ensayo de proximidad de ligandos en células infectadas por ZIKV. A. (M) La imagen de la infección simulada con ZIKV inactivo fijadas a las 48 h (C) el control de células infectadas con el virus a las 18 h sin la incubación del anticuerpo anti-pE. Para el transcurso del tiempo, usamos células Vero-infectadas con ZIKV y fijadas en diferentes tiempos después de la infección: 12, 18, 24 y 48 h. Este ensayo se realizó con una anti-pE monoclonal en MAb de ratón y con un anti-NTD_{YN} policlonal en conejo. Los puntos PLA se marcaron con Cy3 (rojo). Las imágenes de la derecha muestran los canales DAPI (azul) y Cy3 (rojo). Las imágenes de la izquierda muestran azul, rojo y el

canal de contraste de interferencia diferencial (gris). B. Imagen ampliada a las 18 h post infección., n=3.

8.4 Inmunoprecipitación del complejo de envoltorio-dineína

Se infectaron células Vero con ZIKV y se lisaron a las 24 h.p.i., se usó anticuerpo mAb IgG de ratón anti-pE flaviviral (Invitrogen) para inmunoprecipitar las proteínas de los lisados de células infectadas y no infectadas. Los inmunocomplejos fueron analizados por WB e identificados por un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la dineína HC (C-5, Santa Cruz Biotechnology) (Figura 18A carriles 1-3). La presencia de la proteína de la envoltura en el complejo precipitado con perlas de sefarosa A recubiertas con anti-dineína es visible (Figura 18B, carril 6). No hubo señal en el lisado de células no infectadas inmunoprecipitadas en el carril 4. Estos resultados validaron la colocalización de la proteína del envoltorio y la dineína mostró la formación del complejo in vivo.

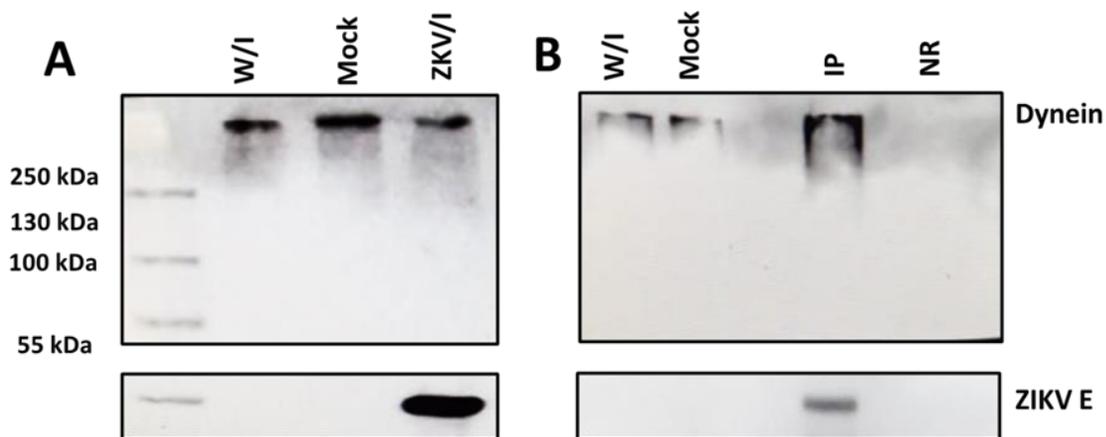


Figura 18. Inmunoprecipitación del complejo envoltorio–dineína. **A.** Western Blot de los lisados de células Vero-infectadas o no infectadas con ZIKV, se analizaron con anticuerpo monoclonal anti-E y anticuerpo anti-dineína, seguido de HRP anti- conejo de cabra. Carril 1. Marcador de PM. Carril 2. (W/I) Lisado de células Vero no infectadas. Carril 3 (Mock). Lisado de células Vero-infectadas de forma simulada. Carril 4 (ZKV/I). Lisado de células Vero-infectadas con Zika. **B.** Ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Dineína. Carril 1 (W/I). Lisado de células Vero no infectadas por inmunoprecipitación. Carril 2 (Mock). Lisado de células Vero-infectadas de forma simulada por

inmunoprecipitación. Carril 3 (IP). Lisado de células Vero-infectadas con ZIKV por inmunoprecipitación. Carril 4 (NR). Control negativo, inmunoprecipitación con anticuerpo anti-NDP52 del lisado de células Vero-infectadas con ZIKV, n=2.

8.5 Purificación de las proteínas recombinantes NTDyn y NDD.

Estas purificaciones se habían estandarizado previamente a esta investigación, ambas se purificaron usando el mismo protocolo descrito en el punto 7.9. El fragmento NTDyn y NDD se purificaron siguiendo el protocolo referido en material y métodos, usando un paso de cromatografía de afinidad y un paso de filtración en gel (Figura 19). Finalmente, las fracciones resultantes de la filtración en gel se concentraron y analizaron con SDS-PAGE. En los geles de ambas purificaciones se observa una sola banda del peso molecular esperado.

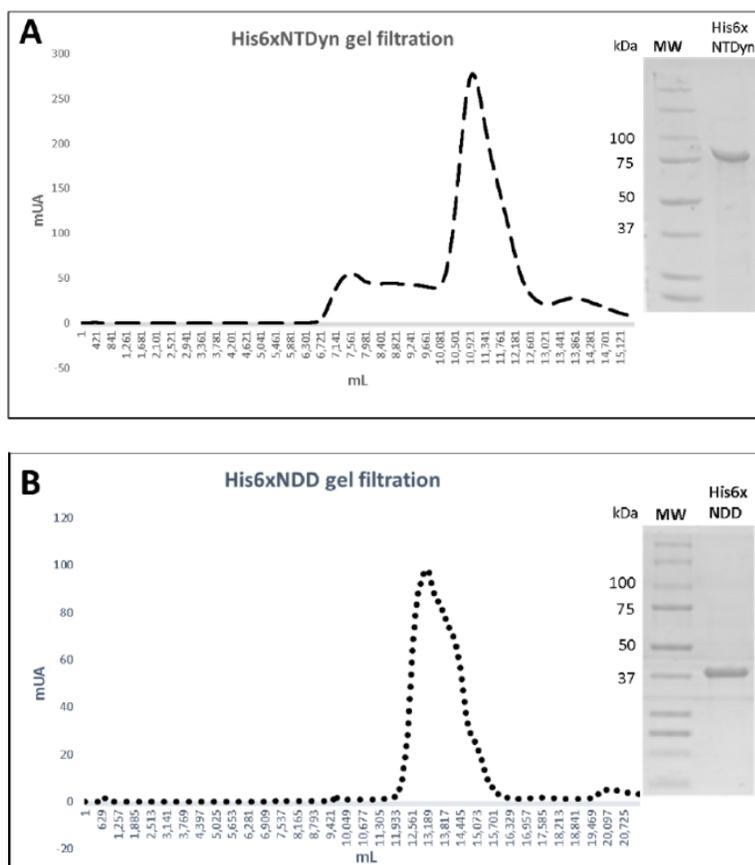


Figura 19. Paso final de la purificación de NTDyn y NDD. A. Cromatografía de filtración en gel de la proteína NTDyn y su análisis por SDS-PAGE de la fracción a 11.1 mL, **B.** Cromatografía de filtración en gel de la proteína NDD y su análisis por SDS-PAGE de la fracción a los 13.2 mL, n=3.

8.6 Los viriones de Zika interactúan con NTDyn

Para examinar si el ZIKV completo interactúa con la proteína recombinante NTDyn, unimos el His6NTDyn a una columna HisTrap níquel y luego se inyectó una muestra enriquecida de ZIKV, purificada de células Vero-infectadas. Lavamos la columna, y eluimos el material unido con imidazol 500 mM, analizamos las fracciones por SDS-PAGE (Figura 20A); carril 1 marcador de PM, línea 2 el His6NTDyn purificado, en carril 3 el ZIKV purificado, carril 4 material eluido donde podemos ver la banda correspondiente a His6NTDyn y algunas bandas correspondientes al PM de la proteína E.

Para delimitar la región de interacción, utilizamos anticuerpos generados para una parte de la proteína específica, el NDD. Entonces inyectamos a la columna HisTrap el His6NDD (Figura 21C) recombinante (Figura 20C), el núcleo central del fragmento His6NTDyn (Figura 21B). En el carril 1 se muestra el marcador de PM, la línea 2 es el His6NDD purificado, la línea 3 el ZIKV purificado y la línea 4 la elución muestra la presencia de ambas bandas, este resultado es consistente con el resultado anterior y delimita la zona de interacción entre el ZIKV y la dineína, que está en el dominio de dimerización. Como control negativo, utilizamos un anticuerpo anti-NDD policlonal para bloquear este dominio en el fragmento His6NTDyn, para exponer solo los haces helicoidales 1, 2 y 3 de la HC de dineína, este complejo se inyectó en una columna de afinidad y posteriormente se lavó e inyectó con la partícula de ZIKV y se eluyó. En la Figura 20C observamos en la línea 1 marcador de MW, línea 2 NTDyn y bandas de anticuerpos anti-NDD (IgG), línea 3 banda correspondiente a la proteína de la envoltura del ZIKV, en línea 4 elución donde solo observamos las bandas correspondientes al His6NTDyn-Anti NDD complejo, la ausencia de bandas correspondientes a la envoltura muestra la ausencia de interacción ZIKA-complejo, este resultado muestra la especificidad de la interacción ZIKV-NDD. Como control, inyectamos nuestra partícula viral Zika purificada en una columna de afinidad, para analizar la capacidad de formar interacciones inespecíficas (Figura 20D). También observamos en la línea 1 el marcador de PM, la línea 2 la banda de la proteína del zika de la envoltura y la línea 3 la banda de elución, donde no se observa ninguna banda. Así, observamos que el ZIKV no interactúa de forma inespecífica con la columna de afinidad.

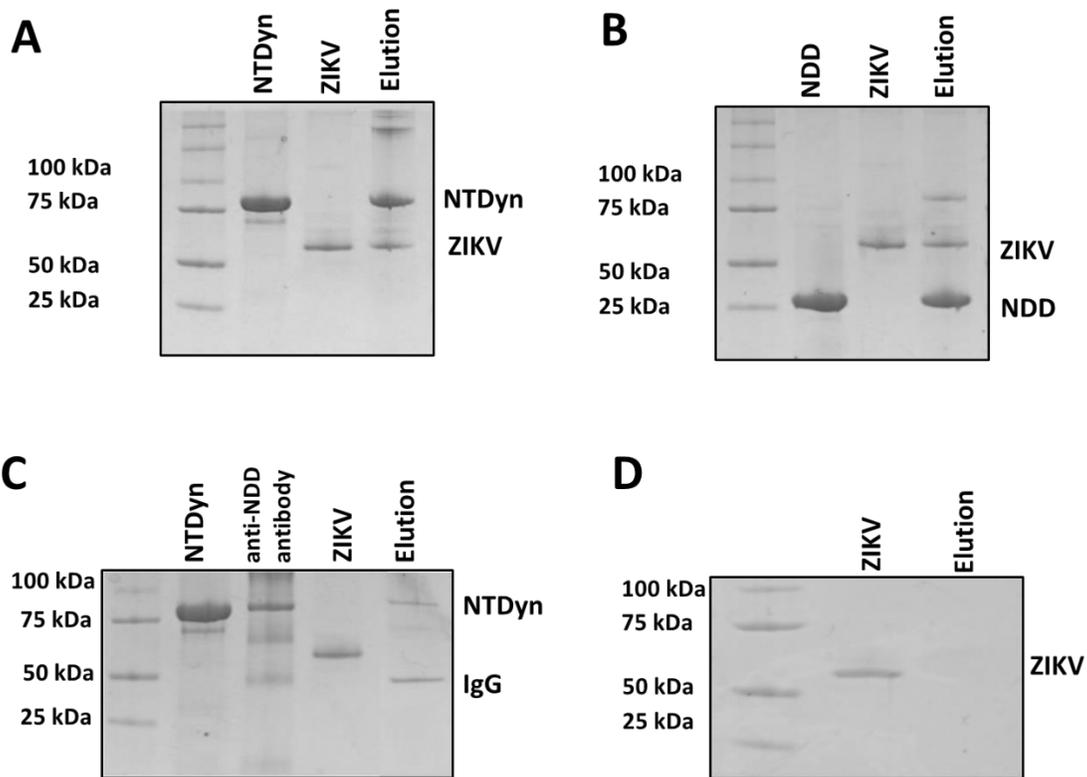


Figura 20. Unión del ZIKV con NTDyn. Se cargó un ZIKV purificado de células Vero en una columna HisTrap HP Nickel (GE) de 10 mL precargada con His6NTDyn. La columna se lavó y la muestra se eluyó con imidazol. Las fracciones se analizaron con un SDS-PAGE. A, línea 1. marcador de PM; línea 2, la banda de His6NTDyn purificada; línea 3, pE enriquecida del ZIKV; línea 4, la fracción eluida contiene tanto el ZIKV completo como el NTDyn-His6. B, línea 1, Marcador de PM; línea 2, proteína purificada His6NDD unida a columna de afinidad; línea 3, ZIKV purificado; línea 4, elución. C, línea 1, marcador de PM; línea 2, complejo His6NTDyn + anticuerpo anti-NDD; línea 3, ZIKV purificado; línea 4, elución. D, línea 1, marcador de PM; línea 2, ZIKV purificado; línea 3, elución., n=3.

8.7 Perfiles cromatográficos de filtración en gel complejos de NTDyn-anticuerpos

Para verificar que el anticuerpo anti-NDD se unía solo al NDD del fragmento NTDyn, analizamos este complejo mediante filtración en gel y lo comparamos con el complejo NTDyn-anti-NTDyn. De esta forma, pudimos analizar la capacidad de interacción del anticuerpo ya que ambos anticuerpos policlonales tienen diferentes sitios de unión, por lo que el complejo NTDyn-anti-NTDyn mostraría una reducción en su volumen de elución en comparación con el complejo NTDyn-anti-NDD, porque el complejo NTDyn-anti-NDD no tendría anticuerpos unidos a las hélices alfa del fragmento NTDyn, lo que nos daría la capacidad de probar la interacción entre las hélices alfa de NTDyn y ZIKV. Como resultado, observamos en la figura 21A, panel derecho, el cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión por tamaño de ambos complejos, donde se muestra que el pico máximo de elución del complejo NTDyn-anti-NDD se presentó a 15,02 mL. Si bien el pico máximo del complejo NTDyn-anti-NTDyn se produjo en 15,39 mL, este resultado es coherente con lo esperado, ya que el complejo NTDyn-anti-NDD debería tener menos anticuerpos unidos, por lo que mostraría un volumen de elución más bajo. Las fracciones cromatográficas fueron analizadas por SDS-PAGE, donde se observó la presencia de bandas correspondientes al fragmento NTDyn e IgG.

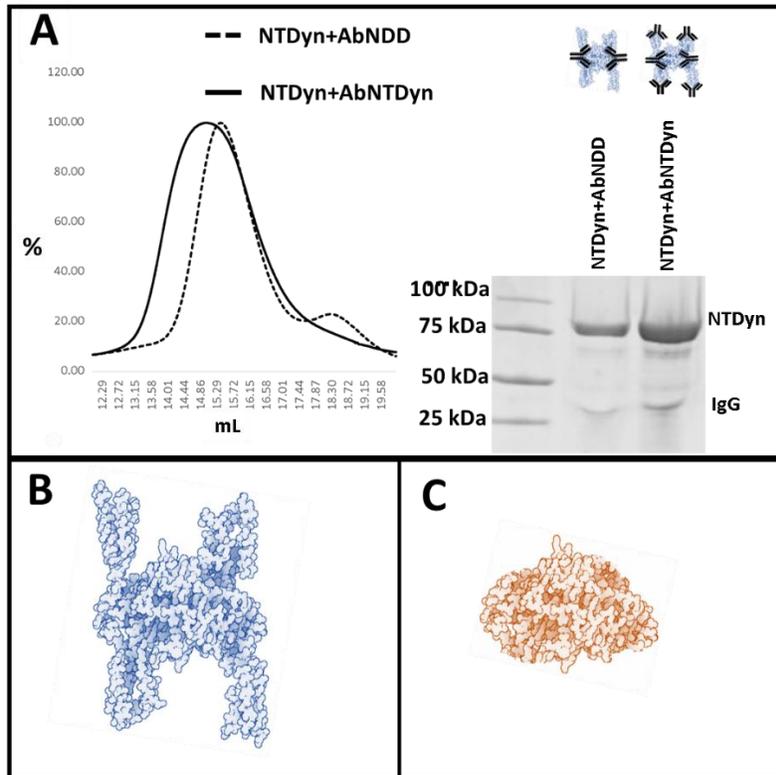


Figura 21. Complejo NTDyn-anticuerpos **A.** Cromatograma de exclusión por tamaño de los complejos NTDyn-anti-NTDYN y NTDyn-anti-NDD en el lado derecho se muestra la SDS-PAGE de los picos de elución correspondientes. **B.** Panel izquierdo, se muestra la estructura del NTDyn azul, compuesto en su núcleo por el NDD y en su parte externa por 6 alfa-hélices laterales. Imágenes modificadas de 5NW4 y 5OWO. **C.** NDD. Dominio de dimerización de la dineína en color rojo. Imágenes modificadas de 5OWO, n=3.

8.8 Ensayo de retardamiento NTDyn-pE

Para evaluar si esta interacción también tiene lugar en la solución, analizamos ambas proteínas por filtración de gel con una columna Superdex 200 10/300 GL (GE) (Figura 22). La proteína E tiene un pico de elución de 13.19 mL, NTDyn un pico máximo de 12.65 mL, y cuando incubamos ambas proteínas juntas, aparecieron los picos de 12.75 y 13.19 mL y un nuevo pico de 11.52 mL. Mediante el análisis de los picos con un SDS-PAGE, mostramos que las fracciones correspondientes a la máxima absorbancia del pico NTDyn en una sola banda con el MW esperado. El carril de la proteína E muestra un enriquecimiento de la proteína. Finalmente, el carril de las fracciones que eluyen a los 11.52 mL, muestra dos bandas, una correspondiente a la MW de NTDyn y la otra a la pE. Este experimento

fue determinante para esta investigación debido a que en este punto la pE no se encontraba pura y pudimos observar como la interacción de estas proteínas purificó a la pE al interactuar con la NTDyn.

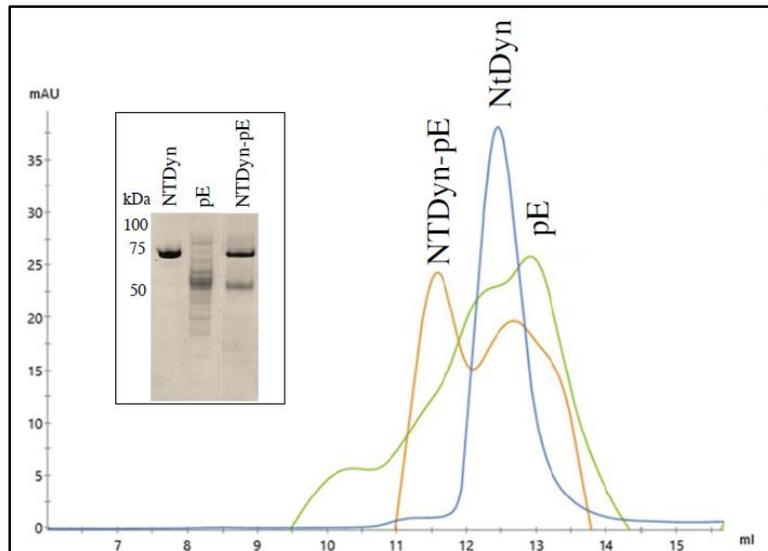


Figura 22. Cromatograma de la interacción NTDyn-pE. La cromatografía fue realizada en PBS 1X las fracciones se analizaron en SDS-PAGE. En el carril correspondiente al pico de la elución no se observan las proteínas contaminantes que acompañan a la pE. n=3.

8.8 Sobreexpresión, repliegamiento y purificación de la pE

8.8.1 Perfiles de expresión de la pE.

Una vez realizada la construcción del plásmido pRSET-pE transformamos una cepa de SoluBL21 (Amsbio). A las colonias obtenidas se les realizaron perfiles de expresión a doce colonias diferentes, y de estos, únicamente se obtuvo una colonia capaz de expresar la pE, a las tres horas después de la inducción con IPTG a 37°C, con una flecha azul se muestra la zona correspondiente al peso molecular de la proteína 78 kDa. Es importante observar cómo la expresión de la proteína disminuye casi por completo al aumentar el tiempo. Cuando comparamos el carril incubado a 37°C durante 3 h (flecha roja), con la incubación a 37°C toda la noche (flecha verde) después de la inducción con IPTG (Figura 23). La atenuación de la proteína que observamos en nuestros experimentos puede ser ocasionada por distintos mecanismos, Rita Sachse et al. comentan que una incorporación extensa de moléculas extrañas con dominios transmembranales afecta negativamente a la

integridad estructural de los componentes de la membrana de la célula hospedera, lo que lleva a la célula a alterar su metabolismo o incluso a la lisis celular.

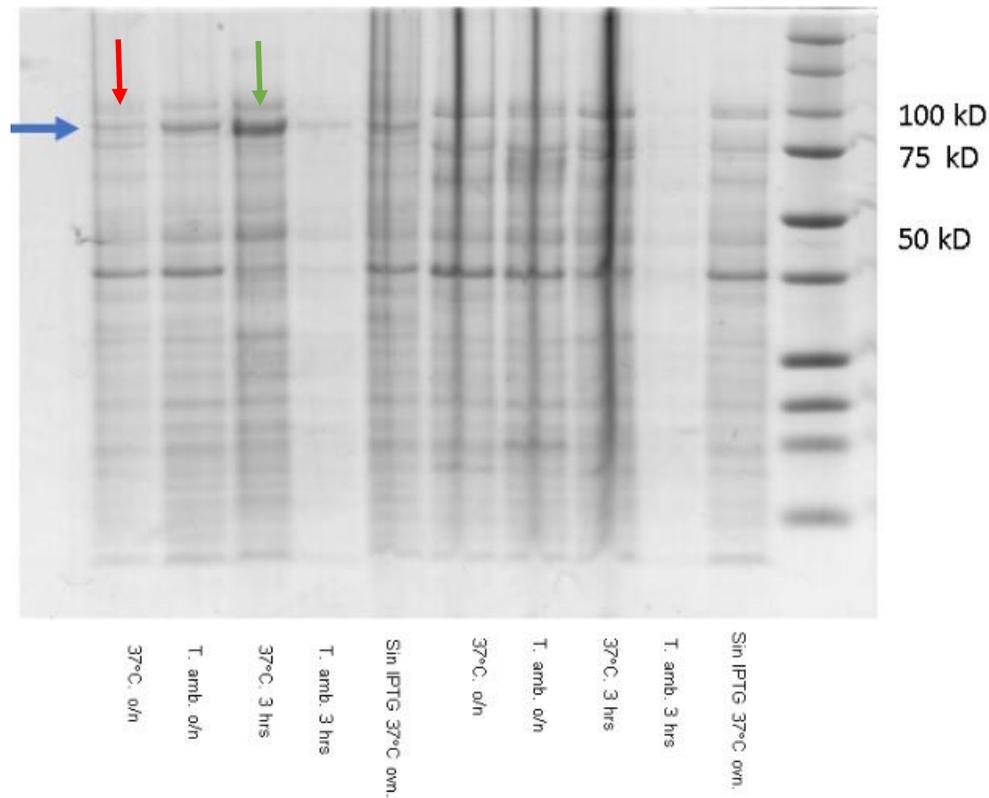


Figura 23. Perfiles de expresión de la pE. Se muestran dos perfiles de expresión de diferentes colonias, en el primer carril derecho se muestra el marcador de PM, seguido del lisado celular sin inducción con IPTG, La flecha azul señala a la pE, en el noveno carril esta se incubó a 37°C por tres horas después de la inducción con IPTG, en comparación con el último carril que corresponde a toda la noche después de la inducción con IPTG, se observa una disminución de la cantidad de la proteína. n=3

8.8.2 Macro cultivo de la pE 409.

El macro cultivo se realizó siguiendo los pasos que se indican en material y métodos, se cultivaron 4 L de medio 2XYT y se tomaron muestras antes y después de la inducción con IPTG. En este caso el tiempo de incubación posterior al estímulo de IPTG fue únicamente de tres horas, como se observa en la figura 24, la expresión aun en macro cultivo parece ser baja por lo que se optó por escindir el dominio transmembranal de la proteína, esto es para solubilizarla, y, para obtener una mejor expresión.

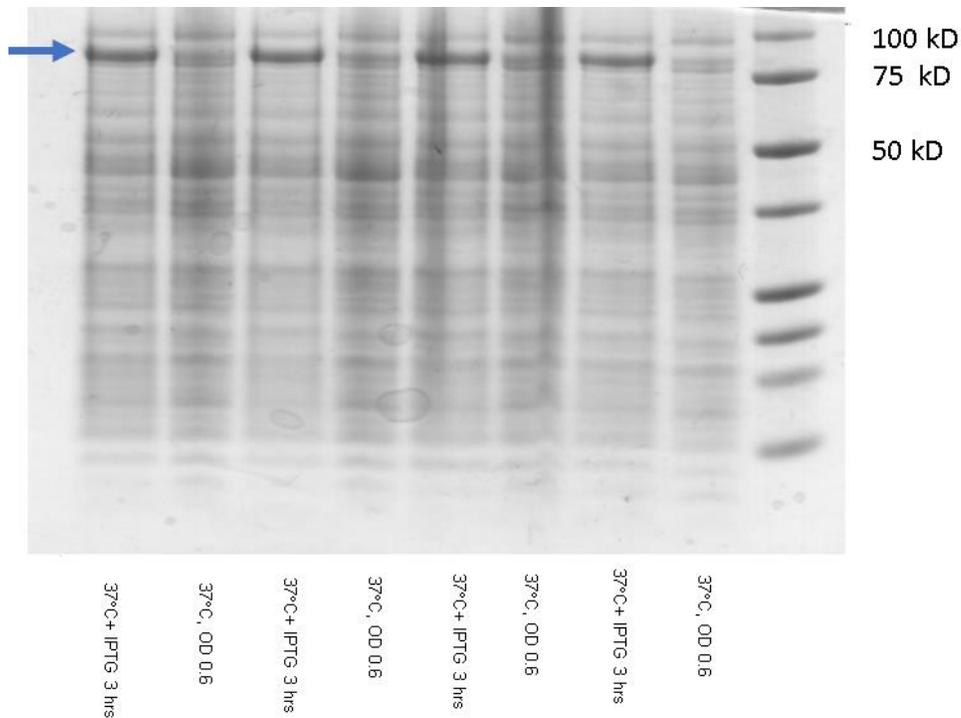


Figura 24. Macro cultivo de la pE. La incubación posterior a la inducción con IPTG fue de 3 h. Se marca con una flecha azul la zona que corresponde al peso molecular de la pE. n=3.

8.8.3 Perfiles de expresión de la proteína pE-409

Una vez completa la construcción procedimos a transformar *E. coli* SoluBL21, para analizar los perfiles de expresión, a diferencia de la pE completa, sin el dominio transmembranal se obtuvo una buena expresión como se muestra a continuación en la figura 25, esta vez la mejor condición para su expresión fue a 37°C toda la noche después de la inducción con IPTG, a pesar de que todas las colonias mostraban expresión, no todas mostraron la sobreexpresión requerida por lo cual solo elegimos una colonia para trabajar con ella.

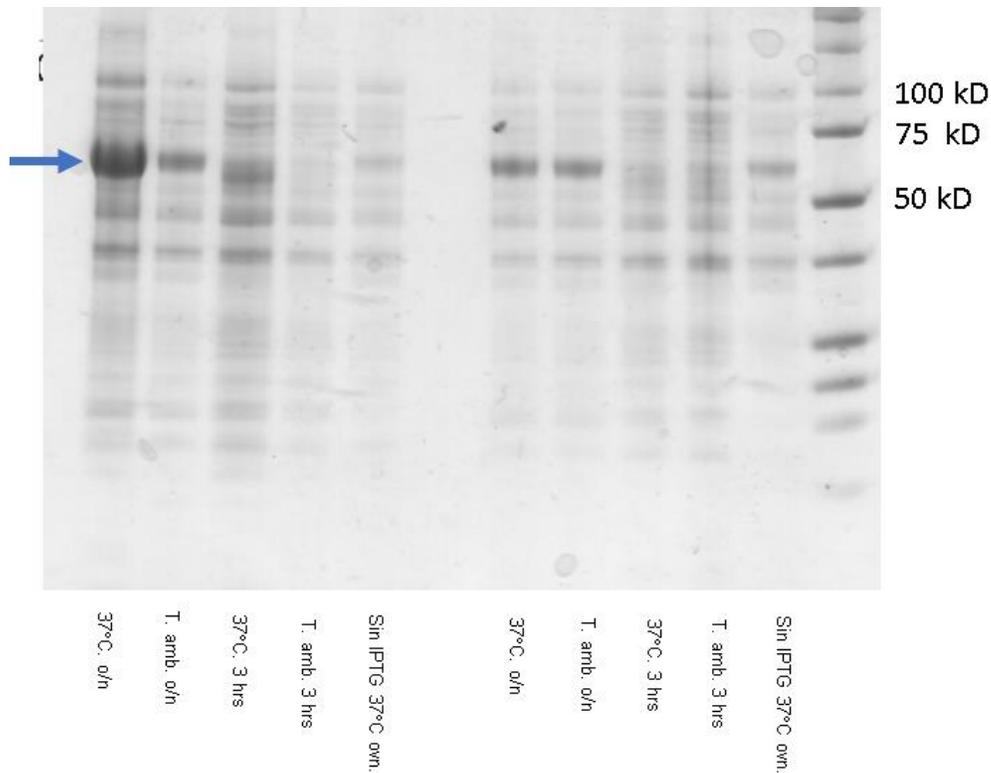


Figura 25. Perfiles de expresión de la pE-409. En el primer carril del lado derecho se muestra el marcador de peso molecular, en los siguientes cinco carriles se observa un perfil de expresión de una colonia en donde en el segundo carril se muestra un lisado celular sin IPTG. En los carriles quinto y sexto se muestran dos bandas que corresponden a la pE-409, en este caso la expresión no es la deseada. En los siguientes cinco carriles se observa el perfil de expresión de otra colonia con la flecha azul en la zona correspondiente al peso molecular de la pE-409. La sobreexpresión de la proteína en este caso se logró con una incubación a 37°C toda la noche. n=3.

8.8.4 Replegamiento y purificación de la pE-409.

Una vez que obtuvimos la sobre expresión de la proteína, procedimos a realizar los macro cultivos, estos se realizaron con cuatro cultivos de 1 L cada uno, y fueron incubados durante toda la noche a 37°C después de la inducción con IPTG. La banda correspondiente a la pE-409 se observa aproximadamente en los 53 kDa, lo cual corresponde al peso esperado una vez que se ha retirado el dominio transmembranal (Figura 26).

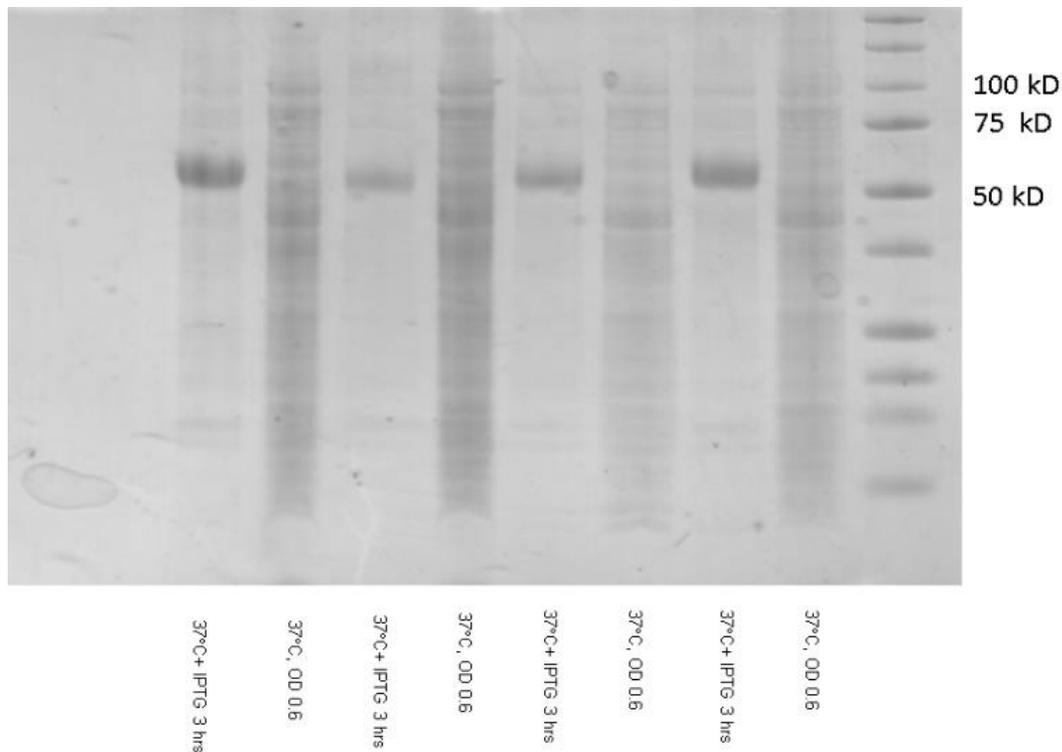


Figura 26. Macro cultivos de la pE-409. Se observa una SDS PAGE, en el primer carril del lado derecho se observa el marcador de peso molecular seguido de los lisados celulares; en el segundo carril se muestra el cultivo sin IPTG en el tercer carril se observa el mismo cultivo, pero con IPTG incubado toda la noche a 37°C. Se realizaron cuatro cultivos de un litro cada uno y se presentan en el gel consecutivamente, el cultivo sin IPTG seguido de la misma muestra con IPTG. n=3.

Después de lisar la célula por sonicación, las muestras fueron centrifugadas para comprobar la falta de solubilidad de la proteína, de esta manera comprendimos que la pE-409 se sobre expresa y se agrega formando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos que impiden el correcto plegamiento de la proteína y su purificación, esto además de estar documentado (Lianpan, 2016) se observa, ya que al centrifugar la proteína a 14000 rpm por 15 min y ultra centrifugarla a 45000 rpm por 30 min, la proteína permanece en el pellet, (Figura 27).

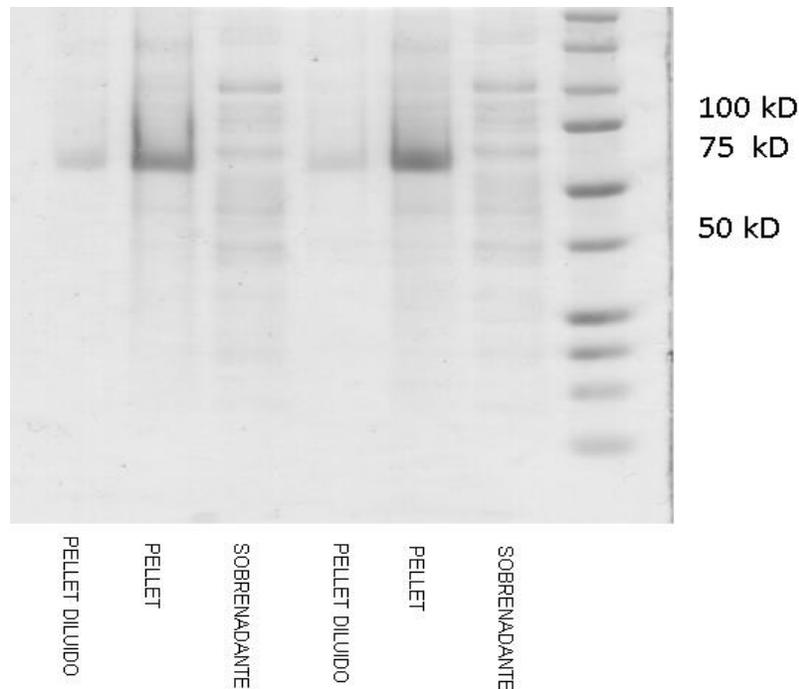


Figura 27. Centrifugación y ultra centrifugación de la pE-409. En el primer carril de la derecha se observa el marcador de peso molecular seguido del sobrenadante, y el pellet de la ultra centrifugación, los siguientes tres carriles corresponden a la centrifugación de la muestra. n=3.

Durante esta investigación, probamos diferentes técnicas de replegamiento para la pE recombinante, aparentemente la más exitosa es la descrita en los materiales y métodos, con la cual, pudimos obtener un cromatograma con un pico uniforme en la filtración en gel, además de una sola banda durante la electroforesis SDS PAGE, la técnica que desarrollamos para el replegamiento y purificación consta de varios pasos, una vez que la proteína ha sido expresada como cuerpos de inclusión, estos deben de ser lavados utilizando un homogeneizador y diferentes buffers, para después solubilizar la proteína durante toda la noche en agitación con buffer de urea 8 M, seguido de esto la muestra se ultracentrífuga para conservar la proteína soluble y se pasa por un paso de filtración en gel en una columna superdex 200 10/300 increase, previamente equilibrada con buffer de replegamiento y con un gradiente de 0.2 volúmenes de columna de urea 8 M (técnica modificada de De la Cruz et al., 2019). Los resultados se observan en la figura 28, en donde comparamos la técnica utilizada con el buffer de replegamiento a pH 9.0, con el replegamiento por goteo y además también la comparamos con la misma técnica, pero a un pH de 8.0. Como

se puede observar, el cromatograma con el pico más simétrico se observa a pH de 9.0.

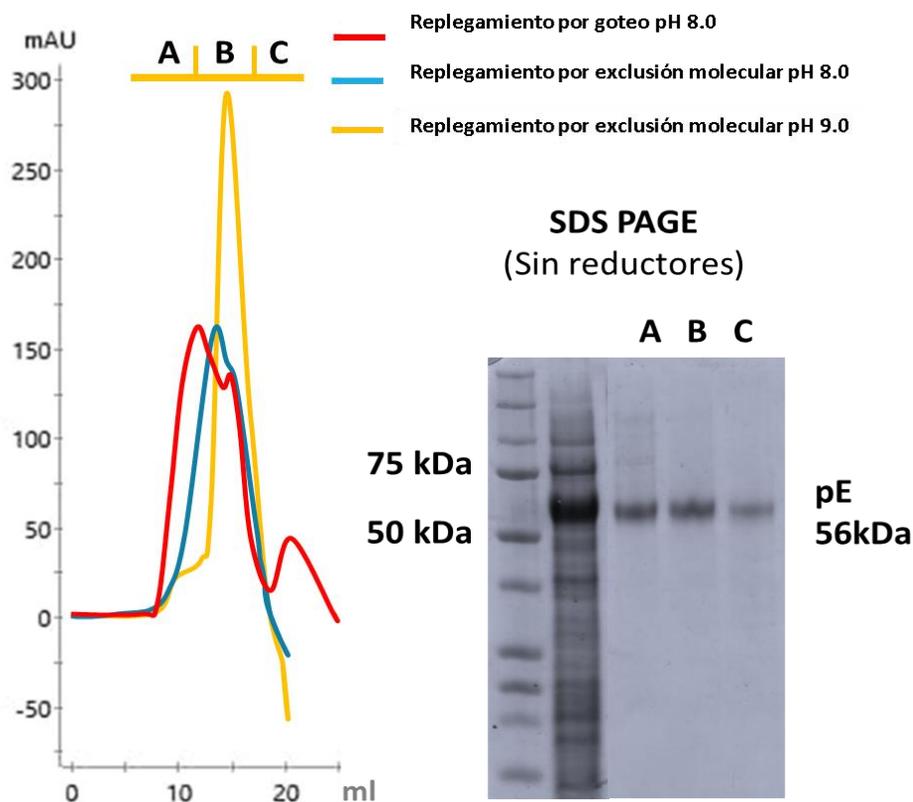


Figura 28. Purificación de la proteína recombinante del envoltorio del ZIKV. A la izquierda se muestra un cromatograma de UV, en donde se compara la técnica utilizada a pH 9.0 y pH 8.0, contra la técnica por goteo. Color amarillo nuestra técnica utilizada para purificación de la proteína (pH 9.0), color azul la misma técnica a pH 8.0 y color rojo la técnica de replegamiento por goteo a pH 8.0. A la derecha se muestra un SDS PAGE (sin reductores de puentes disulfuro) de las fracciones obtenidas del replegamiento por exclusión molecular a pH 9.0. La columna utilizada fue Superdex 200 10/300 Increase, a 0.5 mL/min. n=3.

8.9 Far western blot de las recombinantes NTDyn- proteína E

Para abordar la interacción entre la proteína E recombinante y NTDyn, llevamos a cabo un Far-Western blot esta técnica nos permite caracterizar interacciones proteína-proteína *in vitro*, utilizando una proteína fijada a una membrana que se hace interactuar con una segunda proteína, posterior a una serie de lavados la segunda proteína es identificada por medio de anticuerpos, por lo tanto, cuando observamos una señal es debido a la interacción entre ambas proteínas. Inicialmente, transferimos en cinco carriles de una membrana de PVDF 100 µg de la proteína E recombinante en cada carril. Después del bloqueo de la membrana lo hicimos interactuar con diferentes cantidades del NTDyn recombinante. Como resultado, observamos en la figura 29 un aumento en la intensidad de la señal que corresponde al aumento en la concentración de NTDyn. Como control usamos un carril transferido con 100 µg de NTDyn sin incubación posterior, esto nos permitió observar la intensidad de la señal generada por la reactividad del anticuerpo, para el control negativo tomamos un carril transferido con proteína E recombinante y la hizo interactuar con 100 µg de BSA. Como resultado, no observamos una señal, lo que nos muestra la especificidad de la interacción. Estos resultados corroboraron nuestra hipótesis y condujeron al análisis de esta interacción entre proteínas recombinantes.

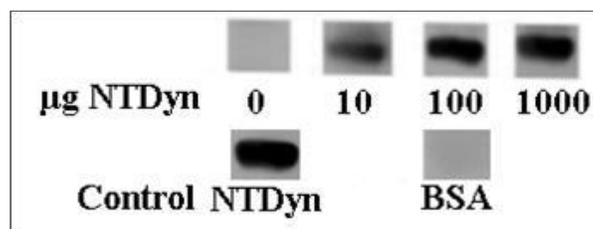


Figura 29. Far western blot de las recombinants E-NTDyn. En los cuatro carriles superiores la interacción de la proteína E con diferentes concentraciones de NTDyn se muestra, en dos carriles inferiores se muestran el control de intensidad de NTDyn y la interacción de la NTDyn con BSA como control negativo, n=3

9. Discusión

El reciente brote de SARS CoV-2 ha sido un ejemplo de cuán rápido las infecciones virales pueden propagarse globalmente en una mínima fracción de tiempo y cuán extremadamente vulnerables somos a la acción del virus.

Los virus tienen una alta tasa de mutación, esto les permite hacer frente a los antivirales y a ganar resistencia contra ellos. Por eso, es de vital importancia encontrar moléculas de células huésped que interactúen con el virus y dirigir el diseño de nuevos medicamentos hacia ellas. Esto podría ayudarnos a disminuir la probabilidad de resistencia a los fármacos antiviral. En este trabajo, evaluamos el papel de la dineína citoplasmática humana-1 (dineína) en el ciclo de replicación del virus Zika (ZIKV) y obtuvimos evidencia clara que indica que interactúa con la pE, tanto *in vitro* como en las células infectadas. Primero, analizamos los antecedentes bibliográficos en donde se había demostrado que existe una interacción entre la pE del DENV y la dineína (Shrivastava et al., 2011), y considerando la alta identidad entre las pE del DENV y ZIKV (Sirohi & Kuhn, 2017), investigamos si esta interacción pudiera estar presente en las células infectadas. Para ello infectamos células Vero, fijando muestras a las 12, 24 y 48 h después de la infección. Analizamos la inmunocolocalización del ZIKV y la dineína natural, y encontramos que la colocalización máxima fue a las 24 h, esto es consistente con el inicio informado de la síntesis de proteínas virales en esta línea celular (Bos et al., 2018). La colocalización de moléculas con fluoróforos en microscopía confocal podría tener interacciones lejanas de 400-600 nm debido a la resolución limitada del sistema óptico lo que podría interpretarse como un falso positivo (Kenneth R. Spring et al., n.d.). Para aumentar la resolución de nuestro método, utilizamos el ensayo de proximidad de ligandos, que tiene un límite máximo teórico de 40 nm. A pesar de que existen algunas limitaciones o interpretaciones falsas de esta técnica (Azam Alsemarz et al., 2018), en este trabajo, al encontrarnos evaluando una interacción directa, necesitamos conocer en qué puntos podrían estar formando complejos o interactuando de forma indirecta con nuestras proteínas blanco. Durante el transporte del virus hacia la zona perinuclear, el virus es transportado en endosomas. Para ello, la maquinaria necesaria es GTPasa Rab 5 o 7, que regula el

transporte a endosomas tempranos o tardíos, respectivamente (Krishnan et al., 2007). Estas proteínas de membrana del endosoma interactúan con el adaptador de carga en un extremo y en el otro extremo interactúa con el complejo dineína-dinactina (Xiang et al., 2015). Las proteínas de membrana del endosoma, y el adaptador de carga coiled-coil cuya longitud hemos calculado en aproximadamente 66 nm (Jumper et al., 2021), por lo que, no nos permitirían obtener señal en el PLA (<40 nm). Además, durante la inmunoprecipitación, el buffer RIPA solubiliza los lípidos de las membranas nativas, entonces, no podríamos obtener un resultado falso positivo dado por el ZIKV dentro de una vesícula de membrana, durante la endocitosis, ya que el virus se liberaría de la vesícula, y no interactuaría con la dineína. Dado que detectamos la interacción dineína-ZIKV con los experimentos de inmunoprecipitación, podemos asegurar que estamos capturando a un complejo con interacción directa. También hemos realizado cinética de la infección, con un máximo de señal PLA a las 18 h.p.i. y pasado este tiempo, observamos una disminución de los puntos de PLA. Aumentamos el MOI de 1 a 5 para verificar la interacción directa al comienzo del ciclo de replicación. Sin embargo, no obtuvimos resultados PLA positivo a las 12 h o menos, ni después de 24 h (datos no mostrados), por lo que, proponemos que después de 18 h, los virus ya se estarían procesando dentro de las vesículas, por lo que la interacción directa entre ZIKV y dineína no sería detectable. En conjunto, nuestros datos nos llevaron a proponer un nuevo paso en el ciclo de replicación del ZIKV:

Dado que la liberación de los primeros nuevos viriones del ZIKV es aproximadamente 24 horas después de la infección (Dodding & Way, 2011), y dado que, con nuestros datos, ya no detectamos tanto la colocalización, como las señales de PLA, después de 18 horas, proponemos que el paso del ciclo de replicación de ZIKV en el que participa la dineína debería ser cuando las proteínas virales se encuentran recién sintetizadas en el citoplasma (Cortese et al., 2017). El ensayo de colocalización y PLA solo pudo determinar cercanía y no interacción *in vitro*, lo que nos llevó a analizar la interacción a través de la inmunoprecipitación del complejo, este ensayo en células Vero-infectadas garantiza que esta interacción ocurre de forma natural durante el ciclo de replicación viral.

Para que este nuevo paso en el ciclo de replicación viral ocurra, proponemos tres escenarios posibles; En primer lugar, sugerimos que la poliproteína del ZIKV comienza a traducirse en el citosol, donde secuestra la dineína altamente expresada dependiente de la infección (~12-18 h) que transporta la poliproteína total o parcialmente procesada a las fábricas virales (no habría una interacción directa con las partículas virales armadas), donde los viriones serán procesados, ensamblados y luego transportados al aparato de Golgi a su etapa de maduración final antes de ser liberados al espacio extracelular (~24 h). Existe evidencia en la literatura de una poliproteína no procesada compuesta por proteínas C-prM-E-NS1 del flavivirus YFV, sintetizada con el sistema de traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo (Ruiz et al., 1989). Este sistema de traducción en lisados de reticulocitos de conejo no tiene membranas microsomales por lo que en este flavivirus nuestra hipótesis encajaría perfectamente.

El segundo escenario es que el complejo dineína-ZIKV podría formarse debido a la translocación de factores desde la luz del RE a la superficie celular que podría facilitar de formas aún desconocidas la cascada de señalización apoptótica (Brault et al., 2011). Se ha observado que, en condiciones de estrés, la permeabilidad del RE permite que las proteínas lumbales se liberen o transloquen al lado citoplasmático del RE (Wang et al., 2011). Esto también requeriría el transporte de proteína E por la dineína a las fábricas de replicación viral.

El tercer y último escenario que proponemos es una topología de poliproteína dual, un proceso desconocido de translocación postraducciona que conduce a una topología no uniforme, donde hay un equilibrio de copias de proteínas de la envoltura en compartimentos lumbales o citosólicos (Alberts & Hopkin Bray, 2011). En el virus de la hepatitis B (VHB) se ha observado que todas las proteínas de la cubierta sintetizadas en células transfectadas o en un sistema libre de células adoptan más de una orientación transmembranal (Prange & Streeck, 1995). De esta forma, las vesículas con proteína E del ZIKV frente al citosol podrían unirse a la dineína y toda la vesícula será transportada por el motor molecular para llegar a las fábricas virales.

Por lo tanto, con estos datos, tenemos evidencia de que la proteína del envoltorio interactúa con la dineína sin un adaptador de cargamento o dinactina. Para probar esta fuerte interacción con el virión de Zika completo, unimos a la His6xNTD_{dyn} a una columna de níquel de afinidad y luego hacemos pasar un extracto enriquecido de viriones de células Vero-infectadas a esta columna para posteriormente eluir con imidazol. En la Figura 20, mostramos que NTD_{dyn} se une a los viriones del Zika ya que ambas moléculas coeluyen. Una vez que eliminamos a los arreglos hélicos 1, 2 y 3 (residuos 202-504) del NTD_{dyn} usando solamente el NDD, realizamos el mismo experimento donde observamos el mismo resultado que el obtenido con el NTD_{dyn}, esto delimita la interacción a los primeros 201 aminoácidos de la fracción amino-terminal de la cadena pesada de la dineína. Esta podría ser la respuesta a por qué el ZIKV se une a la dineína sin dinactina ni adaptador de carga; la dinactina y los adaptadores de carga BICDR, BICD2 y HOOK3 se unen a los haces helicoidales 1, 2 y 3, la interacción que proponemos está en la "cara opuesta" de la dineína (Figura 30). Aunque no conocemos el mecanismo de esta interacción y si la unión de ZIKV promueve la procesividad de la dineína, sugerimos que es una función de transporte retrógrado. Además, la posición de NDD en el complejo le daría la capacidad de interactuar con la envoltura ZIKV, quizás durante su movimiento retrógrado (Figura 30). En comparación con estudios similares, como el de Brault et al., donde caracterizan una interacción entre Tctex-1 y prM, que podría atribuirse a un papel biológico diferente, debido a la capacidad de Tctex-1 para alojarse en diferentes compartimentos celulares (Tai et al., 1998). Shrivastava et al. atribuyen un papel de tráfico retrógrado a una interacción observada entre la cadena ligera de dineína LC8 y DENV pE, aunque no aborda claramente la ubicación de la interacción (Shrivastava et al., 2011).

Con los datos presentados mostramos una fuerte evidencia experimental que revela la interacción entre la proteína E del virus Zika y el dominio de dimerización de la dineína humana, esta interacción ocurre durante el ciclo de replicación viral entre 18 y 24 h post-infección. Con esta interacción, podemos proponer un paso no caracterizado en el ciclo de replicación viral que podría ser el objetivo para diseñar

un nuevo medicamento que detenga la propagación del virus en los pacientes actualmente infectados.

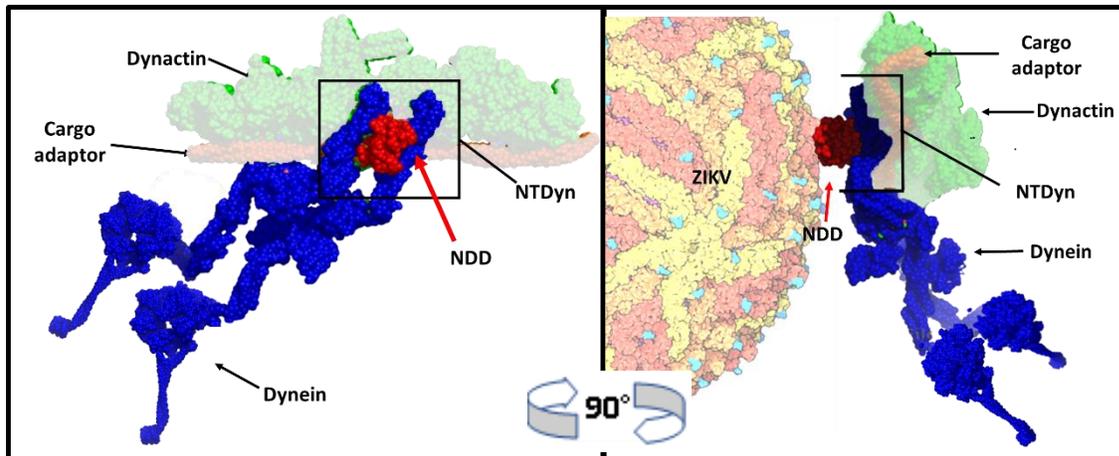


Figura 30. NDD está expuesto a la interacción ZIKV en un complejo de tráfico retrógrado. En azul, la dineína forma un complejo con la dinactina en verde, y en marrón, el adaptador de carga. Destacamos la posición del NDD en rojo dentro del complejo y su capacidad para ser reclutado por la proteína de la envoltura. Imagen modificada de PDB 3VKH y 5NW4.

10. CONCLUSIONES

Obtuvimos tres conclusiones claras de esta investigación,

1. Durante el ciclo de replicación viral la pE y la dineína interactúan durante las primeras horas de la infección y esta interacción se detiene alrededor de las 24 horas, esto concuerda con el momento en el que la partícula viral es expulsada al exterior de la célula.
2. La interacción se lleva a cabo entre la partícula viral y el NTDyn, que son los primeros 570 residuos de la cadena pesada de la dineína.
3. Delimitamos la interacción entre la partícula viral y el dominio de dimerización de la cadena pesada de la dineína (NDD), esta podría darse de manera fisiológica ya que este dominio se encuentra libre durante el tráfico retrógrado de la dineína. En ese sentido, este trabajo es clave para el estudio de la

dineína ya que si este mecanismo de transporte se presenta de forma directa esta sería la primera vez que se reporta un mecanismo similar sin necesidad de un adaptador de cargo.

11. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, es necesario conocer la afinidad de esta interacción, esto mediante resonancia superficial de plasmones o la calorimetría de titulación isotérmica. Además, es necesario abordar esta interacción desde un enfoque mecanístico, determinar si el secuestro de la dineína por el virus provoca un tráfico retrógrado independiente de dinactina y adaptador de cargamento, esto podría lograrse por crio-EM. Además, se planea identificar el punto exacto en el que la interacción es crucial durante el ciclo de replicación viral mediante la técnica de inmuno-oro. Una vez conocido este punto, también es necesario conocer si la inhibición de esta interacción puede detener el ciclo de replicación viral.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., & Hopkin Bray, D. (2011). *Biología molecular de la célula* (BUENOS AIRES: PANAMERICANA, Ed.; sexta). 579-590.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., & Escribano, J. M. (2001). African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein. *Journal of Virology*, 75(20), 9819–9827. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9819-9827.2001>
- Azam Alsemarz, Paul Lasko, & François Fagotto. (2018). Limited significance of the in situ proximity ligation assay. *BioRxiv*.
- Banerjee, I., Miyake, Y., Nobs, S. P., Schneider, C., Horvath, P., Kopf, M., Matthias, P., Helenius, A., & Yamauchi, Y. (2014). Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science*, 346(6208), 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1257037>
- Bearer, E., & Satpute-Krishnan, P. (2002). The Role of the Cytoskeleton in the Life Cycle of Viruses and Intracellular Bacteria: Tracks, Motors, and Polymerization Machines. *Current Drug Target -Infectious Disorders*, 2(3), 247–264. <https://doi.org/10.2174/1568005023342407>
- Bos, S., Viranaicken, W., Turpin, J., El-Kalamouni, C., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Desprès, P., & Gadea, G. (2018). The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology*, 516, 265–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic*, 9(8), 1268–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00767.x>
- Braut, J.-B., Kudelko, M., Vidalain, P.-O., Tangy, F., Desprès, P., & Pardigon, N. (2011). The interaction of flavivirus M protein with light chain Tctex-1 of human dynein plays a role in late stages of virus replication. *Virology*, 417(2), 369–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.022>
- Caly, L., Kassouf, V. T., Moseley, G. W., Diefenbach, R. J., Cunningham, A. L., & Jans, D. A. (2016). Fast track, dynein-dependent nuclear targeting of human immunodeficiency virus Vpr protein; impaired trafficking in a clinical isolate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(3), 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.051>
- Cao, J., Lin, C., Wang, H., Wang, L., Zhou, N., Jin, Y., Liao, M., & Zhou, J. (2015). Circovirus Transport Proceeds via Direct Interaction of the Cytoplasmic Dynein IC1 Subunit with the Viral Capsid Protein. *Journal of Virology*, 89(5), 2777–2791. <https://doi.org/10.1128/JVI.03117-14>
- Carnes, S. K., Zhou, J., & Aiken, C. (2018). HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus. *Journal of Virology*, 92(20). <https://doi.org/10.1128/JVI.00358-18>

- 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>
- Diamant, A. G., & Carter, A. P. (2013). Dynein Family Classification. In *Encyclopedia of Biophysics* (pp. 552–558). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_765
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Dodding, M. P., & Way, M. (2011). Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *The EMBO Journal*, *30*(17), 3527–3539. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.283>
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., & Sodeik, B. (2002). Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(8), 2795–2809. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0348>
- Douglas, M. W., Diefenbach, R. J., Homa, F. L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F. J., Vittone, V., Byth, K., & Cunningham, A. L. (2004). Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid Protein VP26 Interacts with Dynein Light Chains RP3 and Tctex1 and Plays a Role in Retrograde Cellular Transport. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 28522–28530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311671200>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Elshenawy, M. M., Canty, J. T., Oster, L., Ferro, L. S., Zhou, Z., Blanchard, S. C., & Yildiz, A. (2019). Cargo adaptors regulate stepping and force generation of mammalian dynein–dynactin. *Nature Chemical Biology*, *15*(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0352-0>
- Florin, L., Becker, K. A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2006). Identification of a Dynein Interacting Domain in the Papillomavirus Minor Capsid Protein L2. *Journal of Virology*, *80*(13), 6691–6696. <https://doi.org/10.1128/JVI.00057-06>
- García-Nafría, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific Reports*, *6*(1), 27459. <https://doi.org/10.1038/srep27459>
- Gibbons, I. R., & Rowe, A. J. (1965). Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science*, *149*(3682), 424–426. <https://doi.org/10.1126/science.149.3682.424>

- Habura, A., Tikhonenko, I., Chisholm, R. L., & Koonce, M. P. (1999). Interaction Mapping of a Dynein Heavy Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15447–15453. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15447>
- Henry Sum, M. S. (2015). The Involvement of Microtubules and Actin during the Infection of Japanese Encephalitis Virus in Neuroblastoma Cell Line, IMR32. *BioMed Research International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/695283>
- Jiménez García, L.F. & Merchant-Larios, H.. (2011). *Biología Celular y Molecular*. (Pearson, Ed 1ra.). 284-291.
- Johnston, C., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2013). The DpnI/DpnII pneumococcal system, defense against foreign attack without compromising genetic exchange. *Mobile Genetic Elements*, 3(4), e25582. <https://doi.org/10.4161/mge.25582>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., & Thongboonkerd, V. (2009). Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2551–2562. <https://doi.org/10.1021/pr900060g>
- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., & Zhang, Y.-J. (2009). The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 Product Interacts with Microtubules and Interferes with Their Dynamics. *Journal of Virology*, 83(13), 6375–6382. <https://doi.org/10.1128/JVI.02571-08>
- Karp, G. & Araiza Martinez, M. E. (2011). *Biología Celular y Molecular. México*. Mac Graw Hill.
- Kenneth R. Spring, Thomas J. Fellers, & Michael W. Davidson. (n.d.). *Colocalization of Fluorophores in Confocal Microscopy*. Olympus-Lifescience.Com.
- Kim, S., Kim, H.-Y., Lee, S., Kim, S. W., Sohn, S., Kim, K., & Cho, H. (2007). Hepatitis B Virus X Protein Induces Perinuclear Mitochondrial Clustering in Microtubule- and Dynein-Dependent Manners. *Journal of Virology*, 81(4), 1714–1726. <https://doi.org/10.1128/JVI.01863-06>
- Kinoshita, Y., Kambara, T., Nishikawa, K., Kaya, M., & Higuchi, H. (2018). Step Sizes and Rate Constants of Single-headed Cytoplasmic Dynein Measured with Optical Tweezers. *Scientific Reports*, 8(1), 16333. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34549-7>
- Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K., & Kurisu, G. (2012). The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature*, 484(7394), 345–350. <https://doi.org/10.1038/nature10955>
- Krishnan, M. N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J. L., Hodge, T. W., & Fikrig, E. (2007). Rab 5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses. *Journal of Virology*, 81(9), 4881–4885. <https://doi.org/10.1128/jvi.02210-06>

- Lakadamyali, M., Rust, M. J., Babcock, H. P., & Zhuang, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(16), 9280–9285. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832269100>
- Lodish Harvey, Berk, Matsudaira A., Kaiser P., Krieger C A., Scott P. (2013). *Molecular Cell Biology*. (seventh). Macmillan.
- Luthra, P., Jordan, D. S., Leung, D. W., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2015). Ebola Virus VP35 Interaction with Dynein LC8 Regulates Viral RNA Synthesis. *Journal of Virology*, *89*(9), 5148–5153. <https://doi.org/10.1128/JVI.03652-14>
- Lyman, M. G., & Enquist, L. W. (2009). Herpesvirus Interactions with the Host Cytoskeleton. *Journal of Virology*, *83*(5), 2058–2066. <https://doi.org/10.1128/JVI.01718-08>
- 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)
- Mainou, B. A., Zamora, P. F., Ashbrook, A. W., Dorset, D. C., Kim, K. S., & Dermody, T. S. (2013). Reovirus Cell Entry Requires Functional Microtubules. *MBio*, *4*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00405-13>
- Martínez-Moreno, M., Navarro-Lérida, I., Roncal, F., Albar, J. P., Alonso, C., Gavilanes, F., & Rodríguez-Crespo, I. (2003). Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Letters*, *544*(1–3), 262–267. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00516-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00516-7)
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *Journal of Cell Biology*, *159*(3), 441–452. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203150>
- 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>
- Milev, M. P., Yao, X., Berthoux, L., & Moulard, A. J. (2018). Impacts of virus-mediated manipulation of host Dynein. In *Dyneins* (pp. 214–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809470-9.00010-2>
- Mo, Y., Alferez Salada, B. M., & Tambyah, P. A. (2016). Zika virus—a review for clinicians. *British Medical Bulletin*, *119*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw023>
- Mohan, R., & John, A. (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*, *67*(6), 395–403. <https://doi.org/10.1002/iub.1384>
- Mueller, S., Cao, X., Welker, R., & Wimmer, E. (2002). Interaction of the Poliovirus Receptor CD155 with the Dynein Light Chain Tctex-1 and Its Implication for Poliovirus Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(10), 7897–7904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111937200>

- Nogales, E., Wolf, S. G., & Downing, K. H. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, *391*(6663), 199–203. <https://doi.org/10.1038/34465>
- Paniagua, R., Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, & Saéz F (2007). *Bología celular*. Mc Graw-Hill. 279-281.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, *374*(16), 1552–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- Petit, C., Giron, M.-L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., de Thé, H., & Saïb, A. (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *Journal of Cell Science*, *116*(16), 3433–3442. <https://doi.org/10.1242/jcs.00613>
- Prange1, R., & Streeck, R. E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. In *The EMBO Journal* (Vol. 14, Issue 2).
- Ramanathan, H. N., Chung, D.-H., Plane, S. J., Sztul, E., Chu, Y., Guttieri, M. C., McDowell, M., Ali, G., & Jonsson, C. B. (2007). Dynein-Dependent Transport of the Hantaan Virus Nucleocapsid Protein to the Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment. *Journal of Virology*, *81*(16), 8634–8647. <https://doi.org/10.1128/JVI.00418-07>
- Raux, H., Flamand, A., & Blondel, D. (2000). Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. *Journal of Virology*, *74*(21), 10212–10216. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.21.10212-10216.2000>
- 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>
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K., & Burgess, S. A. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(11), 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm3667>
- Salvador, F. S., & Fujita, D. M. (2016). Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *14*(1), 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2015.10.004>
- Scherer, J., Yi, J., & Vallee, R. B. (2020). Role of cytoplasmic dynein and kinesins in adenovirus transport. *FEBS Letters*, *594*(12), 1838–1847. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13777>
- Schmidt, H., & Carter, A. (2016). Structure and Mechanism of the Dynein Motor ATPase. *Biopolymers*, *105*. <https://doi.org/10.1002/bip.22856>
- Seksek, O., Biwersi, J., & Verkman, A. S. (1997). Translational Diffusion of Macromolecule-sized Solutes in Cytoplasm and Nucleus. *Journal of Cell Biology*, *138*(1), 131–142. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.131>

- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J., & Gao, G. F. (2018). Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *Journal of Molecular Biology*, *430*(7), 948–962. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.006>
- 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), e25229-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025229>
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, *352*(6284), 467–470. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl_10), S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Tai, A. W., Chuang, J.-Z., & Sung, C.-H. (1998). Localization of Tctex-1, a Cytoplasmic Dynein Light Chain, to the Golgi Apparatus and Evidence for Dynein Complex Heterogeneity*. <http://www.jbc.org>
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T.-S., Lim, X.-X., Zhang, S., Lim, X.-N., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C., Corti, D., & Lok, S.-M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature Communications*, *11*(1), 895. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Urnavicius, L., Lau, C. K., Elshenawy, M. M., Morales-Rios, E., Motz, C., Yildiz, A., & Carter, A. P. (2018). Cryo-EM shows how dynactin recruits two dyneins for faster movement. *Nature*, *554*(7691), 202–206. <https://doi.org/10.1038/nature25462>
- Urnavicius, L., Zhang, K., Diamant, A. G., Motz, C., Schlager, M. A., Yu, M., Patel, N. A., Robinson, C. v., & Carter, A. P. (2015). The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science*, *347*(6229), 1441–1446. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4080>
- Wang, X., Olberding, K. E., White, C., & Li, C. (2011). Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *18*(1), 38–47. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.68>
- Wu, Y., Wei, F., Tang, L., Liao, Q., Wang, H., Shi, L., Gong, Z., Zhang, W., Zhou, M., Xiang, B., Wu, X., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Zeng, Z., Xiong, F., & Guo, C. (2019). Herpesvirus acts with the cytoskeleton and promotes cancer progression. *Journal of Cancer*, *10*(10), 2185–2193. <https://doi.org/10.7150/jca.30222>
- Xiang, X., Qiu, R., Yao, X., Arst Jr, H. N., Peñalva, M. A., & Zhang, J. (2015). Cytoplasmic dynein and early endosome transport. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *72*(17), 3267–3280. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1926-y>
- Ye, G.-J., Vaughan, K. T., Vallee, R. B., & Roizman, B. (2000). The Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Interacts with a Cytoplasmic Dynein Intermediate Chain and Targets Nuclear Membrane. *Journal of Virology*, *74*(3), 1355–1363. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1355-1363.2000>

- Yildiz, A. (2018). Single-molecule dynein motor mechanics in vitro. In *Dyneins* (pp. 112–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809470-9.00005-9>
- Zaichick, S. V., Bohannon, K. P., Hughes, A., Sollars, P. J., Pickard, G. E., & Smith, G. A. (2013). The Herpesvirus VP1/2 Protein Is an Effector of Dynein-Mediated Capsid Transport and Neuroinvasion. *Cell Host & Microbe*, *13*(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.009>
- Zhang, K., Foster, H. E., Rondelet, A., Lacey, S. E., Bahi-Buisson, N., Bird, A. W., & Carter, A. P. (2017). Cryo-EM Reveals How Human Cytoplasmic Dynein Is Auto-inhibited and Activated. *Cell*, *169*(7), 1303–1314.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.025>
- Żyłkiewicz, E., Kijańska, M., Choi, W.-C., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., & Stukenberg, P. T. (2011). The N-terminal coiled-coil of Ndel1 is a regulated scaffold that recruits LIS1 to dynein. *Journal of Cell Biology*, *192*(3), 433–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011142>