



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Análisis *in silico* y proteómico de las interacciones proteicas
de NS3 de virus Zika en el núcleo celular”

TESIS

QUE PRESENTA

QFB RODOLFO MARTÍNEZ CARRANZA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

DIRECTORAS DE TESIS

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NUÑEZ DE CÁCERES

DRA. MARIA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL, 2024

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel y la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Este trabajo fue asesorado por la Dra. Patricia Talamás Rohana y la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano profesoras e investigadoras del CINVESTAV unidad Zacatenco.

Tutoras

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Asesoras

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

CVU

1077125

Dedicatoria

A mi padre, Jorge Martínez Navarrete:

Estés donde estés, este trabajo y todos mis futuros logros también serán tuyos. Aunque probablemente nunca más nos volveremos a ver, siempre será un orgullo que hayas sido mi padre y haber coincidido contigo en esta vida. Algún día nos reuniremos como energía en algún lugar del universo.

Índice

Resumen	7
Abstract	8
1.0 Introducción.....	9
1.1 Virus Zika (ZIKV).....	9
1.1.1 Historia y epidemiología	9
1.1.2 Transmisión.....	10
1.1.3 Patología.....	12
1.2 Aspectos moleculares	14
1.2 Bioinformática.....	18
1.2.1 Modelado por homología	19
1.2.2 Simulaciones de dinámica molecular (MD).....	19
2.0 Antecedentes.....	22
2.1 Interacción virus - núcleo celular.....	22
2.1.1 Flavivirus: ciclo replicativo	24
2.2 Presencia de la NS3 en núcleo celular	26
2.3 Estructura tridimensional NS3 de ZIKV.....	28
3.0 Justificación	30
4.0 Hipótesis.....	30
5.0 Objetivos.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
5.2.1 <i>In vitro</i>	31
5.2.2 <i>In silico</i>	31
6.0 Metodología	32
6.1 <i>In vitro</i>	32
Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV	32
Fraccionamiento subcelular	32
Extracto de proteínas totales.....	32
Análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.....	33
Inmunoprecipitación	34

6.2 Análisis bioinformático <i>In silico</i>	34
Revisión sistemática	34
Búsqueda de homologías y STRING	35
Modelado por homología	35
Validación de los modelos tridimensionales.....	36
7.0 Resultados	39
7.1 Estudio de interacciones NS3 – proteínas nucleares	39
7.2 Bioinformática estructural	53
8.0 Discusión	65
8.1 Estudio de interacciones NS3 – proteínas nucleares	65
8.2 Bioinformática estructural	72
9.0 Conclusiones	77
10.0 Perspectivas	78
10.1 <i>In vitro</i>	78
10.2 <i>In silico</i>	78
Anexo 1	79
Referencias	80

Resumen

El virus Zika (ZIKV) es un flavivirus que ha ganado interés por parte de la comunidad científica a partir de brotes epidémicos suscitados en los años 2013, 2014 y 2015, así como el nombramiento, por parte de la organización mundial de la salud (OMS), de la infección como una emergencia de salud pública de importancia internacional. Esto ha llevado a un crecimiento en la cantidad de estudios realizados en ZIKV, los cuales tienen como puntos fundamentales la búsqueda de fármacos antivirales, la caracterización del ciclo replicativo, la patología y aquellos mecanismos moleculares asociados. Dentro de estos tópicos es de gran interés lo concerniente a la proteasa del flavivirus, debido a su participación en el procesamiento de la poliproteína viral, así como su influencia sobre el ciclo replicativo. Actualmente, se han reportado hallazgos donde se demuestra que la proteasa de los flavivirus es capaz de modificar el microambiente celular al alterar las proteínas del hospedero para favorecer su ciclo replicativo, así como también se han reportado interacciones independientes a la actividad de proteasa. Varios grupos de investigación, incluyendo al nuestro, han reportado la presencia de la proteína NS2B3 de flavivirus, incluyendo la de ZIKV, en el núcleo celular, así como también su interacción con distintas moléculas nucleares. No obstante, son pocos los detalles que se conocen sobre el posible papel funcional de la proteína NS2B3 en este compartimento celular.

A la fecha, no existe una estructura dilucidada para esta proteína, por dicho motivo, en este trabajo se pretende modelar por homología la estructura tridimensional para la NS2B3, así como sus componentes independientes, las proteínas NS2B y NS3. De igual manera se pretende estandarizar un protocolo que permita identificar las interacciones de la proteína NS2B3 de ZIKV con componentes nucleares, mediante el aislamiento, purificación y posterior análisis por *Western Blot* de las fracciones nucleares infectadas.

Abstract

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus that has gained interest from the scientific community due to the epidemic outbreaks occurred in 2013, 2014 and 2015, as well as the Worldwide Health Organization's (WHO) declaration of a Public Health Emergency of International Concern regarding ZIKV and its related diseases. This has led to a growth in the quantity of studies done with ZIKV, whose main objectives are the research and development of new antiviral drugs, characterization of its replicative cycle, pathology, and molecular mechanisms. Within these topics the flaviviral protease is of big concern due to its participation in the polyprotein processing and its involvement in the replicative cycle. Currently, findings where the flaviviral protease can modify the cellular microenvironment by altering host proteins to favor the replicative cycle, as well as independent protease activities have been reported. Several research groups, including ours, have described the flaviviral NS2B3 protein presence, including ZIKV's, inside the cellular nucleus as well as interaction with several nuclear molecules. Nevertheless, very few details about NS2B3 functional paper in the nucleus are known.

To date, the structure of the flaviviral NS2B3, including ZIKV's, and its individual protein components, NS3 and NS2B, has not been elucidated, for that reason this work is intended to generate a tridimensional structure of ZIKV's NS2B3 by homology modeling. At the same time, the aim is to standardize a protocol that will allow to identify interactions between ZIKV's NS2B3 and nuclear components, by the isolation, purification, and Western Blot analysis of infected nuclear fractions.

1.0 Introducción

1.1 Virus Zika (ZIKV)

1.1.1 Historia y epidemiología

El virus Zika (ZIKV) fue aislado por primera vez en abril de 1947, a partir de un mono Rhesus, marcado como Rhesus 766, durante la realización del programa de la fundación Rockefeller para la investigación de la fiebre amarilla, realizado en el bosque Zika de Uganda (Hayes, 2009; Kindhauser et al., 2016). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1952 se detectaron los primeros casos en humanos localizados en Uganda y Tanzania en los que se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes (Dick et al., 1952; Smithburn, 1952), y en India en 1954 se demostró la presencia del virus en humanos (Smithburn et al., 1954).

Por un amplio periodo se consideró que las infecciones por ZIKV estaban limitadas geográficamente en África y Asia. Hasta el año de 2007 sólo había 16 casos reportados y confirmados, a nivel mundial, por aislamiento viral (Kindhauser et al., 2016). Sin embargo, en este mismo año se reportó un brote en las Islas de Yap, pertenecientes a los Estados Federados de Micronesia (Duffy et al., 2009). Posteriormente, dos brotes epidémicos fueron reportados entre 2013 y 2014 en la Polinesia Francesa los cuales afectaron a más de 30,000 personas (Musso et al., 2018). En este mismo periodo hubo reportes de brotes en Nueva Caledonia, Islas Cook, Islas Salomón, Samoa, Vanuatu y las Islas de Pascua en Chile (Agumadu & Ramphul, 2018). En marzo de 2015 se reportó en Brasil un amplio brote de síntomas que pronto fueron identificados como infección por ZIKV (Lowe et al., 2018). En 2016 la infección por ZIKV, debido a sus implicaciones patológicas, fue declarada por la OMS como emergencia de salud pública de importancia internacional (Chakhtoura et al., 2018).

A la fecha del último reporte epidemiológico sobre ZIKV por parte de la OMS, realizado en febrero de 2022, se reporta la transmisión autóctona confirmada de ZIKV en 89 países (World Health Organization [WHO], 2022). Mientras que la Organización Panamericana de Salud (PAHO, por sus siglas en inglés) registró 40,249 reportes de casos de zika en el año 2022, en la región de las américas. En 2023, hasta la semana epidemiológica 21, han sido reportados 8758 casos (Pan American Health Organization [PAHO], 2023). En México, la Dirección General de Epidemiología, institución dependiente de la Secretaría de Salud, en su boletín de “Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa”, desde el 2015 y hasta la semana epidemiológica 22 de 2023, reporta un total de 13,005 casos de los cuales 7,152 corresponden a mujeres embarazadas (Ceballos Liceaga & Carbajal Sandoval, 2023).

1.1.2 Transmisión

El ZIKV se clasifica como un “arbovirus”, término que proviene del inglés “*arthropod-borne virus*”, los cuales pueden ser transmitidos por vectores artrópodos como mosquitos, garrapatas y moscas de la arena (Beckham & Tyler, 2015). En el caso de ZIKV se han reportado como vectores distintos mosquitos del género *Aedes*, algunos de ellos son: *Aedes africanus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis*, *Aedes vittatus* y *Aedes unilineatus* (Agumadu & Ramphul, 2018; Gorshkov et al., 2019). El ciclo de transmisión del ZIKV se muestra gráficamente en la Figura 1.

El ciclo de transmisión se divide en dos partes, las cuales pueden ser nombradas de diferente manera dependiendo de la bibliografía:

- Ciclo enzoótico y ciclo epidémico (Pielnaa et al., 2020)
- Ciclo selvático y ciclo urbano (Valentine et al., 2019)

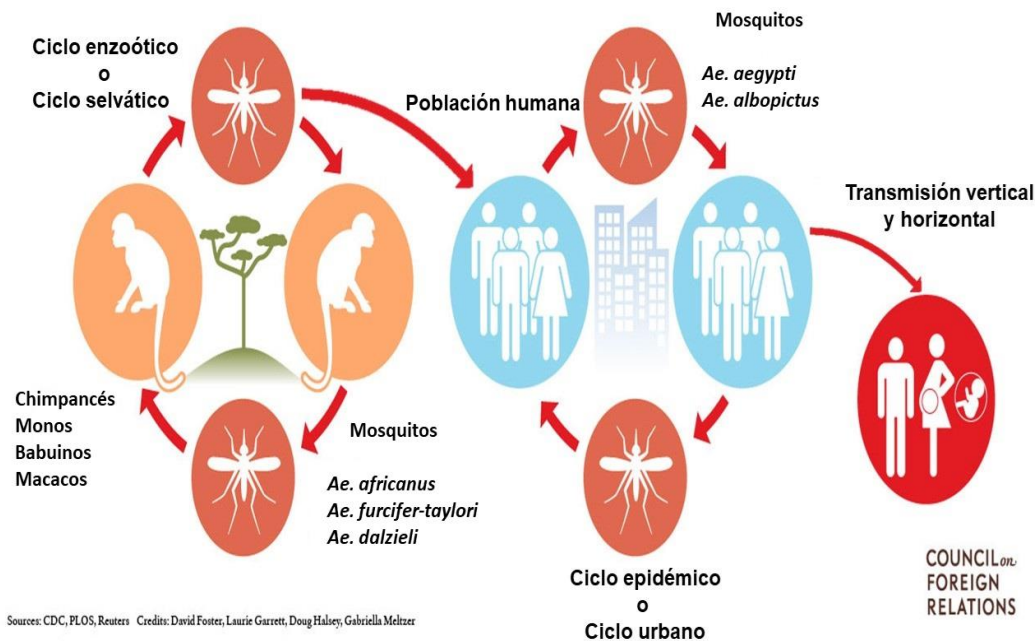


FIGURA 1. CICLO DE TRANSMISIÓN DEL ZIKV

Imagen tomada y modificada de (Renwick, 2016). El ciclo de transmisión del ZIKV consta de:

- a) Un ciclo selvático o enzoótico, que sucede en primates no humanos
- b) Un ciclo epidémico o urbano, el cual toma lugar cuando el virus es transmitido a humanos
- c) Transmisión vertical y/o horizontal entre humanos

De acuerdo con la agencia de “Centros para el control y la prevención de enfermedades” (CDC, por sus siglas en inglés) el ciclo selvático o enzoótico involucra la transmisión del virus entre primates no humanos y especies de mosquitos que se encuentran en la cubierta forestal. El virus es transmitido por mosquitos a los humanos cuando ambos entran en contacto debido a la presencia de este último en el ambiente selvático. El ciclo urbano o epidémico ocurre cuando existe una transmisión entre humanos y mosquitos urbanos, principalmente *Aedes aegypti*. En el caso del ZIKV, se ha demostrado la existencia de un ciclo selvático en África (Rather et al., 2017; Valentine et al., 2019), sin embargo, a la fecha no se tiene información sobre la posible

existencia de este ciclo en América y Asia (Gutiérrez-Bugallo et al., 2019), lo que hace necesario llevar a cabo investigación en este tema y sus posibles repercusiones a futuro. El ciclo urbano del ZIKV ha sido descrito en África, América y Oceanía, y se han reportado seis vectores diferentes: *Ae. Aegypti*, *Aedes (Stegomyia) albopictus*, *Culex (Culex) quinquefasciatus*, *Aedes (Aedimorphus) vexans*, *Culex (Culex) coronator* y *Culex (Culex) tarsalis* (Gutiérrez-Bugallo et al., 2019). Adicional a estos ciclos que involucran mosquitos, la transmisión vertical y horizontal humano – humano ha sido demostrada. Hoy en día se sabe que el ZIKV es transmisible vía contacto sexual, transfusión sanguínea y transmisión transplacentaria y perinatal (Gregory et al., 2017).

1.1.3 Patología

Se estima que aproximadamente el 80% de los casos de infección con ZIKV son asintomáticos (Gorshkov et al., 2019). En caso de presentar síntomas, los cuales suelen ser leves, estos son similares a los ocasionados por otros arbovirus como dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV), por este motivo es necesario un diagnóstico diferencial para detectar la infección por ZIKV.

Los casos sintomáticos se pueden clasificar en tres de acuerdo con los síndromes desarrollados por el paciente (Ritter et al., 2017): Fiebre Zika, síndromes neurológicos no congénitos y síndrome Zika congénito.

1.1.3.1 Fiebre Zika

Esta es la sintomatología más común y suele presentarse entre tres y doce días posteriores a la infección, los síntomas son: urticaria papular o macular (90%), fiebre de bajo grado (70%), artralgia (60-70%), fatiga (70%), conjuntivitis no purulenta o hiperemia conjuntival (55%), mialgia (45%) y otros menos frecuentes como dolor retro orbital, edema periférico,

linfadenopatía, dolor de garganta, úlceras aftosas, leucopenia, trombocitopenia, enzimas hepáticas elevadas, vómito y malestares gastrointestinales y genitourinarios, la infección aguda es moderada y autolimitante, estos síntomas pueden durar entre dos y siete días (Agumadu & Ramphul, 2018; Barzon et al., 2016a; Basarab et al., 2016; Ritter et al., 2017; Sharma et al., 2020).

1.1.3.2 Síndrome neurológico no congénito

Durante el brote epidémico ocurrido en la Polinesia Francesa durante 2013-2014, se identificó un incremento en la incidencia de anomalías del sistema nervioso central (Marcellin et al., 2022). Algunas de las complicaciones observadas son: encefalitis/meningoencefalitis, encefalomiелitis aguda diseminada, mielitis, vasculopatía, infarto isquémico, convulsiones, polineuropatía sensorial y principalmente síndrome de Guillain-Barre (GBS, por sus siglas en inglés) (Carod-Artal, 2018).

De acuerdo con la PAHO (2016), el GBS es “una polirradiculoneuropatía inflamatoria aguda de evolución rápida y potencialmente fatal, es una enfermedad autoinmune, autolimitada, desencadenada generalmente por un proceso infeccioso”. Es una enfermedad rara cuya incidencia global anual es de 1-2 casos por cada 100,000 personas (Leonhard et al., 2019).

Según las estadísticas reportadas por Muñoz et al (2017), durante el brote ocurrido en la Polinesia Francesa, se registraron 42 casos de GBS en contraste con los 3-8 casos promedio anuales. En Brasil, entre noviembre de 2015 y enero de 2016, se registraron 1,708 casos, mientras que en Colombia hubo 320 casos en el periodo de noviembre de 2015 a marzo de 2016, lo cual representa un incremento del 211% con respecto a la incidencia anual de 0.49 casos/100,000 habitantes.

1.1.3.3 Síndrome Zika congénito

En Brasil, además de lo ya mencionado anteriormente, se reportaba un incremento en los casos de microcefalia, nacimiento de niños muertos, y malformaciones cerebrales. En el periodo de tiempo correspondiente a noviembre de 2015 – febrero de 2016 se reportó que aproximadamente el 90% de 1501 recién nacidos fueron diagnosticados con microcefalia (Marcellin et al., 2022). En el año 2016 la WHO declaró la infección por ZIKV como causante de la microcefalia y dichas malformaciones. Esta amplia gama de anomalías neurológicas asociadas a la infección con ZIKV se le conoce como “Síndrome Zika congénito” (CZS, por sus siglas en inglés). De acuerdo con la CDC (2022), a pesar de que varias de las anomalías ocasionadas por el CZS pueden observarse debido a otras infecciones durante el embarazo, hay cinco que son características para la infección por ZIKV (Moore et al., 2017):

- Microcefalia severa
- Disminución del tejido cerebral con patrón específico de daño y calcificaciones subcorticales
- Daño en la parte ocular posterior
- Contracturas congénitas, como pie equino y artrogriposis
- Hipertonía

1.2 Aspectos moleculares

El ZIKV pertenece al género de los *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*, es un virus envuelto icosaédrico de 50 nm de diámetro que tiene similitud con otros patógenos humanos como el DENV, el virus del Nilo occidental (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV), por mencionar algunos (Hasan et al., 2018; Pan et al., 2021).

Pertenece al grupo IV de la clasificación de Baltimore, es decir, su material genético consta de una cadena de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA+), con una longitud de aproximadamente 10.7 kilobases (Kb) y un único marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) el cual está flanqueado por regiones no traducidas (UTRs, por sus siglas en inglés) 5' y 3', y un CAP tipo 1 en el extremo 5', además de que carece de una cola de poliA en el extremo 3' (Golubeva et al., 2020; Lin et al., 2017). A partir de este ORF se codifica una única poliproteína, de una longitud de 3423 residuos de aminoácidos, la cual al ser procesada da lugar a tres proteínas estructurales, proteína de cápside (C), proteína de premembrana/membrana (prM/M) y proteína de envoltura (E), y a siete proteínas no estructurales (NS, por sus siglas en inglés), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Golubeva et al., 2020; Lin et al., 2017; Valente & Moraes, 2019).

Al ser procesada la poliproteína se generan las siguientes proteínas funcionales (Armstrong et al., 2017; Barzon et al., 2016b; Hasan et al., 2018; Hilgenfeld, 2016; Lin et al., 2017; Ngan et al., 2019; B. H. Song et al., 2017; Valente & Moraes, 2019; Zhang et al., 2019):

Proteínas estructurales

- 1) La proteína C tiene una secuencia de ~100 residuos de aminoácidos (12 kDa), es necesaria en el proceso de encapsulación viral y es un homodímero simétrico compuesto de un dominio de unión a RNA para la conformación del núcleo de los viriones, y un dominio hidrofóbico para la dimerización y la interacción con la membrana.
- 2) La proteína prM es una glicoproteína con una secuencia de ~165 residuos de aminoácidos (20 kDa), consta de un dominio pr N-terminal, un autodomino central y un dominio transmembranal C-terminal. Esta proteína en el virión es escindida por la proteasa celular furina en el dominio pr terminal, esto resulta en la obtención de partículas virales infecciosas, además esta proteína podría estar actuando como chaperona para promover el plegado y el ensamblaje de las proteínas E.

- 3) La proteína E es una glicoproteína de ~495 aminoácidos (53kDa) la cual contiene varios sitios de unión a receptores y un péptido de fusión, por lo que ésta es la proteína responsable del reconocimiento de receptores celulares y la entrada de cofactores, consta de un dominio transmembranal y tres ectodominios conocidos como DI, DII y DIII.

Proteínas no estructurales

- 1) La proteína no estructural 1 (NS1) tiene una secuencia de ~352 residuos de aminoácidos (~ 46 – 55 KDa), es un homodímero glicosilado que se localiza en el retículo endoplásmico, participa en la maduración del virus e interactúa con las proteínas prM y E, y forma parte del complejo de replicación, por lo que es necesaria para la replicación del genoma viral. Esta proteína también es secretada al medio extracelular para modular la respuesta inmune del hospedero.
- 2) NS2A es una proteína pequeña e hidrofóbica formada por 225 residuos de aminoácidos (~25 kDa), cuya función es participar en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, es parte del complejo de replicación y recluta el RNA viral en este complejo.
- 3) NS2B es una proteína transmembranal conformada por 130 residuos de aminoácidos (14 KDa), actúa como cofactor de NS3, tiene un dominio hidrofílico central que funciona como chaperona para la NS3, su dominio hidrofóbico sirve como anclaje del complejo NS2B – NS3 (NS2B3) con el retículo endoplásmico.
- 4) NS3 es la proteasa viral del ZIKV, formada por 617 residuos de aminoácidos (69kDa), consta de dos dominios: el dominio N terminal, junto a su cofactor, funciona como proteasa viral (serinproteasa) que se encarga de procesar la poliproteína, mientras que el dominio C terminal posee actividad de helicasa y NTPasa.

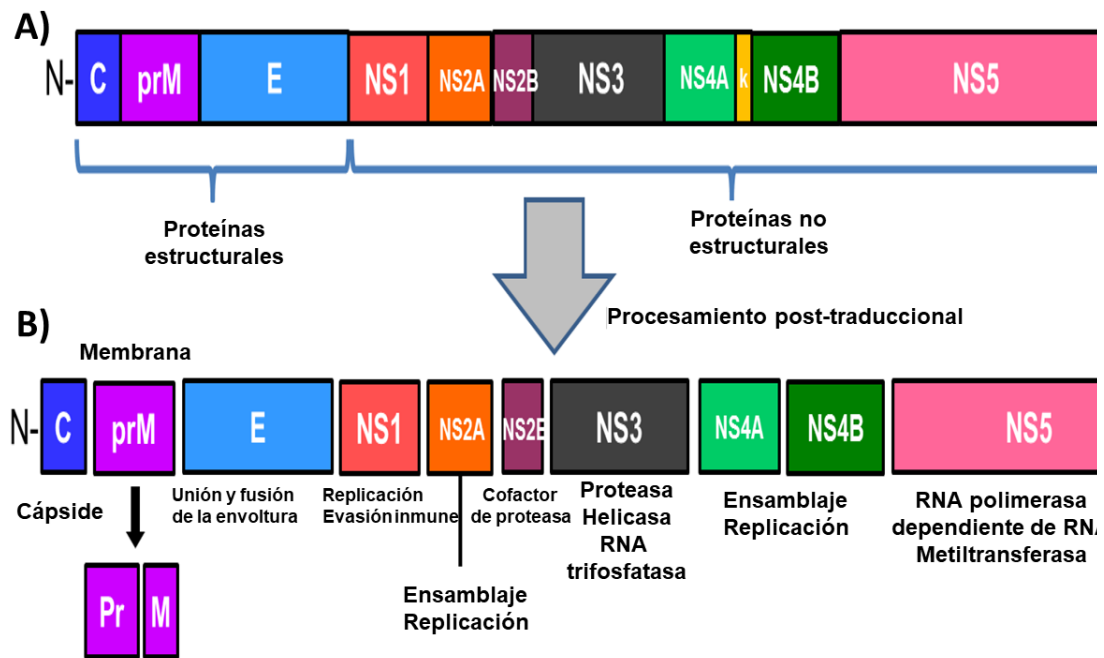


FIGURA 2. POLIPROTEÍNA DEL ZIKV Y SU PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL

Imagen tomada y modificada de (Lee & Shin, 2019):

- A) La poliproteína está constituida por una secuencia que contiene 10 proteínas, las cuales pueden clasificarse como: Proteínas estructurales y proteínas no estructurales.
- B) El procesamiento de la poliproteína da lugar a 10 proteínas funcionales.
- 5) La NS4A compuesta por 150 residuos de aminoácidos (~16 kDa) es una proteína que funciona como cofactor de la NS3, mientras que la NS4B formada por 251 residuos de aminoácidos (~21.5k Da) participa en la inhibición de las vías JAK-STAT y RLR.
- 6) NS5 es la proteína más grande, compuesta de 903 residuos de aminoácidos (~103 kDa), y la más conservada entre los flavivirus, cuenta con dos dominios estructurales y funcionales: el dominio de RNA metiltransferasa (MTasa) en el N terminal y el dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) en el C terminal.

1.2 Bioinformática

Históricamente se considera que Margaret O. Dayhoff es la madre de esta ciencia, debido a su papel en el desarrollo de matrices para el análisis de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (Hunt, 1984). Este avance ha permitido, hoy en día, el desarrollo de computadoras que sean capaces de determinar secuencias peptídicas, programas para el uso en cristalografía de rayos X y métodos computacionales que permiten la comparación de secuencias (Diniz & Canduri, 2017). De acuerdo con la definición dada por el *National Human Genome Research Institute*, la bioinformática es “una subdisciplina científica que involucra el uso de tecnología computacional para recolectar, almacenar, analizar y diseminar información biológica, como secuencias de DNA y aminoácidos, o cualquier información relacionada a estas” (NIH, 2023).

La bioinformática ha ayudado a encontrar diversas soluciones en distintas áreas de la ciencia: la predicción de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas, diseño de fármacos, simulación de interacciones moleculares, etc. (Xu et al., 2015). Algunas de estas herramientas que han permitido solucionar diversos problemas en el área biológica son: el modelado por homología y las simulaciones de dinámica molecular. En conjunto, estas técnicas, nos permiten realizar estudios de bioinformática estructural de distintas biomoléculas, principalmente proteínas, con la finalidad de obtener más información sobre su comportamiento y su arreglo tridimensional (Martí & Turjanski, 2009). A continuación se dará una descripción general sobre las principales familias de técnicas empleadas y posteriormente se hablará más a detalle sobre sus especificaciones técnicas.

1.2.1 Modelado por homología

De acuerdo con lo publicado en el capítulo “*Homolgy Modeling*” del manual “*Methods in Molecular Biology*” el modelado por homología se describe como “un método *in silico* que predice la estructura terciaria de una secuencia de aminoácidos problema, basado en una molécula homóloga cuya estructura ha sido determinada experimentalmente”. Este método se basa en las observaciones que indican que la estructura terciaria de una proteína se encuentra mejor conservada que la secuencia (J. M. Walker, 2012). El modelado por homología es un método computacional que se considera como el más preciso de todos los métodos computacionales de predicción estructural (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019). El algoritmo puede variar entre los diferentes métodos de modelado por homología.

Aunque se ha hecho mucho progreso en el campo de la resolución de estructuras tridimensionales, actualmente, en el *Protein Data Bank* (PDB) sólo existen aproximadamente 20 mil estructuras proteicas dilucidadas experimentalmente, sin embargo no se compara con las, aproximadamente, 850 mil secuencias encontradas en las bases de datos de SWISS-PROT y TrEMBL (Schwede et al., 2003). La importancia de esta metodología radica en el conocimiento que otorga conocer la estructura y la conformación de una biomolécula, gracias a que la información obtenida de éstas permite diseñar experimentos de manera más específica y eficaz.

1.2.2 Simulaciones de dinámica molecular (MD)

De acuerdo con lo descrito por Zhou y colaboradores (K. Zhou & Liu, 2022) “las simulaciones computacionales cierran la brecha existente entre la teoría y la experimentación al proporcionar una rutina sólida con la cual es posible

investigar las respuestas estáticas y/o dinámicas que presenta un sistema bajo ciertas condiciones. En dichas simulaciones, se construye un sistema basado en teorías y modelos matemáticos, y la solución a las ecuaciones es calculada mediante una computadora siguiendo los algoritmos adecuados.”

En la práctica, tener información a nivel atómico sobre el comportamiento de una biomolécula es de gran ayuda para comprender factores como el mecanismo de interacción con otras moléculas, su comportamiento aislado, su estabilidad, etc. Sin embargo son datos muy difíciles de obtener de manera experimental, por lo que se recurre al uso de las simulaciones computacionales. Las simulaciones de MD son capaces de predecir cómo será el movimiento de cada uno de los átomos de un sistema molecular con el paso del tiempo, todo esto basado en modelos generales que son capaces de describir la física de cada una de las interacciones interatómicas existentes en dicho sistema en estudio (Karplus & McCammon, 2002).

Una simulación de MD tiene el siguiente enfoque (Frenkel & Smit, 2002):

- 1) Se prepara una muestra: Se selecciona un sistema modelo formado por N número de partículas
- 2) Equilibrar el sistema: Se resuelven las ecuaciones de Newton hasta que las propiedades del sistema ya no cambien con el tiempo
- 3) Se lleva a cabo la medición de las propiedades de interés.

Un pilar fundamental de las simulaciones de MD es el campo de fuerza, el cual determina las reglas del movimiento de los átomos en estudio. El campo de fuerza es un archivo que contiene fórmulas y datos relevantes respecto a interacciones atómicas y su energía potencial: enlaces, ángulos, ángulos diedros, ángulos diedros impropios, interacciones de Van der Waals y electrostáticas. Es importante mencionar que la información de un campo de fuerza son aproximaciones empíricas refinadas mediante mecánica cuántica, sin embargo, las interacciones están basadas en modelos de resortes y potenciales clásicos (Leyes de Hooke y de Coulomb), y también toman en cuenta reportes experimentales de diversos grupos de investigación. Algunos

ejemplos de los distintos campos de fuerza utilizados en dinámica molecular son: CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) 36, CHARMM 27, AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), Parm 94, GROMOS (*GROningen MOlecular Simulation*) 11, GROMOS 87 y OPLS (*Optimized Potentials for Liquids Simulations*) (Chmiela et al., 2018; González, 2011; Hess et al., 2019; Hornak et al., 2006; Scott et al., 1999).

2.0 Antecedentes

2.1 Interacción virus - núcleo celular

Desde finales de 1990 es bien sabido que distintos tipos de virus tienen una interacción directa con el núcleo de su célula hospedera. Por ejemplo, se sabe que todos los virus de DNA que infectan animales, con excepción de la familia Poxviridae, utilizan la maquinaria de transporte nuclear de la célula, y posteriormente ingresan su genoma a través del poro nuclear para poder replicarse (Kasamatsu & Nakanishi, 1998). Algunos ejemplos de interacción con el núcleo son los siguientes:

- Familia *Papovaviridae* (Craighead, 2000): Los viriones son transportados en vesículas desde el citoplasma hasta el núcleo, posiblemente a través de los poros nucleares. Los papovavirus se desarrollan en el núcleo y posteriormente regresan al citoplasma.
- Familia *Parvoviridae* (Mattola et al., 2022) : Las cápsides ingresan al núcleo después de que una secuencia de localización nuclear y un dominio de fosfolipasa A₂ en la superficie de la cápside son expuestos vía endosomal. El genoma parvoviral se replica durante la fase S del ciclo celular, seguido por el ensamblaje nuclear de las cápsides y posterior egreso durante la degradación de la envoltura nuclear debido a su degradación durante la apoptosis.
- Familia *Herpesviridae* (Döhner et al., 2021): Las cápsides se posicionan cerca del núcleo donde las proteínas tegumento asociadas a la cápside interactúan con las nucleoporinas permitiendo una orientación de la cápside hacia el poro nuclear permitiendo la inyección del genoma viral en el nucleoplasma para su transcripción y replicación. Posteriormente las proteínas alteran la conformación de la lámina nuclear y las nucleocápsides interactúan con la membrana nuclear en un mecanismo complejo que permite el egreso nuclear de las partículas.
- Adenovirus (Al-Wassiti et al., 2021): El dsDNA de los adenovirus está covalentemente unido a una proteína terminal (TP) en su extremo 5'. Se ha

reportado que esta proteína tiene una señal de localización nuclear que facilita el importe hacia el núcleo. Al parecer el DNA viral utiliza su TP como un ancla en la matriz nuclear lo que aumenta su estabilidad extracromosomal y mejora la expresión de los genes adenovirales.

- Hepadnavirus (Long et al., 2017): El genoma viral de los hepadnavirus se sintetiza como una molécula de DNA relajada circular (rcDNA) y posteriormente se convierte en la forma circular covalentemente cerrada (cccDNA) la cual es el molde para la transcripción viral. Este procedimiento al parecer es llevado a cabo por la maquinaria de reparación de DNA del núcleo de la célula hospedera. En específico se ha reportado que las DNA ligasas 1 y 3 pueden estar participando en este fenómeno.

Otros tipos de virus que utilizan al núcleo de la célula infectada son los miembros de la familia *Retroviridae*, cuyos integrantes requieren integrarse en los cromosomas del hospedero como un paso obligado en su ciclo replicativo (Matreyek & Engelman, 2013). Uno de los retrovirus más estudiados es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, por sus siglas en español), cuya nucleocápside viaja desde la periferia del citoplasma hacia el núcleo, la cápside es capaz de entrar a través del complejo de poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés), y la retro transcripción, que inicia en el citoplasma, finaliza en el núcleo (Shen et al., 2021).

Entre los virus de RNA encontramos aquellos pertenecientes al grupo IV y V de la clasificación de Baltimore, es decir RNA monocatenario de polaridad positiva (+) ssRNA y virus de RNA monocatenario de polaridad negativa (-) ssRNA, respectivamente, los cuales tienen como sitio primario de replicación el citoplasma, y a pesar de que se ha reportado su interacción con componentes nucleares y nucleolares, la razón de esta interacción no es obvia a primera vista (Hiscox, 2007). Se sabe que los virus de RNA no requieren ingresar su genoma al núcleo celular para replicarse, pero pueden necesitar componentes nucleares como algunas proteínas de unión a RNA (E. J. Walker & Ghildya, 2017). El ingreso de algunas proteínas virales, como proteasas, al

núcleo celular en general tiene como consecuencia la interrupción de la transcripción de la célula hospedera, así como de las respuestas antivirales innatas (Flather & Semler, 2015).

2.1.1 Flavivirus: ciclo replicativo

En el género *Flavivirus* se clasifican virus pertenecientes a la clasificación IV de Baltimore, que incluye a patógenos humanos clínicamente relevantes como el DENV, WNV, JEV, virus de la fiebre amarilla (YFV), virus de la encefalitis por garrapatas (TBE). Su proceso de replicación ha sido ampliamente estudiado, y ha mostrado una considerable redistribución de las membranas del hospedero para facilitar una replicación más eficiente en el citoplasma celular (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017). Su ciclo de replicación se muestra en la figura 3.

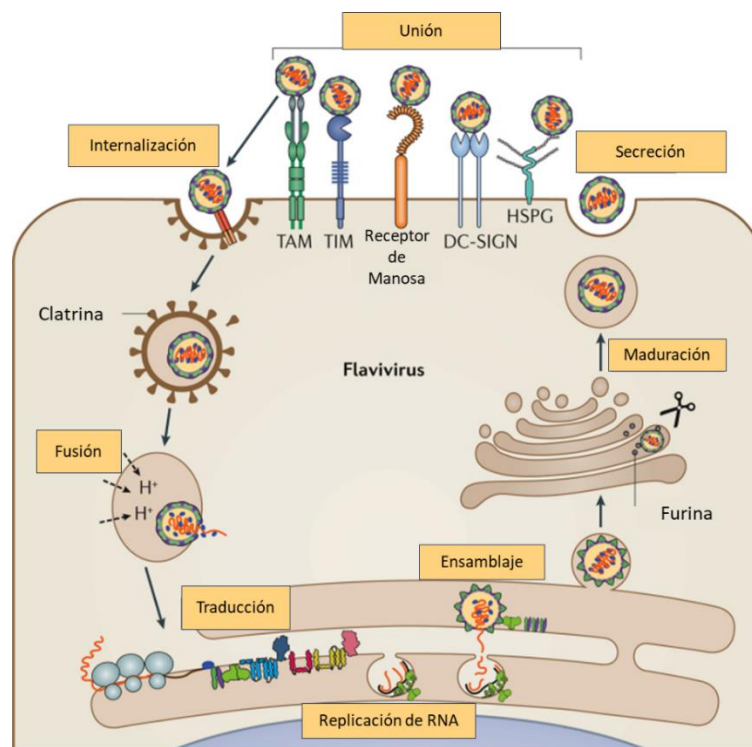


FIGURA 3 CICLO REPLICATIVO DE LOS FLAVIVIRUS

Imagen tomada y modificada de (Neufeldt et al., 2018): El ciclo replicativo de los flavivirus se puede acotar en etapas específicas: Unión, internalización, fusión, traducción, replicación del DNA, ensamblaje de las partículas virales, maduración y secreción de la progenie viral.

De acuerdo con lo mostrado en la figura anterior, dicho ciclo se puede resumir de la siguiente manera (Fishburn et al., 2022; Lopez-Denman & Mackenzie, 2017; Neufeldt et al., 2018; Van Den Elsen et al., 2021):

- Unión: Las proteínas al exterior del virión interactúan con proteínas de superficie en células susceptibles (monocitos, células dendríticas de piel, neuronas, trofoblastos, etc.). De manera general los flavivirus se unen a receptores TAM de la familia de las tirosin-cinasas
- Internalización: Una vez que los viriones han sido anclados a la superficie celular, ocurre una serie de interacciones específicas que median la internalización. Esto sucede predominantemente por una vía endocítica dependiente de clatrina
- Fusión: Posterior a la endocitosis, la ATPasa Vacuolar bombea protones del citoplasma al lumen de los endosomas, provocando un aumento en el pH y cambios conformacionales en las proteínas de envoltura viral, lo cual resulta en su inserción en la membrana endosomal y la formación de un puro de fusión, liberando así la nucleocápside hacia el citosol
- Traducción: Una vez en el citoplasma, la nucleocápside es degradada mediante ubiquitinación liberando así el genoma viral. El (+) RNA es reconocido por los ribosomas y es traducido en el retículo endoplásmico rugoso (RER), produciendo una única poliproteína. Las proteasas celulares y virales se encargan del procesamiento co-traducciona l y post-traducciona l para producir las proteínas estructurales y no estructurales
- Replicación de RNA: Las proteínas no estructurales se ensamblan en la membrana del RE induciendo la invaginación de ésta para producir los sitios de replicación. En estos complejos de replicación se produce el RNA viral mediante una molécula intermediaria de polaridad negativa. Todas las proteínas no estructurales son esenciales para el proceso de replicación
- Ensamblaje: El (+) RNA producido mediante la replicasa viral puede ser incorporado en nuevas partículas virales. El ensamblaje de las nuevas partículas virales se lleva a cabo en el RE, regularmente en regiones opuestas a los sitios de replicación.

- **Maduración:** Los viriones inmaduros son secretados en vesículas hacia el aparato de Golgi, donde avanzan por las diferentes cisternas con un pH decreciente. La maduración se da en la vía secretora por escisión de la proteína prM mediada por furina
- **Secreción:** Los viriones maduros son secretados al ambiente extracelular mediante la vía exocítica

A pesar de que tal y como se muestra en el texto anterior, el ciclo replicativo de los flavivirus no involucra la participación del núcleo, al contrario de lo que sucede con otros virus (sección 2.1), se han reportado hallazgos en los que varias de las proteínas virales se encuentran presentes en dicho compartimento celular, en el trabajo de (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017) se mencionan, a manera de resumen, las proteínas flavivirales que han sido identificadas en el núcleo celular, siendo estas:

- Cápside
- NS5
- NS3
- NS4B

2.2 Presencia de la NS3 en núcleo celular

Es bien sabido que el papel de las proteasas virales en el establecimiento de la infección es basto y variado, por lo que no es de sorprender su presencia en el núcleo celular. Por ejemplo, se ha reportado la co-localización de la proteína NS3 del virus de encefalitis japonesa (JEV, por sus siglas en inglés) con la proteína lámina nuclear A/C, en la línea celular de riñón de cerdo PS infectada, siendo éste el primer antecedente de la presencia de la NS3 de un flavivirus en el núcleo celular (Uchil et al., 2006). Mediante el estudio de la reorganización de estructuras subcelulares, en infección de células Huh7 con ZIKV, se observa que la red del citoesqueleto es desplazada por inclusiones perinucleares que se encuentran enriquecidas, entre otras cosas, con la proteína NS3, la cual se acumula sobre la superficie del núcleo con forma de

riñón (Cortese et al., 2017). Hou y colaboradores (2017) reportaron, mediante ensayos de inmunocitoquímica, la colocalización de NS3 de ZIKV con α -tubulina en células Vero transfectadas. En dicho estudio se observó que NS3 forma una estructura fibrilar extendida desde el centrosoma, lo cual sugiere que es capaz de afectar la distribución de tubulina y el centrosoma. Otro fenómeno reportado es un cambio en la morfología de la lámina nuclear (Hou et al., 2017). Con la finalidad de elucidar cómo es que la proteasa NS3 de ZIKV (ZVP, por sus siglas en inglés) afecta las vías de señalización celular, y por lo tanto sus mecanismos patológicos, el grupo de Hill y colaboradores (2018) realizó un estudio, mediante N-terminómica, en lisados de células HEK 293, donde se detectó la interacción de la ZVP con 31 proteínas celulares, de las cuales 15 tienen localización nuclear, entre ellas : el factor de iniciación de la traducción eucariota 4 gamma 1 (eIF4G1), la proteína homóloga cromobox 5 (CBX5) y la enzima ADN- (sitio apurínico o apirimidínico) 5'-fosfomonoéster-liasa (DNA AP liasa) (Hill et al., 2018). En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo distintos trabajos que han dado evidencia sobre la presencia de la NS3 de DENV y ZIKV en el núcleo celular, tanto de las células de humano como de mosquito mediante inmunofluorescencia (IF), microscopía confocal e inmunoelectromicroscopía (IEM). Específicamente, la presencia de la proteína NS3 de DENV2 en el núcleo celular, siendo así el primer reporte de su localización nuclear en células infectadas (Reyes-Ruiz et al., 2018). Mediante la transfección del complejo NS2B3 de DENV-2, DENV-4 y ZIKV en células Huh7 (de Jesús-González et al., 2020) se pudo observar que se presenta una pérdida de la integridad de la envoltura nuclear, tal y como sucedería en algunas enfermedades hereditarias y adquiridas. También se observó pérdida de integridad y cambio de distribución de las nucleoporinas (Nups) ricas en repeticiones de fenilalanina y glicina (FG-Nups) en células infectadas con ZIKV y DENV. De la misma manera se determinó que la proteasa NS3 participa de manera directa o indirecta en la degradación de las FG-Nups. La NS2B-NS3 de ZIKV degrada a las proteínas Nup98, Nup153 y TPR, mientras que la NS2B-NS3 de DENV es responsable directa/indirecta de

la degradación/ruptura de Nup62, Nup98 y Nup153. También se ha estudiado la posible localización nuclear de la NS3 de DENV-2 en células humanas Huh7 infectadas, y mediante inmunoelectromicroscopía detectaron la presencia de la proteína NS3 en el núcleo y en el citoplasma durante la infección por DENV (Palacios-Rápalo et al., 2021). Posteriormente, se estudió la distribución de NS3 a distintos tiempos del ciclo de replicación viral, 8 a 12 horas (síntesis de proteínas virales), 16-24 horas (síntesis de RNA viral y morfogénesis), 18-24 horas (liberación de partículas virales), donde observaron, mediante *Western blot* y microscopía confocal, que a las 8 – 12 horas la proteína NS3 se encuentra localizada principalmente en el núcleo celular, mientras que a las 16 – 24 horas se localiza mayormente en el citoplasma. Demostrando así que la proteína NS3 de DENV-2 tiene localización nuclear y citoplásmica, dependiente del tiempo, durante el proceso de infección celular.

2.3 Estructura tridimensional NS3 de ZIKV

Anteriormente se realizó una breve descripción de la proteína NS3 de ZIKV (sección 1.2). Sin embargo hay algunos otros aspectos que deben de tenerse en cuenta dada la naturaleza del presente proyecto, los cuales se nombrarán a continuación:

La NS3 es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 69kDa. Es una enzima multifuncional, con un dominio de serinproteasa tipo tripsina en los 180 aminoácidos de su extremo N terminal, el cual para ser completamente activado necesita estar asociado con una proteína de ~14kDa llamada NS2B, junto a la cual forma un complejo proteico (NS2B3) conocido como proteasa viral. Mientras que la región C terminal tiene actividades de RNA helicasa y NTPasa estimulada por RNA (da Silva-Júnior & de Araújo-Júnior, 2019).

Se ha reportado que la NS2B3, al igual que otras proteínas flavivirales, cuenta con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) (Mishra et al., 2018), esta característica es la causante de que no exista un modelo tridimensional completo para este complejo proteico debido a que las IDRs no tienen la

capacidad de formar cristales, consecuencia de la alta movilidad de los segmentos y que no dispersan los rayos X de manera adecuada (Uversky, 2010). Se sabe que existen modelos tridimensionales incompletos o de muy baja resolución en las bases de datos para las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) e IDR. Ejemplo de esto son los modelos de NS3 de distintos flavivirus, incluyendo el perteneciente a ZIKV.

3.0 Justificación

A pesar de que la proteasa NS3 de los flavivirus tiene una localización y función citoplásmica, se ha reportado su presencia en el núcleo celular, así como su interacción con algunos componentes de éste durante la infección. Dado que las proteasas virales juegan un papel importante en el establecimiento de las infecciones, es de especial interés el conocer a aquellas moléculas con las que la NS3 del ZIKV pudiera estar interactuando, y con ello obtener información y detalles a nivel molecular sobre las implicaciones de dichas interacciones.

4.0 Hipótesis

La estandarización de una técnica de aislamiento de la NS3 del ZIKV a partir de fracciones nucleares permitirá obtener complejos de interacción proteína – proteína entre la NS3 y proteínas nucleares de células Huh7. Los estudios *in silico* generarán más detalles sobre la interacción de NS3 del ZIKV con otras proteínas.

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo general

Aislar complejos de interacción entre proteínas nucleares y la proteína NS3 de ZIKV en fracciones nucleares, provenientes de células Huh7 infectadas. Al mismo tiempo generar modelos tridimensionales para complementar el trabajo proteómico.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 *In vitro*

Estandarizar una metodología de purificación para la NS3 de ZIKV a partir de fracciones nucleares.

Aislar la proteína NS3 de fracciones nucleares para su posterior análisis.

Identificar algunas de las proteínas que interaccionan con la proteína NS3.

5.2.2 *In silico*

Generar una lista de proteínas nucleares con posible asociación a NS3.

Obtener modelos *in silico* para las proteínas NS2B3, NS2B y NS3 de ZIKV.

Validar los modelos *in silico* de las proteínas no estructurales de ZIKV.

6.0 Metodología

6.1 *In vitro*

Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV

Las células Huh7 se cultivaron en medio DMEM suplementado con glutamina 2mM, 7% de suero fetal bovino (por sus siglas en inglés, FBS), penicilina (5×10^4 U/mL), estreptomina (50µg/mL) y anfotericina B (1mL/L) a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. La propagación del virus se llevó a cabo en cerebros de ratones CD1 neonatos y el virus se cuantificó mediante ensayos de plaqueo en células BHK. Posteriormente, las células se infectaron con ZIKV a una multiplicidad de infección (por sus siglas en inglés, MOI) de 5 por 12 h. Las células no infectadas o *mock* fueron incubadas de la misma manera que las células infectadas pero en lugar de virus se usó medio Hanks.

Fraccionamiento subcelular

Las células Huh7 infectadas y *mock* se homogeneizaron en buffer hipotónico frío (20mM HEPES, 10mM KCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0.5% Tritón X-100 y un coctel inhibidor de proteasas), se incubó a 4°C por 10 min, se sometieron a agitación por vortex por 1 min y se centrifugó a 2000xg por 1 minuto. El pellet formado se resuspendió en un buffer hipertónico (240mM NaCl, 20mM HEPES, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 20% glicerol, 1% Triton X – 100 y un coctel inhibidor de proteasas), se sometió a agitación en vortex por 1h a 4 °C y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes que correspondieron a la fracción citoplásmica y nuclear se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

Extracto de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó con buffer RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Tritón x-100, 0.1% Desoxicolato, 0.1% SDS y 140 mM NaCl). Células Huh7 *mock* e infectadas con ZIKV, se lavaron

con PBS 1X. A continuación, se añadió 250 µl de RIPA con inhibidores de proteasa por 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las células se lisaron con una punta de pipeta y el extracto se recolectó en tubos eppendorf. Se incubó en hielo por 20 min; y se sometió a un *spin* por 5 seg, recolectando el sobrenadante. El extracto se almacenó a -20 °C hasta su uso y las proteínas se cuantificaron con Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific #23225), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

Las muestras para analizar fueron separadas por peso molecular mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con una concentración de 12% de acrilamida, con el equipo de electroforesis (Bio-Rad modelo Mini PROTEAN Tetra Cell) y peines de 1.5 mm de grosor. La electroforesis se realizó a 150volts. A cada pozo se le agregó 30 µg de proteína.

Al término de la electroforesis, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa con poro de 0.2 µm por 70 min a 100 volts en el equipo Bio-Rad modelo Mini Trans-Blot Cell.

La técnica de *Western Blot* se realizó bloqueando la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 10% en PBS 1X-Tritón X-100 0.01% durante 1 h a TA. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario diluido en PBS 1X durante toda la noche a 4 °C en las siguientes concentraciones:

- Anti-CRT Santa Cruz Biotechnology (sc-373863) 1:1000
- Anti-Lamina nuclear Santa Cruz Biotechnology (sc-376248) 1:1000
- Anti-NS3 ZIKV GeneTex (GTX133309) 1:3000
- Anti GAPDH (sc-47724) 1:1000

Después, se lavó la membrana con PBS 1X-Tritón X-100 0.01% y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón) acoplado a HRP durante 1 h a TA en una dilución de 1:5000 en leche descremada al 5% en PBS PBS 1X-Tritón X-100 0.01%. Finalmente se lavó

la membrana 5 veces más. El revelado se llevó a cabo con SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (ThermoFisher Scientific #34095).

Inmunoprecipitación

Las fracciones infectadas y *mock* fueron tratadas y procesadas con el *kit* de inmunoprecipitación de abcam (número de catálogo ab206996). En breve, las muestras se incubaron con anti-NS3, en un volumen máximo de 500 µL, y se incubaron a 4 °C en agitación. Posterior a la incubación, se añadieron 25 µL de perlas de Sefarosa® con proteína A/G por 1 hora a 4 °C. Las perlas se recolectaron mediante centrifugación a 2000xg por 2 min y el sobrenadante se conservó. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer de lavado 1X y se centrifugaron a 2000xg por 1 min. Posteriormente se realizó la elución de la muestra con 40 µL de glicina/HCl 100 mM pH 2.5, se incubó por 10 minutos en agitación y se centrifugó a 2000xg por 1 min, este procedimiento se repitió tres veces de manera secuencial, finalmente se neutralizaron los eluidos con Tris/HCl 1 M pH 8.5. Las muestras se cuantificaron a 280 nm en NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Las eluciones y los sobrenadantes se almacenaron a - 80 °C para su posterior uso.

6.2 Análisis bioinformático *In silico*

Revisión sistemática

La búsqueda se llevó a cabo en la página web “*PubMed*®”, se realizaron dos filtrados bajo las palabras clave “Zika” y “Flavivirus”, respectivamente. Las publicaciones obtenidas se guardaron en formato “PubMed”, dicho archivo consiste en el título, autores y resumen de cada una de las publicaciones que cumplieron con el criterio de búsqueda. Posteriormente los *abstracts* fueron analizados bajo el software “*Sublime Text*” donde se realizó una segunda exclusión de resultados mediante los términos “Nuclear”, “NS3” y “Nucleus”.

Los artículos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron revisados a detalle y se generó una lista de proteínas con posible asociación a la NS3.

Búsqueda de homologías y STRING

La secuencia de la proteína NS3B3 de ZIKV se obtuvo en formato fasta de la base de datos UniProt con número de acceso Q32ZE1. Dicho archivo contiene los aminoácidos de las posiciones 1369 – 2115 de la poliproteína de ZIKV, los cuales corresponden a la NS2B (130 residuos, posiciones 1369-1498) y a la NS3 (617 residuos, posiciones 1499-2115).

Con la secuencia de la NS2B3 se realizó una búsqueda de homología con la herramienta *Protein BLAST* del *National Center for Biotechnology Information* y se eligieron aquellos resultados con más del 50% de similitud.

A partir de los resultados obtenidos para el *BLAST* se realizó una búsqueda en la base de datos STRING, en su apartado especializado “STRING Viruses” (Cook et al., 2018), teniendo como único criterio de inclusión aquellas interacciones con proteínas de localización nuclear. Dichos resultados se agregaron a la lista de proteínas con posible asociación a la NS3.

Modelado por homología

La obtención de estructuras tridimensionales para la proteína NS2B3, NS2B y NS3 se realizó mediante dos algoritmos diferentes, de la siguiente manera:

- NS3B3 y NS3: I-TASSER (Yang & Zhang, 2015; Zheng et al., 2021; X. Zhou et al., 2022)
- NS2B: ab initio (Hiranuma et al., 2020; Y. Song et al., 2013)

Se obtuvieron archivos pdb los cuales fueron renombrados y sometidos a un análisis mediante gráficos de Ramachandran Posteriormente, las estructuras obtenidas fueron refinadas en el servidor 3Drefine: *Protein Structure*

Refinement Server (Bhattacharya et al., 2016; Bhattacharya & Cheng, 2013b, 2013a), y sometidas a un análisis por gráficos de Ramachandran, mediante el software MolProbity (Williams et al., 2018).

Validación de los modelos tridimensionales

La validación de las estructuras tridimensionales se realizó mediante una metodología de simulaciones de MD, la cual se llevó a cabo haciendo uso del Clúster híbrido de supercómputo Xihcoatl del CINVESTAV en el Nodo GPU K40 con 64gb RAM y 24 cores con un rendimiento teórico de 345.27 TeraFLOPS. El flujo y el algoritmo de trabajo son similares a lo descrito en (Martinez Carranza, 2019), en breve:

Las simulaciones de MD tienen su fundamento en la resolución numérica de las ecuaciones de movimiento de Newton para un sistema conformado por átomos interaccionando. Para ello se usan las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dr_i}{dt} = v_i \quad (1)$$

$$\frac{dv_i}{dt} = \frac{F_i}{m_i} \quad (2)$$

Sin embargo, las simulaciones de MD también necesitan realizar el cálculo de energía en el sistema, para ello se utiliza la siguiente función:

$$F_i = -\nabla U_i \quad (3)$$

El resolver estas ecuaciones implica el uso de métodos de integración numérica. Para este trabajo se utilizó el Software GROMACS (*Groeningen Machine for Chemical Simulations*) (Berendsen et al., 1995), por lo cual el método será el integrador *Leap-frog*, variante del algoritmo de Verlet (Verlet, 1967). La ecuación (3) define a la fuerza de un sistema como el gradiente negativo de su función de energía potencial. Esta función da origen a otra serie de funciones conocidas como campo de fuerza (Wassenaar, 2006), el cual es un modelo matemático que describe la dependencia que tiene la energía de un sistema con las coordenadas de sus partículas. Un conjunto de ecuaciones

típica de un campo de fuerza para uso con biomoléculas tiene la siguiente forma (Mackerell, 2004):

$$U(r) = U_{enlaces} + U_{torsión} + U_{diedro} + U_{Lennard-Jones} + U_{Coulomb} \quad (4)$$

O en términos generales:

$$U(r) = U_{enlace} + U_{interacciones\ no\ enlazantes} \quad (5)$$

El campo de fuerza empleado en este trabajo es el GROMOS96 43a1, cuyo campo de fuerza se puede expresar de la siguiente manera (Daura et al., 1998; Scott et al., 1999):

$$\begin{aligned} U(r) = & \frac{1}{4} \sum_{b=1}^{Nb} K_{b_n} [b_n^2(t) - b_{0_n}^2]^2 + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta_n} [\cos(\theta_n(t)) - \cos(\theta_{0_n})]^2 \\ & + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\xi} K_{\xi_n} [\xi_n(t) - \xi_{0_n}]^2 + \sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(\delta_n) \cos(m_n \phi_n(t))] \\ & + \sum_{\substack{\text{pares no} \\ \text{enlazantes} (ij)}} \left[\frac{c_{12}(ij)}{r_{ij}(t)^6} - c_6(ij) \right] \frac{1}{r_{ij}(t)^6} \\ & + \sum_{\substack{\text{pares no} \\ \text{enlazantes} (ij)}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \frac{1}{r_{ij}(t)} \\ & + \sum_{\substack{\text{pares no} \\ \text{enlazantes} (ij)}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \left[-\frac{C_{rf} r_{ij}(t)^2}{2R_{rf}^3} - \frac{1 - \frac{1}{2} C_{rf}}{R_{rf}} \right] \end{aligned}$$

Posterior a la elección de estos parámetros, se seleccionó el modelo de solvente SPC, y una caja cúbica con una distancia mínima de 1nm entre todas las caras de la caja y la proteína. El siguiente paso es realizar una minimización de energía, la cual tiene como propósito llevar a la molécula a su estado de equilibrio, es decir “relajar” la estructura para que el cómputo de fuerzas no provoque un fallo en la simulación. Una vez que la energía alcanzó el valor mínimo posible se sometió el sistema a un ajuste de condiciones de simulación mediante un ensamble NVT, el cual consiste en mantener constante el número de partículas (N), el volumen (V) y la temperatura (T), se fijó una temperatura a 310K, y posteriormente se utilizó un ensamble NPT, el cual consiste en

mantener constante el número de partículas (N), la presión del sistema (P) y la temperatura (T) previamente ajustada, se fijó un valor de 1bar para simular la presión atmosférica. El tiempo de simulación fue de 100 ns. Para analizar las trayectorias de los diferentes sistemas, se emplearon las siguientes herramientas:

- gmx *gyrate*: cálculo del radio de giro de la molécula.
- gmx *rmsd*: cálculo de la desviación cuadrática médica de la estructura.

7.0 Resultados

Los resultados se dividen en dos secciones: La primera corresponde a lo realizado *in vitro*, así como la revisión sistemática y los resultados del STRING, que será referida como estudio de interacciones, mientras que la segunda parte serán los resultados referidos como Bioinformática estructural, correspondientes al modelado por homología y la validación de estructuras.

7.1 Estudio de interacciones NS3 – proteínas nucleares

A partir de células Huh7 infectadas y células *mock* incubadas durante 12 h post-infección, se obtuvieron los respectivos extractos totales, la fracción citoplásmica y la nuclear. La pureza de las fracciones se comprobó mediante el uso de los anticuerpos contra lámina A/C y calreticulina (CRT), además de la especificidad de estos, permitiendo así que sean usados como marcadores para núcleo y citoplasma, respectivamente (figura 4).

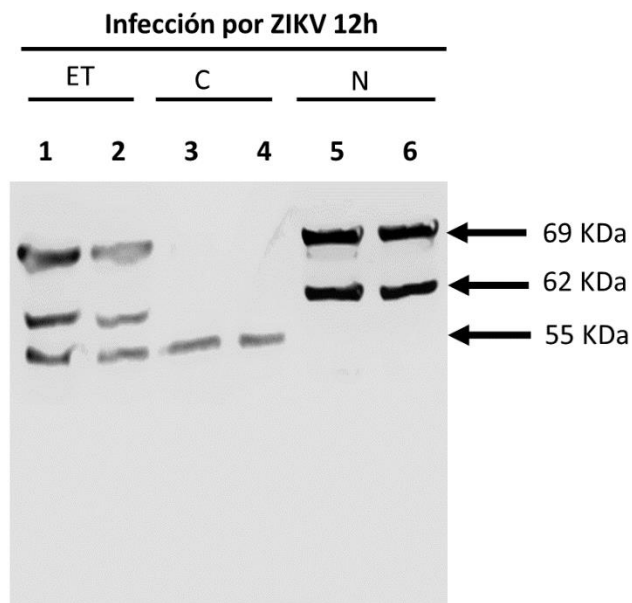


FIGURA 4. ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT DE EXTRACTOS TOTALES Y FRACCIONES CITOPLÁSMICA Y NUCLEAR DE CÉLULAS INFECTADAS CON ZIKV POR 12 HORAS
Detección de CRT (55 KDa) como marcador citoplásmico y de lámina A/C (69 y 62 KDa) como marcador nuclear en extractos totales (ET) de células *mock* (carril 1) e infectadas (carril 2) y en fracciones citoplásmicas (C) o nucleares (N) obtenidas de células *mock* (carriles 3 y 5 respectivamente) e infectadas con ZIKV (carriles 4 y 6 respectivamente). Los anticuerpos para lámina A/C y CRT se utilizaron en todos los carriles.

Posteriormente se empleó un anticuerpo específico para la detección de NS3 de ZIKV (α NS3 ZIKV GTX133309), por lo cual se realizó la titulación correspondiente, además de la prueba de reactividad cruzada con una muestra de NS3 de DENV. Para ello se cargaron varios pozos con extractos totales de células *mock* e infectadas con ZIKV, se cortó la membrana en varias partes, y cada una fue incubada con diferentes diluciones de anti NS3. En la figura 5 se observa que el anticuerpo no da ninguna señal para DENV, mientras que sí existe señal para las muestras con ZIKV, confirmando así la especificidad del reactivo contra este último. Además se observa que es posible trabajar el anticuerpo a diluciones de entre 1:1000 y 1:3000. Sin embargo, posteriormente se verificó que el intervalo de dilución en el que el anticuerpo funciona para detectar proteína en *Western Blot*, cambia entre lotes del reactivo.

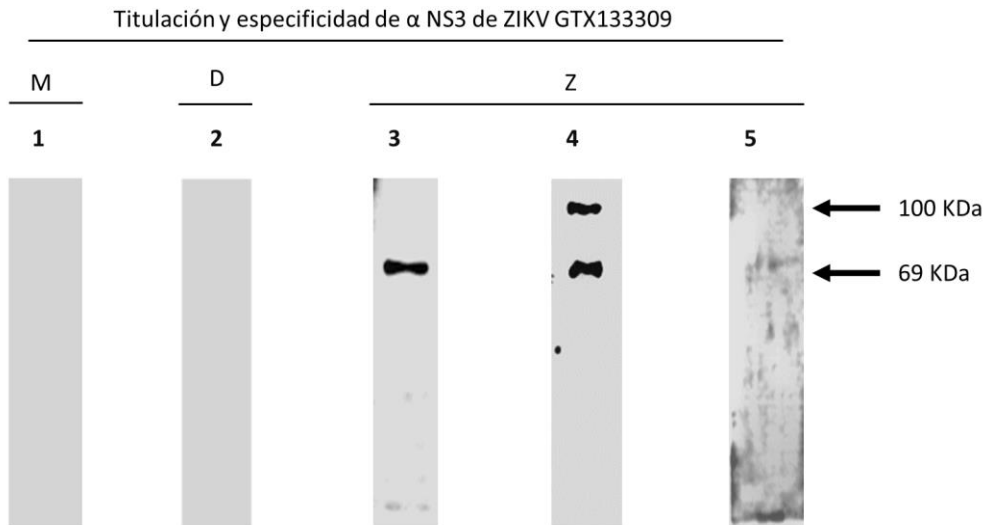


FIGURA 5 TITULACIÓN Y PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI NS3 DE ZIKV EN EXTRACTOS TOTALES

Detección de NS3 en extractos totales obtenidos de células *mock* (M) células infectadas con DENV (D) y muestras infectadas con ZIKV (Z). Se utilizaron títulos de 1:1000 (carril 1,2 y 3), 1:3000 (carril 4) y 1:5000 (carril 5).

Una vez establecida la dilución a emplear se procedió a identificar la presencia de la proteína NS3 en las distintas fracciones nucleares y extractos totales de células *mock* como de células infectadas.

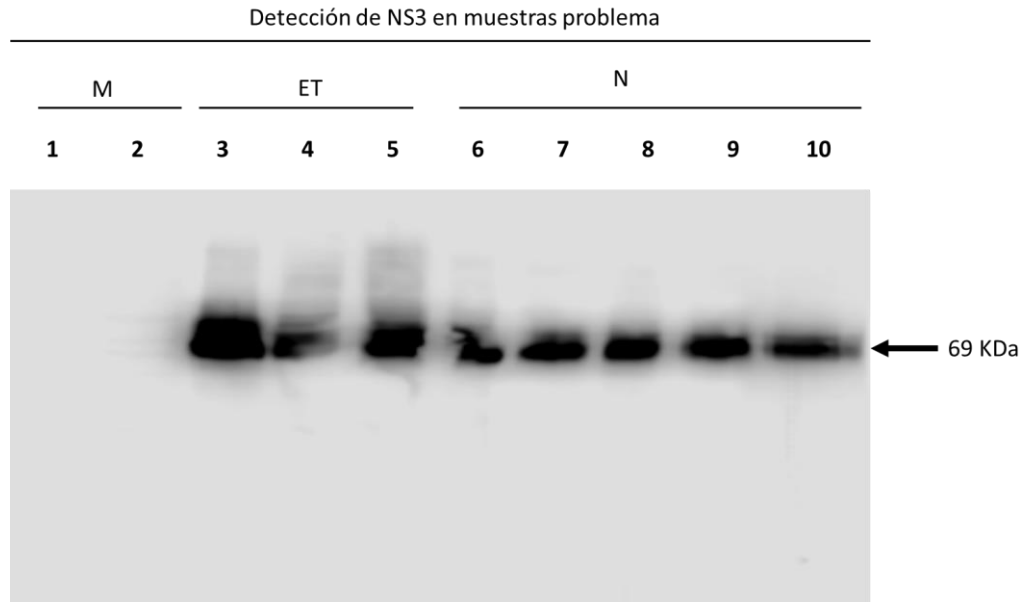


FIGURA 6 ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT DE MUESTRAS DE EXTRACTOS TOTALES Y FRACCIONES NUCLEARES INFECTADAS CON ZIKV

Detección de NS3 en muestras obtenidas de células *mock* (M) mediante extracto total (carril 1) y fraccionamiento nuclear (carril 2); y en diferentes muestras extracto total (ET) y de fracción nuclear (N) obtenidas de células infectadas con ZIKV (carriles 3,4,5,6,7,8,9 y 10).

A partir de distintas muestras de células Huh7 infectadas se obtuvieron extractos totales y fracciones nucleares, y como controles negativos se utilizó un extracto total y fracción nuclear, extraídos de células *mock*. Como se puede observar en la figura 6, todas las muestras de fracción nuclear y extracto total tienen la presencia de la proteína NS3. A partir de estas muestras se realizó un *pool* de extracto total y un *pool* de fracción nuclear, que serán empleados para los siguientes experimentos. Estos se almacenaron según lo descrito en la metodología.

Una vez obtenidas las muestras nucleares con la NS3 presente, se procedió a buscar estandarizar una técnica de inmunoprecipitación que permita el correcto aislamiento de dicha proteína. Para el establecimiento de las

condiciones de tiempo y de concentración de la IP se consultaron diversos trabajos donde se realizara una metodología similar para ZIKV o para DENV, después de realizar comparaciones, de las condiciones usualmente empleadas, se decidió utilizar una proporción de anticuerpo:proteína de 1:75 y de 1:30, y un tiempo de tres horas (sugerido por el manual) y otro de 24 horas (consenso en la mayoría de los artículos sobre IP consultados) ambas condiciones en incubación a 4 °C y agitación constante.

Para comenzar, se tuvieron las siguientes consideraciones: un volumen de 150 µL de las diferentes fracciones nucleares empleadas (de células *mock* e infectadas) cuyo contenido era de aproximadamente 150µg de proteína, un volumen final de 500 µL, y la concentración del *stock* del anticuerpo con un valor de 1mg/mL.

En la primera fase del experimento se utilizaron tres condiciones diferentes de concentración/tiempo de incubación, a las cuales se hace referencia como ensayo 1, 2 y 3:

- 1) Anticuerpo 1:75, 3 h de incubación
- 2) Anticuerpo 1:30, 3 h de incubación
- 3) Anticuerpo 1:30, 24 h de incubación

Las eluciones de cada ensayo se obtienen por cambio de pH con glicina ácida, dicho buffer tiene como función el disociar interacciones proteína – proteína así como las interacciones antígeno – anticuerpo. En total se obtuvieron nueve eluciones (tres por cada ensayo), las cuales fueron analizadas mediante *Western Blot* para detectar la presencia de la proteína NS3 de ZIKV. Además se utilizaron dos controles negativo (*mock*), uno para cada tiempo, y un control positivo (muestra previamente analizada como positiva para la presencia de NS3 de ZIKV). Los resultados se muestran en la figura 7:

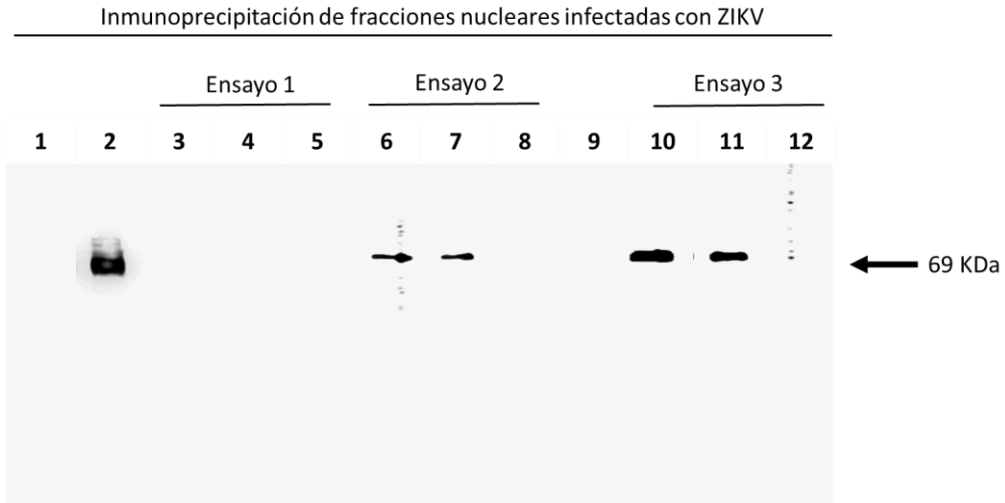


FIGURA 7. ESTANDARIZACIÓN DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA NS3 DE ZIKV

Detección de NS3 en diluciones de IP mediante tres ensayos:

- Ensayo 1: 3 horas de incubación y dilución de anti NS3 1:75
- Ensayo 2: 3 horas de incubación y dilución de anti NS3 1:30.
- Ensayo 3: 24 horas de incubación y dilución anti NS3 1:30.

Para cada ensayo se analizaron tres eluciones, nombradas elución #1 (carriles 3,6 y 10, respectivamente), elución #2 (carriles 4,7 y 11, respectivamente) y elución #3 (carriles 5, 8 y 12, respectivamente). Se empleó una muestra *mock* inmunoprecipitada a 3 horas (carril 1) y una muestra *mock* de inmunoprecipitada a 24 horas (carril 9). También se empleó un control positivo de NS3 (carril 2).

De la figura anterior se observa que los controles dan el resultado esperado, en el ensayo 1 no se detecta la presencia de la NS3, mientras que en las eluciones de los ensayos 2 y 3 se logró detectar la presencia de la proteína. Ahora bien, en estos últimos ensayos sólo se detecta la presencia en las eluciones #1 y #2, mientras que en la #3 no hay marca de proteína.

Como siguiente paso, se analizó el sobrenadante obtenido después de la incubación con el anticuerpo, con el propósito de verificar la eficiencia de la inmunoprecipitación de la proteína. Se realizó para los tres diferentes ensayos, las muestras *mock* y el control de infección.

En la figura 8 se puede observar que sólo los sobrenadantes provenientes de los ensayos 1 y 2 tienen presencia de NS3, mientras que el correspondiente al ensayo 3 no contiene a la proteína. El resultado de los controles es el esperado. Posteriormente se repitió el con algunas modificaciones. Las cantidades por utilizar de anticuerpo se expresan como concentraciones, siendo estas: 4µg/mL (derivada de la dilución 1:75) y 10 µg/mL (derivada de la dilución 1:30), para esto se considera que el volumen final de 500 µL, se conforma de 150µL de muestra y 350µL de buffer.

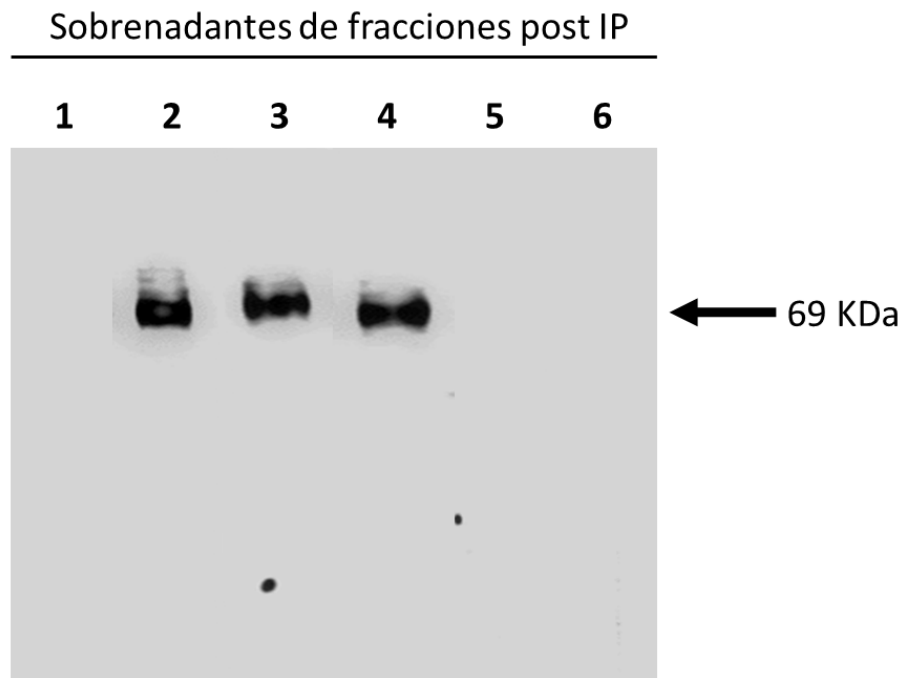


FIGURA 8 ANÁLISIS MEDIANTE *WESTERN BLOT* DEL SOBRENADANTE DE LOS ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

Detección de NS3 en sobrenadantes obtenidos del ensayo 1 (carril 3), ensayo 2 (carril 4) y ensayo 3 (carril 6), como controles negativos se utilizaron muestras de *mock* inmunoprecipitada a 3 horas (carril 1) y *mock* inmunoprecipitada a 24 horas (carril 5). Se utilizó un control positivo de NS3 (carril 2).

Nuevamente se realizaron tres ensayos de inmunoprecipitación, nombrados como:

4) Anticuerpo 4µg/mL, 3 h de incubación.

- 5) Anticuerpo 10 µg/mL, 3 h de incubación.
- 6) Anticuerpo 10 µg/mL, 24 h de incubación.

Al tener el precedente de que el ensayo 1 no mostró la presencia de NS3, esta vez sólo se analizó una de las eluciones para el ensayo 4, mientras que los ensayos 5 y 6 se realizaron considerando las tres eluciones.

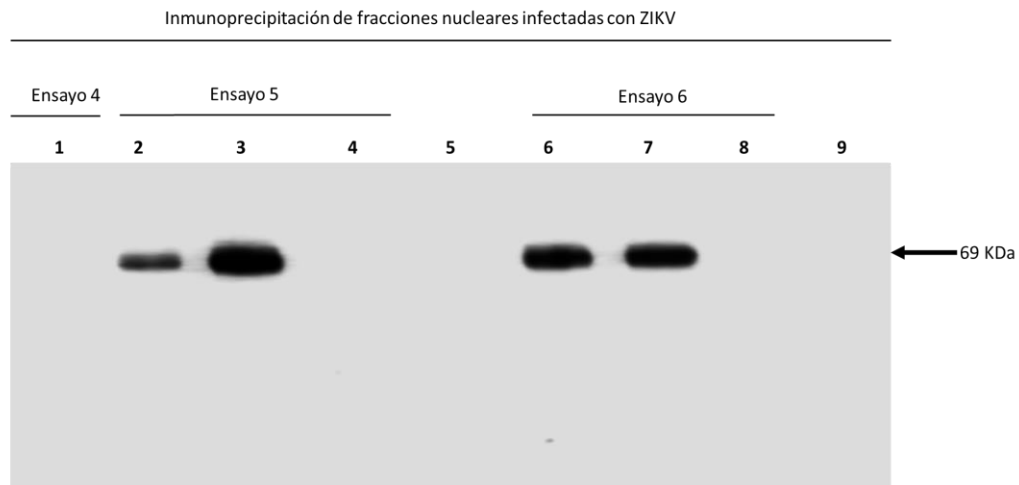


FIGURA 9 ESTANDARIZACIÓN DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA NS3 DE ZIKV

Detección de NS3 en diluciones de IP mediante tres ensayos:

- Ensayo 4: 3 horas de incubación y anti NS3 4µg/mL
- Ensayo 5: 3 horas de incubación y anti NS3 10 µg/mL.
- Ensayo 6: 24 horas de incubación y anti NS3 10 µg/mL.

Para el ensayo 4 se analizó una sola elución (carril 1) mientras que para los ensayos 5 y 6 se analizaron 3 eluciones nombradas como elución #1 (carril 2 y 6, respectivamente), elución #2 (carril 3 y 7, respectivamente), elución #3 (carril 4 y 8, respectivamente) Se empleó una muestra *mock* de inmunoprecipitada a 3 horas (carril 5) y una muestra *mock* inmunoprecipitada a 24 horas (carril 9).

En la figura 9 se puede apreciar que los resultados son similares a la primera ronda de IP realizadas, donde la presencia de la NS3 se detecta en las eluciones #1 y #2. De igual manera se procedió a analizar los sobrenadantes obteniendo lo siguiente:

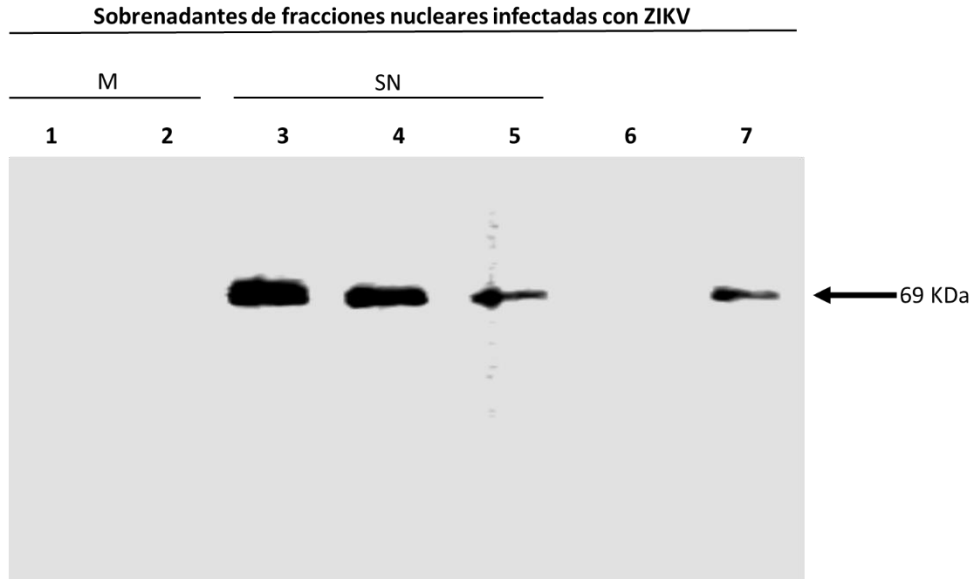


FIGURA 10 ANÁLISIS DEL SOBRENADANTE DE LOS ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN
 Detección de NS3 en muestras *mock* (M) inmunoprecipitadas a 3 horas (carril 1) y 24 horas (carril 2), en sobrenadante (SN) de los ensayos 4 (carril 3), ensayo 5 (carril 4), ensayo 6 (carril 5), y en controles negativo (carril 6) y positivo (carril 7) para NS3.

En la figura 10 se muestra el resultado del análisis de los sobrenadantes. En esta ocasión se tomaron tres muestras *mock*, una correspondiente a cada uno de los ensayos de IP, una muestra de sobrenadante de cada ensayo, así como controles positivo y negativo para la presencia de infección. Se puede observar que todas las muestras de sobrenadante tienen la presencia de NS3.

A partir de estos resultados es que se propone una metodología de IP tal y como se muestra en la figura 11, la cual sirvió para aislar a la NS3. La metodología se resume en lo siguiente:

Se añade 150µL de muestra y el volumen de buffer indicado por el manual a un tubo eppendorf, posteriormente se agrega anticuerpo anti NS3 de ZIKV a una concentración 10µg/µL, la mezcla anterior se incuba por 24 horas a 4°C en agitación. Pasado el tiempo se añaden 25 µL de perlas de sefarosa con proteína A/G a la muestra y se incuba una hora a 4°C en agitación. Se centrifuga la muestra a 2000xg durante 2 minutos, el sobrenadante se conserva y se analiza mediante Western Blot para saber si es necesario repetir

el proceso de IP. Se realizan tres lavados de perlas y se añaden 40 μL de glicina ácida, se incuba durante 10 minutos en agitación y se centrifuga para coleccionar el eluyente, este paso se realiza por duplicado. Finalmente la muestra se neutraliza agregando 4 μL de Tris HCl pH 8.5 y se almacena a -80°C para posterior uso

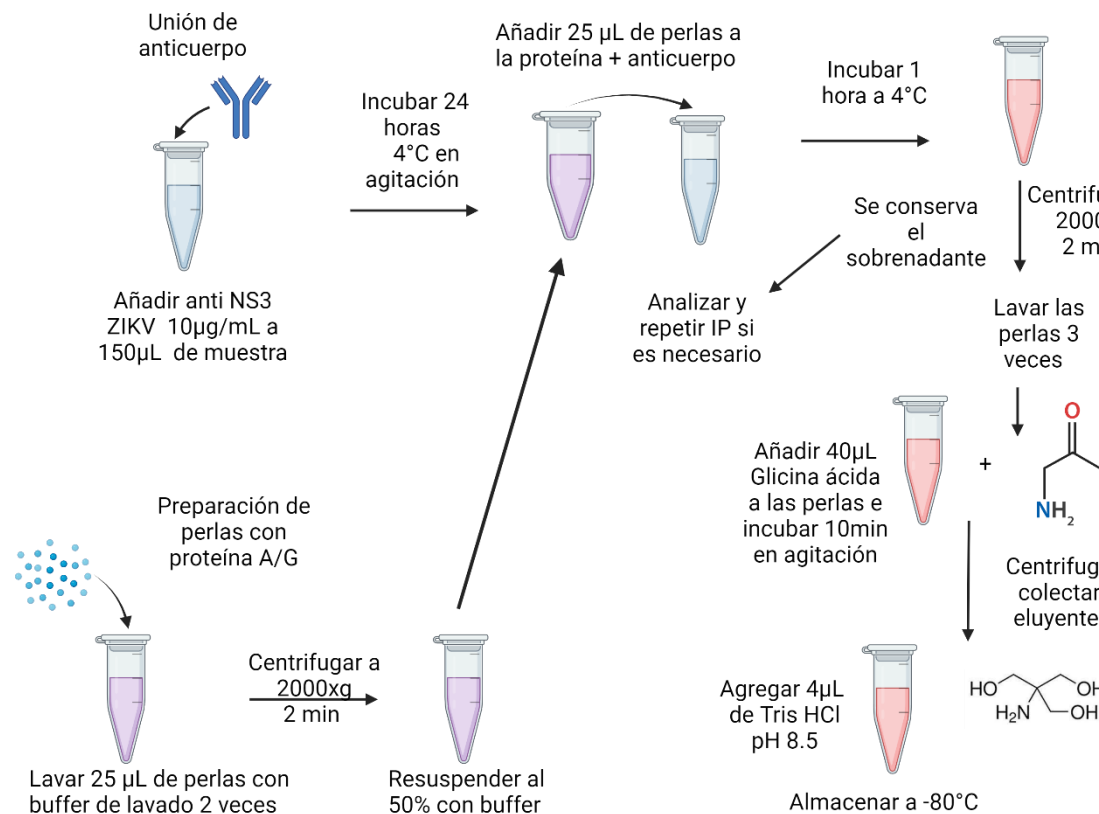


FIGURA 11 METODOLOGÍA FINAL PROPUESTA PARA LOS ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Esquema general de la metodología propuesta para realizar el aislamiento de la NS3

Como paso siguiente se buscó predecir, basados en la literatura, algunas proteínas nucleares que pudieran estar interactuando con la NS3 de ZIKV, para ello se hizo una revisión sistemática y búsqueda en STRING, todo esto con el propósito de aplicar la metodología propuesta.

Se realizó un primer filtrado de publicaciones científicas donde se utilizaron los términos de inclusión: zika y flavivirus, el cual arrojó aproximadamente 40 mil

artículos. Posteriormente un segundo filtrado con los términos “nuclear”, “*nucleus*” y/o “NS3” lo cual redujo la cantidad de resultados significativamente. El último filtro fue realizar la lectura de los artículos que cumplían con los términos estipulados, ya que aunque incluyeran la palabra buscada, su contenido podía no tener ninguna relación, por ejemplo el término “nuclear” aparecía al hablar de células mononucleares, las cuales no guardan relación con el propósito del trabajo. Después de terminar la lectura, se obtuvieron 92 artículos relacionados al tema, en los que se encontraron 23 proteínas nucleares que podrían tener una interacción con a NS3 de ZIKV.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla, la cual incluye las posibles proteínas con asociación a NS3, así como su función. Cabe aclarar que todas se tratan de proteínas con ubicación nuclear.

TABLA 1. PROTEÍNAS PROBABLEMENTE ASOCIADAS CON NS3 OBTENIDAS POR REVISIÓN SISTEMÁTICA

Proteína	Función	Proteína	Función
DDX3	RNA helicasa	SNF8	Clasificación vacuolar
DDX56	RNA helicasa	MT1X	Metales pesados/apoptosis
Autoantígeno La	Biogénesis de RNA	PARK7	Sensor de estrés oxidativo
TIAR	Proteína de unión a RNA	MT2	Metales pesados
TIA1	Proteína de unión a RNA	PP6R3	Subunidad reguladora 3 de la serinfosfatasa 6

PTB	Unión a RNA/Splicing	EWS	Proteína de unión al RNA
P53	Supresión de tumores	ADAR1	Control de la respuesta inmune
CDKN1A	Ciclina dependiente de cinasa	PARP1	Reparación del daño a DNA
CBX5	Componente de heterocromatina	FUBP2	Unión a RNA, transcripción
CPNE3	Biosíntesis de glicerofosfolípidos	hnRP A2/B1	Empaquetado de hnRNPs con mRNA
DUT	Metabolismo de nucleótidos		

También se revisó la página de STRING *viruses* para encontrar posibles interacciones de la proteína NS3 de ZIKV, sin embargo dicha base de datos no cuenta con información para ZIKV, por lo que se optó por una búsqueda enfocada en la homología. Para ello se realizó un BLASTP usando la secuencia de la NS2B3 de la ZIKV (ver anexo 1). Se obtuvieron los siguientes resultados a partir de dicha búsqueda:

TABLA 2 VIRUS CON PROTEÍNAS CON MÁS DE 50% DE IDENTIDAD CON NS2B3 DE ZIKV

Flavivirus	
Bassuquara Virus	Usutu virus
Rocio Virus	Murray Encephalitis Virus
DENV 1-4	Japanese Encephalitis Virus
Ilheus Virus	Kokobera Virus
West Nile Virus	Yellow Fever Virus
St Louis Encephalitis Virus	Banji Virus
Kinjin Virus	Edge Hill Virus

Dichos virus se buscaron en la base de datos, sin embargo sólo DENV 1-4, JEV, YFV y WNV tuvieron resultados para interacciones de su respectiva NS3, se analizaron los diferentes interactomas obtenidos y los resultados se muestran a continuación:

TABLA 3 RESUMEN DE ANÁLISIS STRING DE VIRUS CON HOMOLOGÍA A LA NS2B3 DE ZIKV

Proteínas identificadas
GNL2 – Proteína de unión a GTP nucleolar 2
GNL3 – Proteína de unión a GTP nucleolar 3
GNL1 – Proteína de unión a GTP nucleolar 1
GNL3L – Proteína de unión a GTP nucleolar 3 - <i>like</i>
LSG1 – Homólogo de la subunidad larga de la GTPasa1
PSMB88 – Subunidad beta 8 del proteasoma 20S
PSMB5 – Subunidad beta 5 del proteasoma 20S

Mediante esta metodología se obtuvieron 7 proteínas con posible asociación. En conjunto con los resultados previos, se tenían 30 candidatos que, según la bibliografía, podrían tener una potencial interacción con la NS3 de ZIKV. De este grupo de moléculas se seleccionaron tres proteínas, basándose únicamente en la disponibilidad de anticuerpos en el departamento. Se seleccionaron las proteínas DDX5, PTB y p53, los anticuerpos para estas últimas dos moléculas fueron donados amablemente por el grupo de trabajo de la Dra Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Además se eligió estudiar la interacción con lámina nuclear, proteína que es mencionada en los antecedentes de este trabajo.

Se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación (CoIP) en cuatro muestras de fracciones nucleares provenientes de células Huh7 infectadas con ZIKV, las cuales fueron inmunoprecipitadas con anti NS3 de ZIKV y posteriormente analizadas mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos anti DDX5, PTB, p53 y lámina A/C. Además se realizó lo siguiente:

Se utilizó una muestra de extracto total y una de fracción nuclear, donde previamente se identificó la presencia de NS3, como controles positivos y para

verificar que los anticuerpos anti DDX5, PTB, lámina A/C y p53 marcaran correctamente. Además se inmunoprecipitó una muestra *mock* la cual sirvió como control negativo, y una muestra de fracción nuclear infectada cuya IP se realizó como control, inmunoprecipitando con un anticuerpo diferente (anti GAPDH 1:1000), para validar la técnica.

Primero se realizó un marcaje para detectar a la NS3 (1:5000) y a la PTB (1:5000), posteriormente se realizó *stripping* para marcar contra DDX5 (1:5000) y otro *stripping* para detectar a la p53 (1:5000). Los resultados se muestran a continuación:

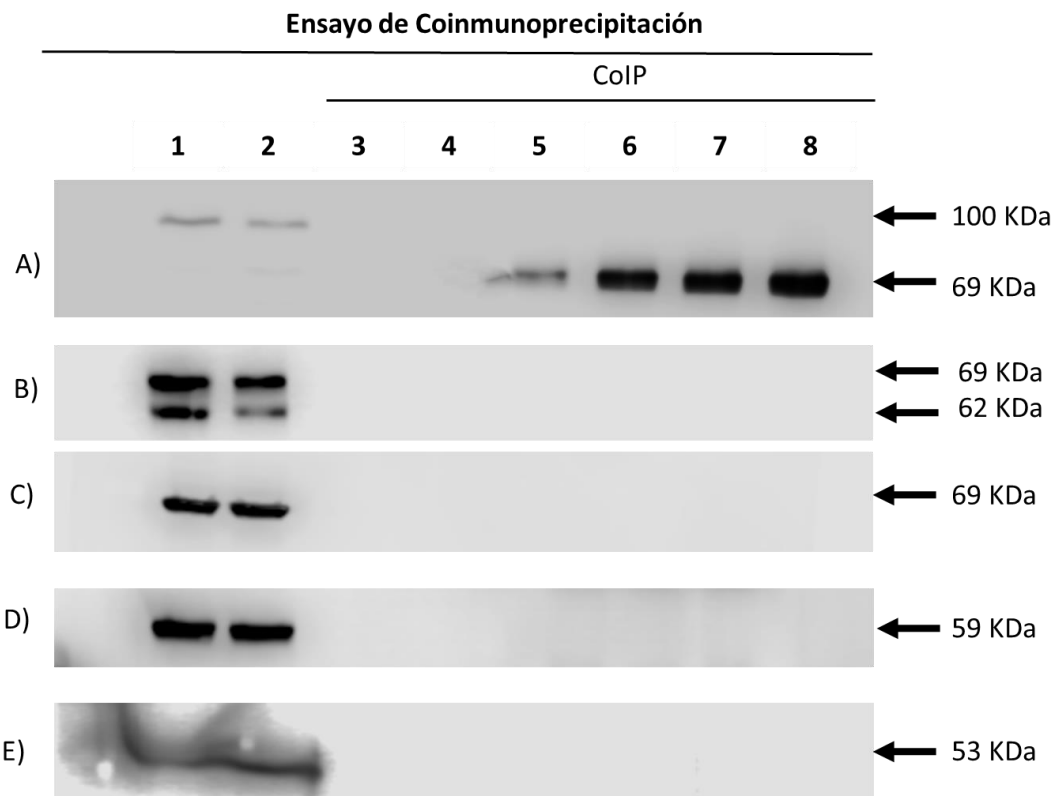


FIGURA 12 ENSAYO DE COIP PARA DDX5, PTB, LÁMINA A/C, P53 Y NS3
 Detección de NS3 (A), lámina nuclear A/C (B), DDX5 (C), PTB (D) y p53 (E) en muestras de fracción nuclear (carril 1) y extracto total (carril 2) de células infectadas con ZIKV, muestra *mock* inmunoprecipitada (carril 3), muestra de fracción nuclear infectada inmunoprecipitada con anti GAPDH (carril 4), y muestras de fracción nuclear infectadas realizadas según lo descrito en la metodología (carril 5 – 8).

En la figura 12 se puede apreciar que tanto la fracción nuclear y el extracto total de células infectadas resultaron positivas para los anticuerpos empleados. La muestra *mock* no dio marca para ningún anticuerpo y la muestra precipitada con GAPDH tampoco dio marca para ninguno de los marcajes, validando la técnica. Las muestras usadas para la CoIP corresponden a un *pool* de los dos eluyentes obtenidos por muestra. Estas muestras tienen marca para la NS3, pero no hay marca alguna para el resto de las proteínas buscadas.

7.2 Bioinformática estructural

Se realizó el modelado por homología de las estructuras tridimensionales de las proteínas NS2B3, NS3 y NS2B de ZIKV, y se realizó un refinamiento de la estructura, los resultados obtenidos se almacenaron en formato pdb y a continuación se muestra una captura de los modelos obtenidos.

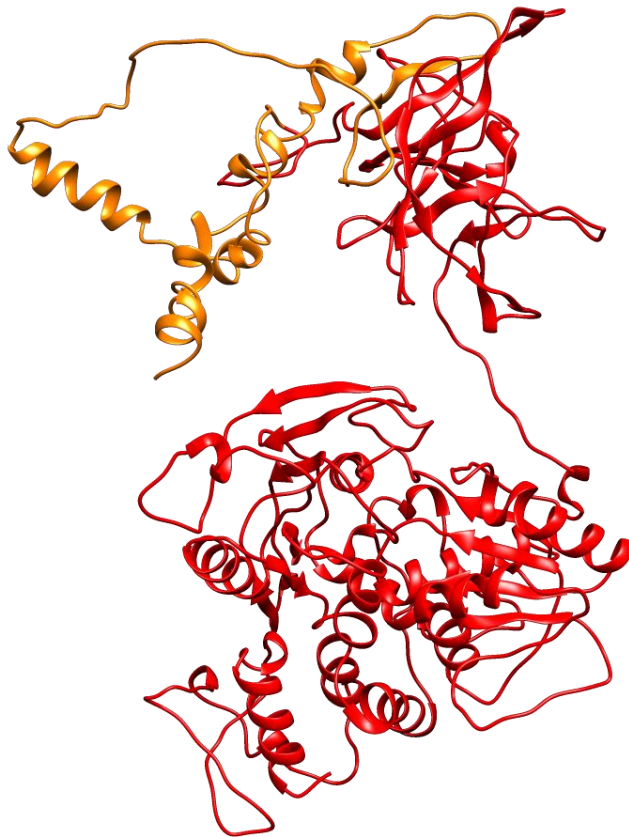


FIGURA 13 MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA NS2B3 DE ZIKV

Estructura resultante del modelado por homología en I-TASSER, en naranja se muestran los residuos correspondientes a la NS2B y en rojo aquellos de la NS3



FIGURA 14 MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA NS3 DE ZIKV
Estructura resultante del modelado por homología en I-TASSER

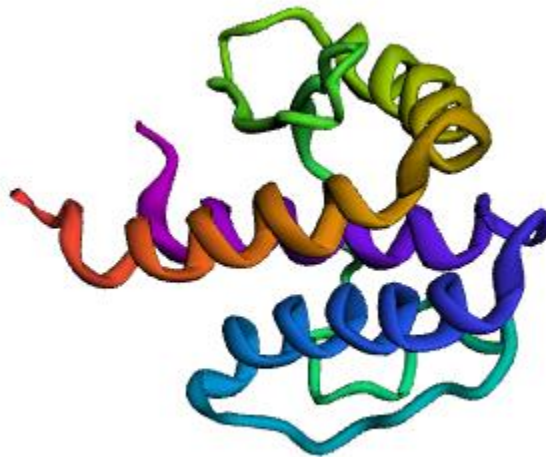


FIGURA 15 MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA NS2B DE ZIKV
Estructura tridimensional resultante del modelado por ab initio

Para realizar la validación de los modelos se utilizó una herramienta llamada gráficos de Ramachandran, los cuales permiten analizar la estructura de las proteínas mediante la representación de los ángulos de torsión de la siguiente manera:

- Ángulo de torsión Phi en el eje de las abscisas
- Ángulo de torsión Psi en el eje de las ordenadas

Esta representación muestra las combinaciones posibles de los ángulos lo que se deriva en la geometría de los residuos en una proteína. Muchas de estas combinaciones no son posibles debido al impedimento estérico. En un gráfico estas combinaciones “permitidas” y “no permitidas” se pueden representar mediante zonas delimitadas. En los gráficos realizados para este trabajo (figuras 16 - 18 y 26) se observan las siguientes delimitaciones:

- Zona delimitada en color azul: Aquellas zonas en donde la combinación de ángulos no tiene ningún impedimento estérico, también llamadas zonas favorecidas
- Zona delimitada en color púrpura: Aquellas zonas donde la conformación es posible si los cálculos utilizan valores de radio de van der Waals ligeramente más bajos de lo normal, también conocidas como zonas permitidas
- Zonas en blanco: Donde las combinaciones de ángulos no son posibles ya que existe un impedimento estérico, también llamadas zonas no permitidas.

Aquellos residuos cuya combinación de ángulos se encuentra en una zona no permitida se conocen como “*outliers*” y se representan con marcas de color rosa, rojo y verde.

Además se utiliza el parámetro “Z score”, el cual es una evaluación general de la calidad del modelo.

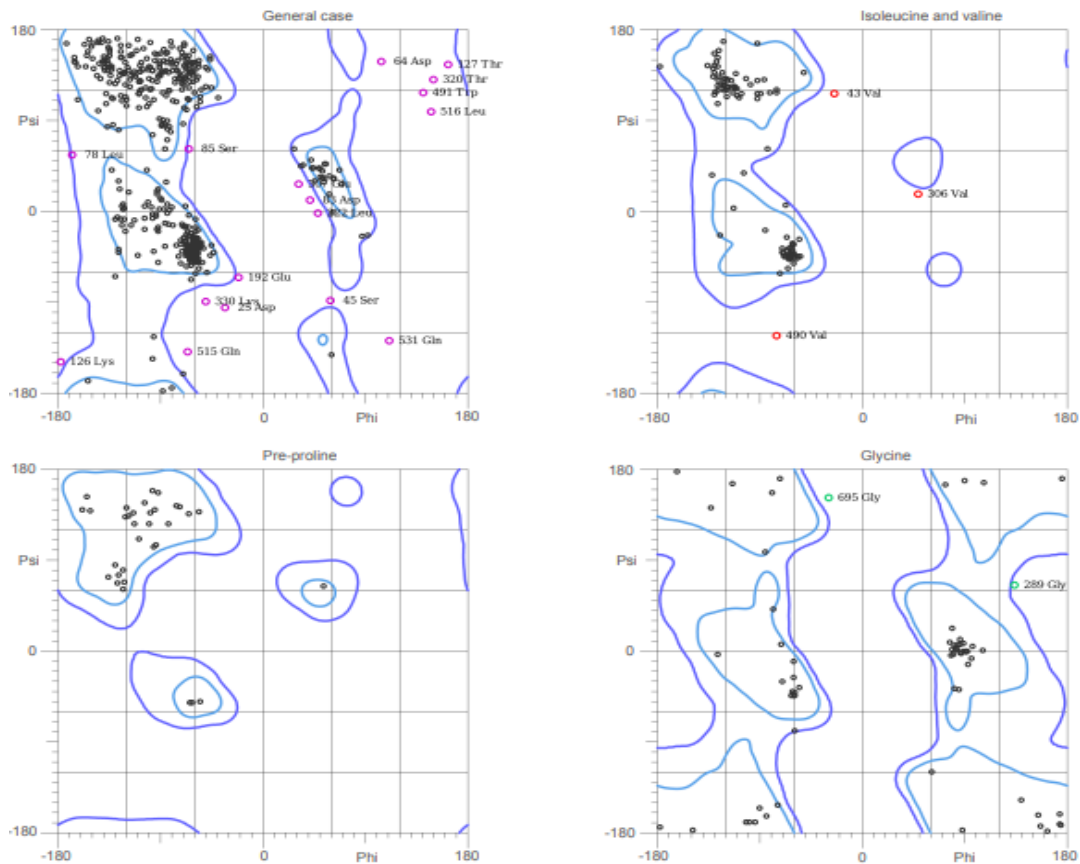


FIGURA 16 GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA LA NS2B3 DE ZIKV

Resultados del análisis de Ramachandran en Molprobit, se muestran: a) Caso general, b) Isoleucina y valina, c) Pre-prolina y d) Glicina

Además del gráfico, el análisis de Ramachandran hecho por MolProbit arrojó los siguientes datos:

- 91.9% (685/745) de todos los residuos se encontraban en zonas favorecidas (Esperado: 98%)
- 96.8% (721/745) de todos los residuos se encontraban en zonas permitidas (Esperado: >99.8%)
- Z score -0.14 ± 0.30

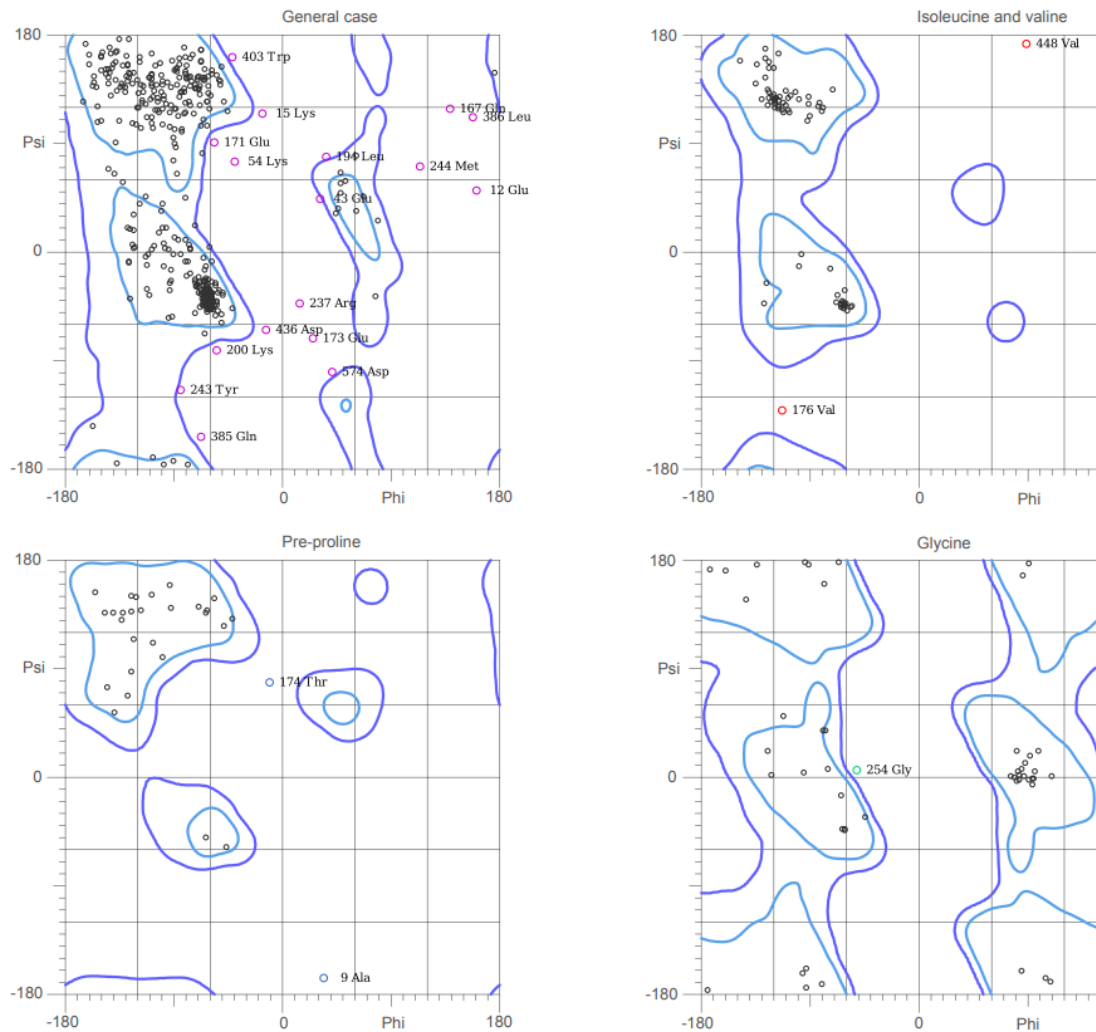


FIGURA 17 GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA LA NS3 DE ZIKV

Resultados del análisis de Ramachandran en Molprobit, se muestran: a) Caso general, b) Isoleucina y valina, c) Pre-prolina y d) Glicina

Además del gráfico, el análisis de Ramachandran hecho por MolProbit arrojó los siguientes datos:

- 91.2% (561/615) de todos los residuos se encontraban en zonas favorecidas (Esperado: 98%)
- 96.8% (593/615) de todos los residuos se encontraban en zonas permitidas (Esperado: >99.8%)
- Z score 0.44 ± 0.34

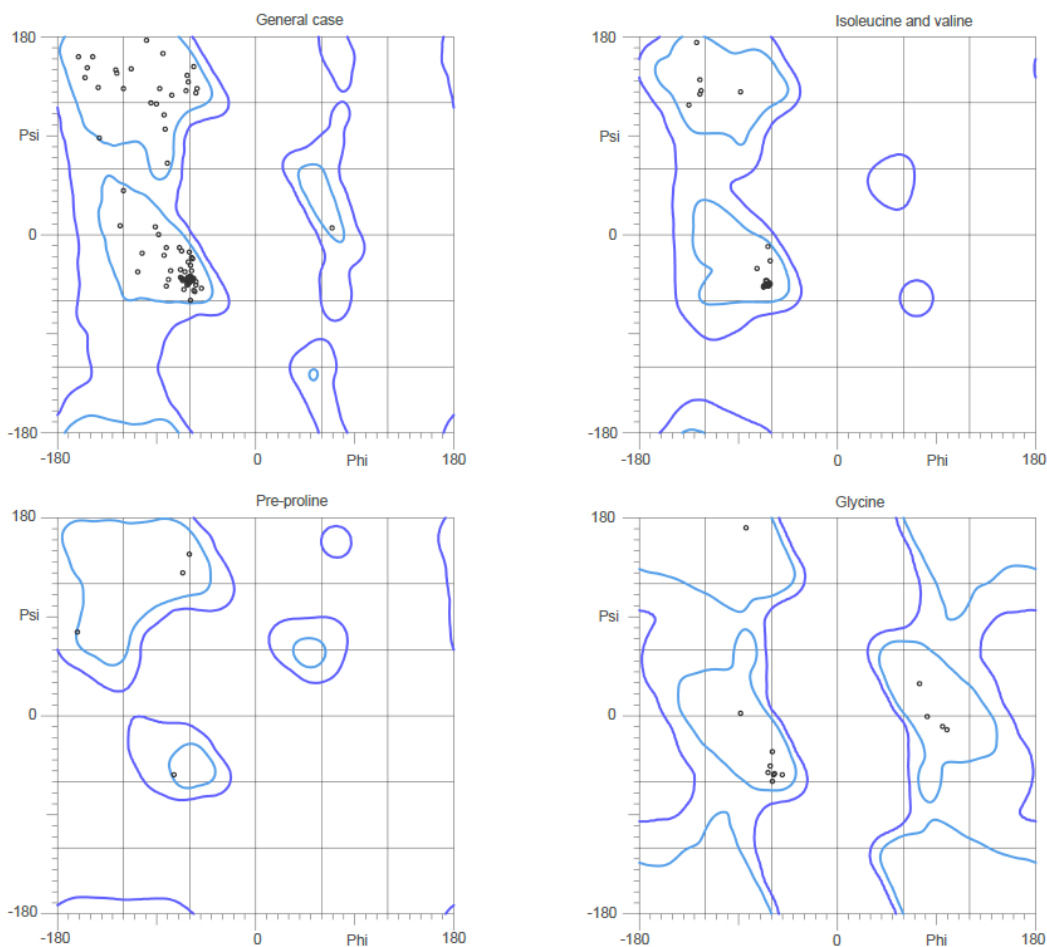


FIGURA 18 GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA LA NS2B DE ZIKV

Resultados del análisis de Ramachandran en Molprobity, se muestran: a) Caso general, b) Isoleucina y valina, c) Pre-prolina y d) Glicina.

Además del gráfico, el análisis de Ramachandran hecho por MolProbity arrojó los siguientes datos:

- 91.9% (685/745) de todos los residuos se encontraban en zonas favorecidas (Esperado: 98%)
- 96.8% (721/745) de todos los residuos se encontraban en zonas permitidas (Esperado: >99.8%)
- *Z score*: 1.68 ± 0.73

Posteriormente se realizaron las simulaciones de MD para los tres modelos, donde se analizó la trayectoria de la molécula para verificar que no hubiera

estiramiento/ruptura de enlaces (resultados no mostrados), también se obtuvieron la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (RMSD, por sus siglas en inglés) y el radio de giro para las moléculas, los cuales dan una idea del comportamiento estructural de la molécula. Estos gráficos fueron obtenidos mediante las herramientas *gmx rms* (RMSD) y *gmx gyrate* (radio de giro).

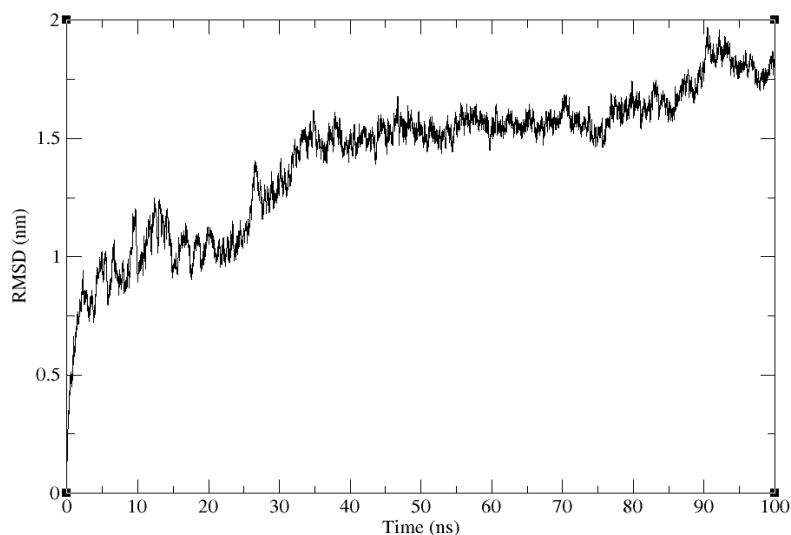


FIGURA 19 GRÁFICO RMSD PARA LA NS2B3 DE ZIKV
Relación entre el RMSD de la NS2B3 y el tiempo de simulación transcurrido.

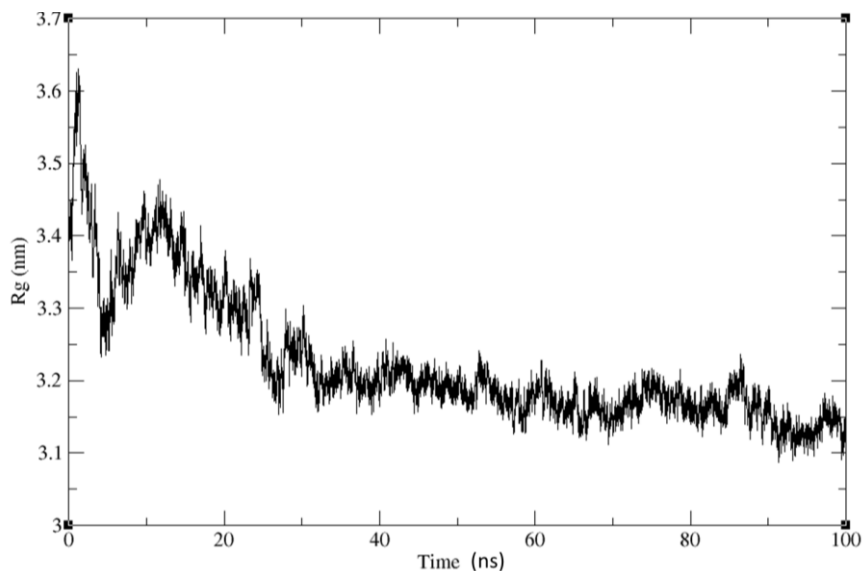


FIGURA 20 GRÁFICO DEL RADIO DE GIRO PARA LA NS2B3 DE ZIKV
Relación entre el radio de giro de la NS2B3 y el tiempo transcurrido de simulación.

Para los resultados obtenidos en el análisis de la simulación de la NS2B3 de ZIKV, en la figura 19 se puede observar que el RMSD no se mantiene estable a lo largo de la simulación lo que indica una alta variación de las posiciones con respecto a la posición inicial. Mientras que en la figura 20 se puede observar que el radio de giro empieza a tener menor variación a partir de los 30ns de la simulación.

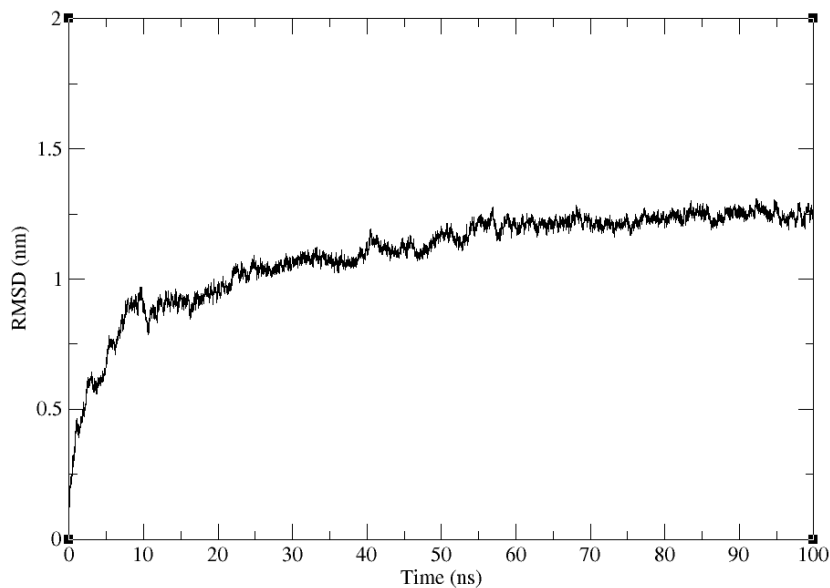


FIGURA 21 GRÁFICO DEL RMSD DE LA NS3 DE ZIKV
Relación entre el RMSD de la NS2B3 y el tiempo de simulación transcurrido.

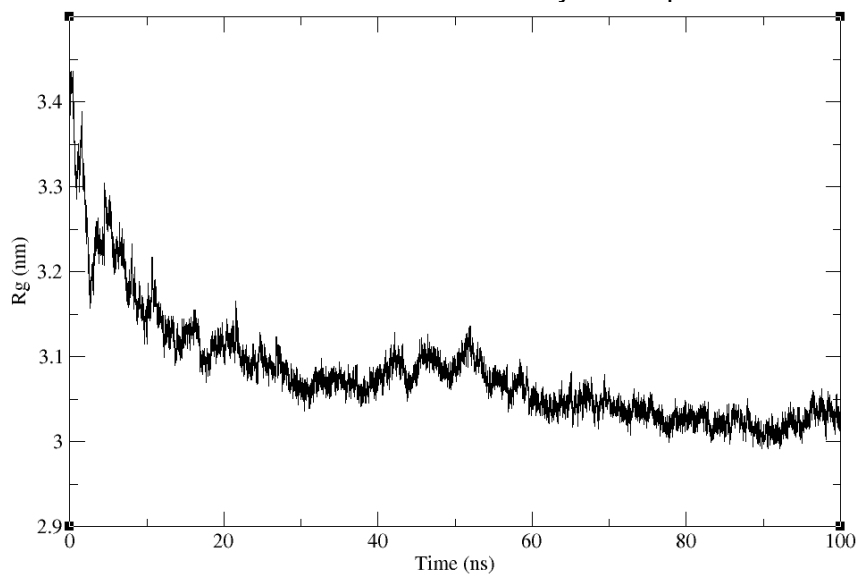


FIGURA 22 NS3 GRÁFICO DEL RADIO GIRO DE LA NS3 DE ZIKV
Relación entre el radio de giro de la NS2B3 y el tiempo de simulación transcurrido.

Para el análisis de la NS3 de ZIKV se puede observar en la figura 1 que el RMSD de la molécula cambia ligeramente después de los 10ns de simulación, oscilando entre los valores de 1 nm y 1.25 nm. Mientras que el radio de giro oscila entre los 3.0 nm y 3.1 nm a partir de los 20 ns de simulación.

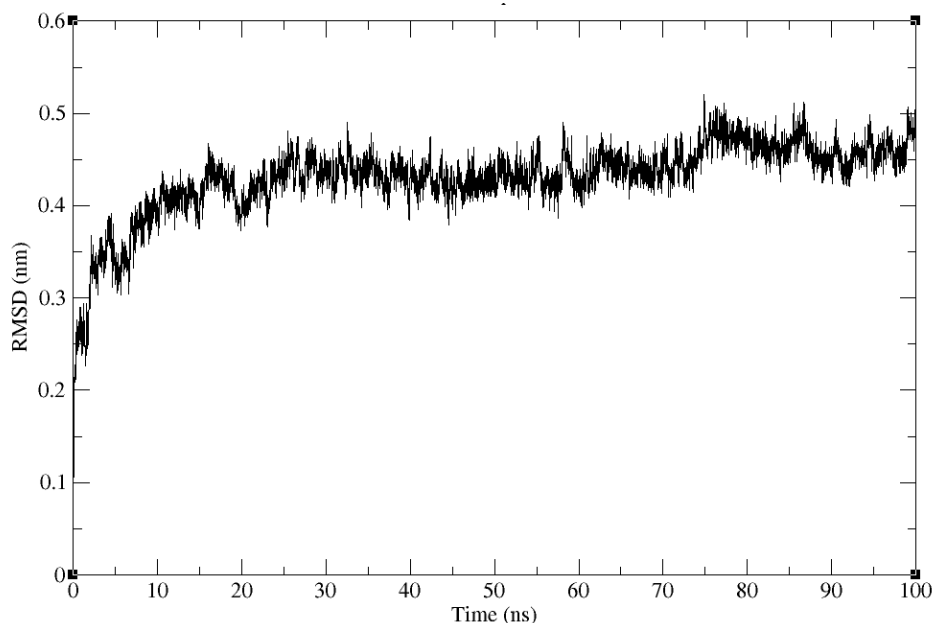


FIGURA 23 GRÁFICO DEL RMSD PARA LA NS2B DE ZIKV
Relación entre el RMSD de la NS2B y el tiempo de simulación transcurrido.

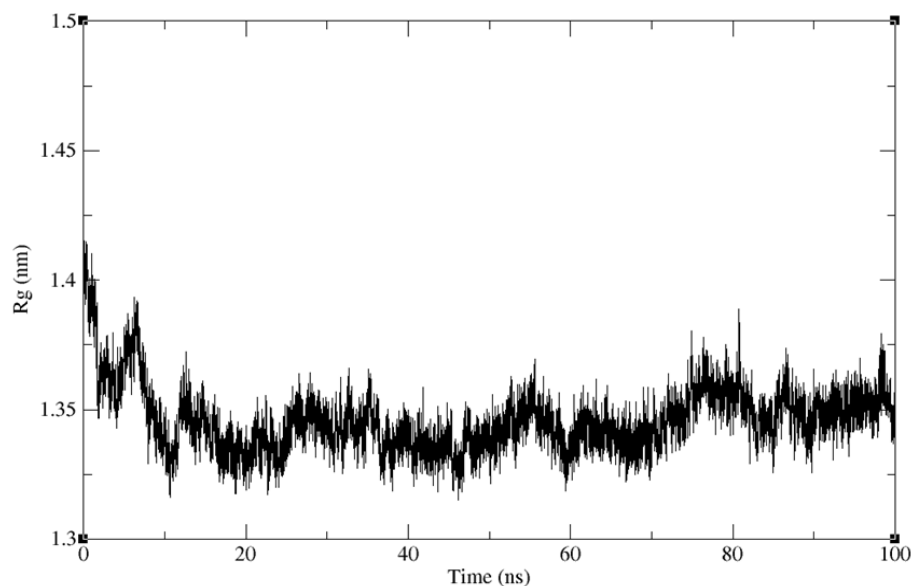


FIGURA 24 GRÁFICO DEL RADIO DE GIRO PARA LA NS2B DE ZIKV
Relación entre el radio de giro de la NS2B y el tiempo de simulación transcurrido.

Para el análisis de la NS2B de ZIKV se puede observar en la figura 23 que el valor del RMSD oscila entre los 0.3nm y 0.5nm durante toda la simulación, mientras que el radio de giro oscila alrededor de los 1.35nm a partir de los 10ns de simulación

Como parte de la validación de los modelos estructurales se realizó una comparación con un modelo tridimensional obtenido mediante métodos experimentales. Este será el modelo de referencia. Dicho modelo corresponde a la estructura de la NS3 de DENV 4 con número de acceso 2whx, su secuencia se muestra en el anexo 1. Al igual que lo obtenido para las moléculas construidas por homología se obtuvo la estructura tridimensional, el gráfico de Ramachandran, el gráfico de RMSD y el radio de giro para la proteína utilizada como referencia.



FIGURA 25 MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA NS3 DE DENV 4
Estructura tridimensional de la NS3 de DENV 4, número de acceso a UniProt 2whx.

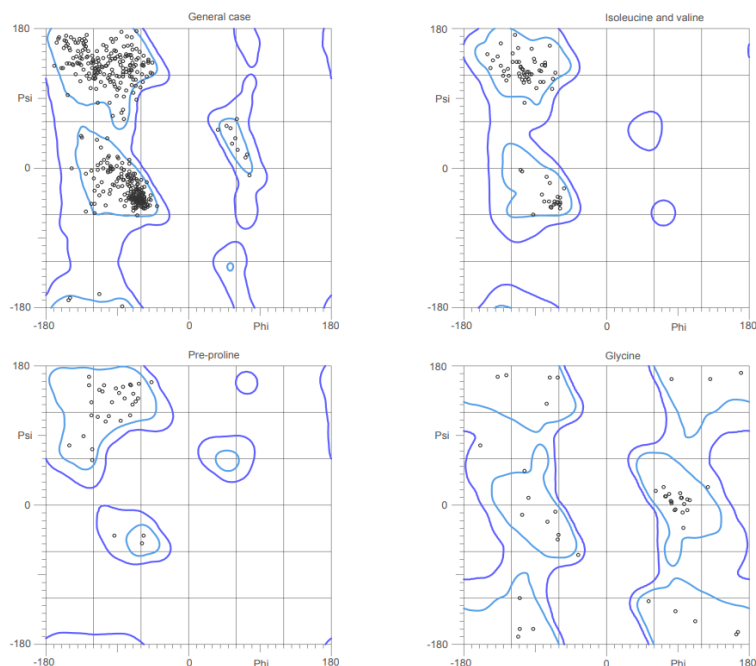


FIGURA 26 GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA LA NS3 DE DENV 4

Resultados del análisis de Ramachandran en Molprobit, se muestran: a) Caso general, b) Isoleucina y valina, c) Pre-prolina y d) Glicina.

Además del gráfico, el análisis de Ramachandran hecho por MolProbit arrojó los siguientes datos:

- 95.4% (559/586) de todos los residuos se encontraban en zonas favorecidas (Esperado: 98%)
- 99.8% (585/586) de todos los residuos se encontraban en zonas permitidas (Esperado: >99.8%)
- Z score: -1.49 ± 0.31

En la figura 27 se puede observar que el modelo de la NS3 de DENV4 presenta poca variación en el valor de RMSD, oscilando entre 0.5nm y 0.7nm a partir de los 10 ns de simulación. Mientras que en la figura 28 se puede observar que el radio de giro de la molécula oscila entre 2.6 nm y 2.7 nm a partir de los 20 ns de simulación.

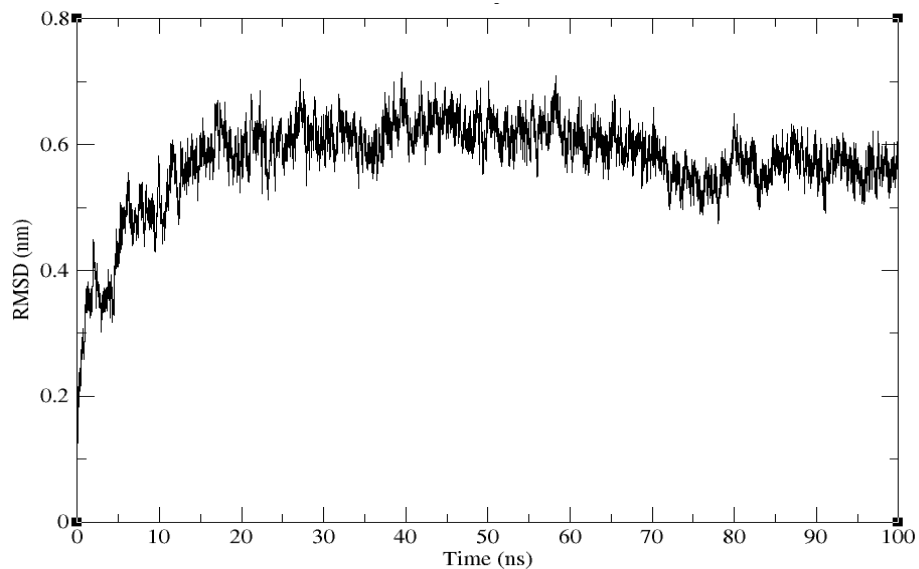


FIGURA 27 GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA LA NS3 DE DENV4

Relación entre el RMSD de la NS3 de DENV4 y el tiempo de simulación transcurrido.

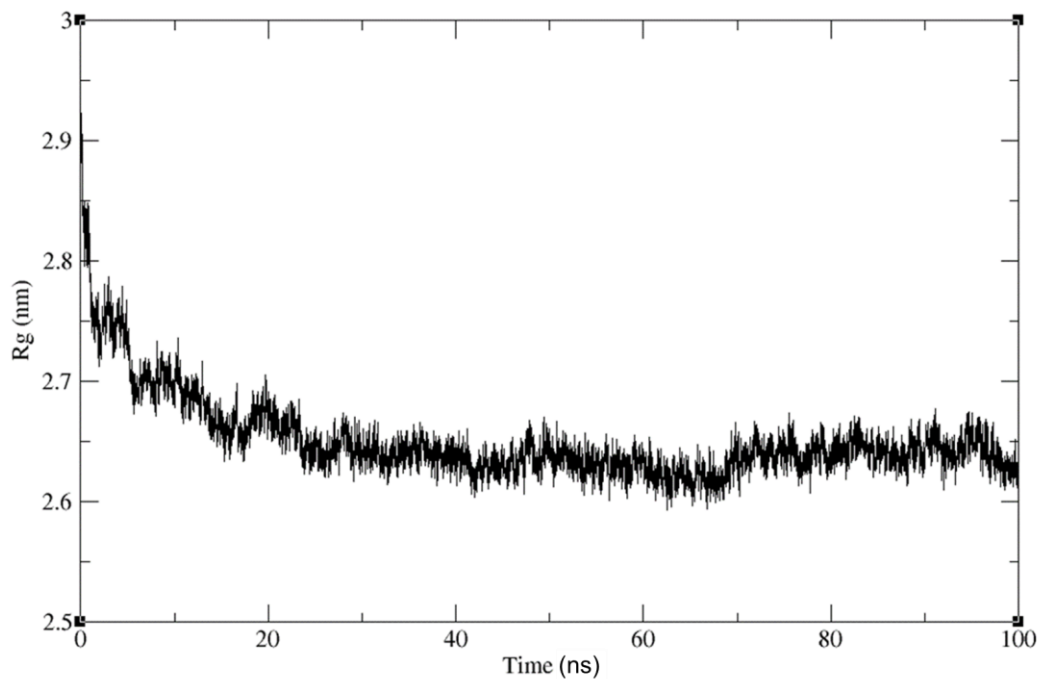


FIGURA 28 GRÁFICO DE RADIO DE GIRO PARA LA NS3 DE DENV4

Relación entre el radio de giro de la NS3 de DENV4 y el tiempo transcurrido de simulación.

8.0 Discusión

Al igual que la sección de resultados, la discusión estará dividida en dos secciones.

8.1 Estudio de interacciones NS3 – proteínas nucleares

Como primer paso se buscó estandarizar la metodología que sería empleada para la obtención de muestras donde se pudiera estudiar la interacción entre la NS3 de ZIKV y proteínas presentes en el núcleo de células Huh7. Se empezó verificando la técnica de fraccionamiento, con el propósito de cerciorarse de que no hubiera contaminación cruzada entre las muestras, para ellos se utilizaron marcadores de proteínas específicas de citoplasma y núcleo, la CRT y la lámina A/C respectivamente. No se tuvo ningún problema con la técnica ya que, como se observó, permite el aislamiento de fracciones puras.

Como parte del procedimiento se tituló un nuevo anticuerpo para detectar, específicamente, la NS3 de ZIKV. De los títulos empleados dos sirvieron para detectar la proteína, 1:1000 y 1:3000, sin embargo en la segunda concentración se observaron dos marcas, la primera a ~69KDa, correspondiente al peso de la NS3, y la segunda en aproximadamente 100KDa. Al consultar en la página del fabricante (GeneTex) se verificó que esta segunda marca es característica del anticuerpo, y de las distintas referencias publicadas se observa que puede o no aparecer al revelar la membrana. Es posible que se deba a la formación de un complejo entre el reactivo y la proteína de interés. Se podría pensar que dicha banda es consecuencia de una inespecificidad (Ghosh et al., 2014), sin embargo en la muestra *mock* no hay presencia de tal banda, por lo que se descarta esta posibilidad.

Posteriormente se llevó a cabo la identificación de la proteína NS3 en muestras obtenidas a partir de células infectadas, habiéndose detectado en los extractos totales así como en la fracción nuclear, corroborándose lo reportado sobre la presencia de esta proteína en este organelo.

En los resultados obtenidos en el primer análisis de las eluciones (Figura 7) se observa que en el primer ensayo no se detecta la presencia de la NS3, esto podría deberse a tres motivos:

- 1- La muestra no tiene NS3, sin embargo fue analizada anteriormente y se sabe que la proteína está presente, por lo tanto queda descartada
- 2- La cantidad de anticuerpo es muy baja y no da una señal lo suficientemente fuerte como para que sea detectada (Hoffman et al., 2016)
- 3- El tiempo para la formación del complejo anticuerpo – proteína fue insuficiente, lo cual tendría su origen en la afinidad del anticuerpo (Reverberi & Reverberi, 2007).

En los ensayos 2) y 3) se observa la presencia de NS3, por lo cual se puede afirmar que el motivo por el que no hay marca en el ensayo 1) es por una cantidad de anticuerpo insuficiente. Para estos ensayos se obtuvieron dos eluciones con presencia de la proteína NS3, mientras que el tercero no da marca alguna. Dado que este resultado se obtuvo en diversas ocasiones se consideró que estas serían suficientes para obtener la muestra.

Posteriormente se realizó un *Western Blot* del sobrenadante obtenido para cada una de las fracciones que se utilizaron para los ensayos de IP realizadas, de esto se pudo observar que tanto el ensayo 1) como el ensayo 2) dan marca para la presencia de NS3, mientras que el ensayo 3) no da marca alguna. De aquí se pueden discutir varias cosas: En primer lugar, la presencia de NS3 en el sobrenadante del ensayo 1) nos indica que la cantidad de anticuerpo y el tiempo empleados no fueron suficientes para lograr la captura de la proteína de interés, por lo que dichas condiciones no son las adecuadas para los objetivos de este trabajo. Después, la presencia de proteína en el ensayo 2) se puede atribuir a que el tiempo y la cantidad de anticuerpo empleada no fueron suficientes para lograr captar toda la proteína presente en la muestra, caso contrario ocurre con el ensayo 3) donde no se observa presencia de la proteína en el sobrenadante, por lo que se puede pensar que toda la proteína ha sido capturada durante la IP.

Los ensayos de IP se repitieron, aunque esta vez se realizó un ajuste a la concentración del anticuerpo. Durante la primera prueba se empleó una cantidad de anticuerpo dependiente de la cantidad de la proteína presente en la muestra, sin embargo, durante la realización del proyecto se pudo observar que las cantidades de proteína obtenidas de las fracciones nucleares eran relativamente constantes (datos no mostrados), por lo que se optó a expresar su concentración en función del volumen total, siendo estas: 4µg/mL y 10 µg/mL. Los ensayos 4), 5) y 6) se pueden considerar repeticiones de los ensayos 1), 2) y 3), respectivamente.

Para el ensayo 4) y con el antecedente de que no se obtuvo resultado alguno en el ensayo 1), se realizó un *pool* con ambas elusiones, obteniendo el mismo resultado, por lo que se finalmente se pueden descartar dichas condiciones para la IP. Mientras que 5) y 6) muestran resultados similares a los obtenidos durante la primera ronda de IP. Al analizar los sobrenadantes esta vez se observa que hay presencia de NS3 en los tres sobrenadantes, donde los ensayos 4) y 5) son consistentes con lo anteriormente obtenido, sin embargo en 6) se obtiene un resultado diferente al visto en 3). La marca positiva para la NS3 se puede explicar bajo el siguiente punto de vista: la infección de las células empleadas para la obtención de las fracciones nucleares que se utilizarían en los ensayos 1), 2) y 3) se realizó con un ZIKV diferente al empleado para las infecciones que corresponden a los ensayos 4), 5) y 6). Este último virus, tuvo una mayor infectividad con respecto al virus empleado durante los primeros ensayos, lo cual pudiera relacionarse con una mayor síntesis de las proteínas virales y por lo tanto una mayor descendencia viral formada durante la infección (Rodríguez et al., 2009). En conclusión, para obtener resultados consistentes es importante el unificar el proceso de obtención de *stocks* virales para que el proceso de infección no sea una fuente de incertidumbre durante la realización de los experimentos.

Finalmente con lo obtenido anteriormente, se propuso una metodología a utilizar en los ensayos de IP (figura 11). A pesar de que se trataron de

establecer algunas condiciones de experimentación, se encontraron dificultades durante el proceso previo a la IP, lo que nos indica que, se deben de estandarizar adecuadamente todas las condiciones requeridas en la técnica.

Una vez establecida la técnica a emplear para el estudio de las interacciones proteína – proteína se llevó a cabo una revisión sistemática con la finalidad de encontrar moléculas que fueran “culpables por asociación” para su interacción con ZIKV. En esta parte del trabajo se analizaron mediante criterios de inclusión 40 mil resúmenes obtenidos de la base de datos pubmed, dichos criterios de inclusión se dividieron en dos etapas, primero aquellos correspondientes única y exclusivamente al término “Zika”, así como aquellos relacionados con el término “flavivirus” ya que se podría estudiar la posible interacción con alguna proteína por homología con datos conocidos de algún otro virus perteneciente al género. Los resúmenes de esos 40 mil artículos se analizaron en un segundo filtro el cual incluía a las palabras “*nuclear*”, “NS3”, “*nucleus*”, ya que son los términos que más se relacionan con la temática de este proyecto. Sin embargo, todo artículo que cumpliera con dichos criterios era analizado para verificar que fuera un trabajo sobre ZIKV o algún flavivirus, ya que, por ejemplo, el término “nuclear” puede ser un poco ambiguo, y englobar resultados como “mononuclear”. Bajo estos criterios, sólo 92 artículos fueron seleccionados y revisados minuciosamente uno a uno, y se obtuvo un total de 21 moléculas de ubicación nuclear. Estas 21 moléculas mostraban alguna disrupción en su función, algún cambio de regulación en las vías de señalización donde participaban, cambio en su nivel de expresión, etc. Cabe mencionar que aquellos artículos que figuran como parte de los antecedentes de este trabajo se excluyeron.

Posteriormente se hizo una búsqueda en STRING *viruses*, sin embargo ZIKV no se encuentra en dicha base de datos, por lo que se decidió buscar proteínas virales homologas a la NS2B3 y reintentar la búsqueda en la base de datos. Los resultados obtenidos corresponden únicamente a otros flavivirus, como el

DENV, JEV, WNV, YFV, mientras algunos como el virus Bussuquara cuentan con menos de 20 artículos publicados en PubMed desde en un periodo de 52 años. Habiendo obtenido los resultados de homología, se compararon los resultados con lo existente en la base de datos. Las proteínas obtenidas en los interactomas se repiten en los diferentes virus analizados. Interesantemente, el origen de dicha información, según la página de STRING *virus*, es resultado de la minería de datos, lo que implica que en una base de datos como STRING no existe información actualizada ni verificada de manera experimental sobre la posible interacción de la NS2B3 de los flavivirus con alguna proteína nuclear de origen humano. Esta búsqueda arrojó siete proteínas nucleares (Tabla 3).

En conjunto con la primera parte de la revisión se obtuvo un total de 28 proteínas nucleares que podrían tener una asociación con la proteína NS3. El siguiente paso fue elegir algunas de estas proteínas para estudiar su posible interacción con la NS3, debido a distintos factores, principalmente la disponibilidad de reactivos. Se eligió estudiar a p53, DDX5, PTB y lámina nuclear.

Se realizó un ensayo de Co-IP donde la primer parte del procedimiento corresponde a lo realizado en la IP, una vez obtenidas las eluciones estas se analizaron por *Western Blot* para las diferentes proteínas seleccionadas, además se utilizaron una muestra de fracción nuclear y una muestra de extracto total, ambas provenientes de células infectadas, como controles para la presencia de las proteínas en estudio. Se utilizó una muestra *mock* y se realizó una IP donde el anticuerpo empleado fue GAPDH, esto para dar validez a los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en las muestras control son los esperados, ya que se tiene la presencia de todas las proteínas estudiadas. Las marcas correspondientes a NS3 se observan muy tenue, además de con el patrón de dos bandas descrito anteriormente. Dichas muestras se emplearon como controles en distintos experimentos, siendo descongeladas en distintas

ocasiones, esto conlleva a la desnaturalización de las distintas proteínas debido a la formación de cristales en cada proceso de congelación (Cao et al., 2003), además de que no se utilizó ningún agente crioprotector que permitiera mantener la integridad de las proteínas.

En la muestra *mock* y la muestra de la IP no se detectó ninguna banda de proteína con el anticuerpo anti GAPDH esto nos demostró que las bandas obtenidas para NS3 son específicas.

Finalmente, para la Co-IP se utilizó a la lámina nuclear como control del ensayo, ya que, como se menciona en los antecedentes (Uchil et al., 2006; Cortese et al., 2017) hay evidencia de que la presencia de la NS3 en el núcleo celular afecta a dicha molécula. Sin embargo, no se observa marca para ninguna de las moléculas en estudio. Esto puede atribuirse a distintos factores, los cuales se analizarán a continuación

A) La primera y más sencilla de las opciones es que no exista interacción o que la NS3 no esté interactuando de manera directa con ninguna de estas proteínas, lo que explicaría por qué no hay resultado positivo para los ensayos de Co-IP.

Se han reportado varios interactomas para la NS3 de ZIKV (Coyaud et al., 2018; Shah et al., 2018), y se sabe de su amplia interacción con el sistema de endomembranas, aun así existe poca información sobre las interacciones con proteínas nucleares. Esto nos lleva a nuestro siguiente punto.

B) La naturaleza de las interacciones proteína – proteína: Biológicamente existen distintos tipos, aquellas “obligadas” y “no obligadas”, este segundo grupo de interacciones contiene una subclasificación de interacciones conocidas como “transitorias” las cuales a su vez pueden ser fuertes o débiles (Acuner Ozbabacan et al., 2011). De entre todas estas clasificaciones las interacciones transitorias débiles son las de menor estabilidad y duración, interesantemente se ha descrito que este tipo de interacciones participan en procesos tales como la respuesta inmune,

C) apoptosis, supresión de tumores, etc. (Ghadie & Xia, 2022). Es probable que si dichas interacciones existen sean transitorias y no sea posible detectarlas mediante una simple técnica de Co-IP, por ello el realizar un entrecruzamiento (*crosslinking* o *XL*) previo sería la mejor opción. Es posible realizar un XL reversible mediante el uso de formaldehído (Kast & Klockenbusch, 2010), esto permitiría estabilizar las interacciones entre NS3 y otras proteínas y posterior a la Co-IP se pueden romper dichas interacciones. Esto ayudaría a tener certeza de que hay proteínas además de la NS3 en las elusiones de las IP, lo cual resolvería también el problema presentado en el inciso A, ya que se podría estudiar a manera de *screening* las interacciones de la proteína viral en el núcleo celular, pues hacerlo de manera individual resulta demasiado complejo.

Estas opciones representan los puntos más “convencionales”, sin embargo hay más factores que pueden ser tomados en consideración:

- 1) En sentido estricto, los cambios de fuerza iónica también tienen efecto sobre los parámetros moleculares que permiten la existencia de interacciones entre proteínas (Möller et al., 2012), así que el uso de un buffer hipertónico podría estar influenciando.
- 2) Para la interacción entre el dominio de proteasa y proteínas nucleares, se puede estudiar a mayor detalle si estos cumplen con el perfil de sustratos susceptibles a la actividad de la proteasa viral (Gruba et al., 2016).
- 3) Debe ser tomado en cuenta que la NS3 puede interactuar no sólo mediante su dominio de proteasa. Además del resto de dominios descritos con anterioridad, también se sabe que la NS2B3 tiene IDRs (Li & Kang, 2020) lo que le da un amplio espectro de posibilidades para interactuar con otras proteínas. El estudio de este tipo de interacciones es un tanto complejo, ya que no sé puede estar seguro de todos los factores necesarios para que ocurran.
- 4) La NS3 de ZIKV ha sido reportada con mecanismos que no son propios de la proteína, mediante los cuales tiene interacciones con otras proteínas, un

ejemplo de ello es su interacción mediante motivos 14-3-3 para antagonizar a RIG-I y a MDA5 (Riedl et al., 2019).

8.2 Bioinformática estructural

A continuación se discutirán de los resultados obtenidos en los modelados por homología y la validación de los modelos.

En primer lugar se decidió realizar la construcción de un modelo tridimensional para la NS2B3 ya que no existe algún modelo en las bases de datos, *Protein Data Bank* ni *SwissProt*, que contenga la secuencia completa de la proteína, los modelos más completos corresponden a DENV y al virus de la encefalitis del valle de Murray. La falta de una estructura se debe a que, como se ha mencionado antes, la NS2B3 tiene IDRs las cuales no permiten una correcta cristalización de la proteína para la obtención de un modelo tridimensional. Para poder estudiar a la proteína en su totalidad es necesario tener toda la información de su secuencia y su estructura, ya que sus características fisicoquímicas dependen de ello. De ahí que se tomara la decisión de realizar un modelado por homología.

A pesar de que sólo se muestran los modelos finales para cada proteína, en un inicio se realizó una comparación entre varios servidores de modelado. Se utilizó el *SWISS-MODEL* del *Swiss Institute of Bioinformatics* (Waterhouse et al., 2018) y I-TASSER para el modelado de la NS3, NS2B y la NS2B3. Los algoritmos (los cuales no se discuten en este trabajo, pero se pueden consultar en la bibliografía proporcionada) son diferentes entre sí, siendo I-TASSER el que tiene mayor robustez al ser ejecutado, prueba de ello son sus resultados en el *Critical Assessment of Methods of Protein Structure* (CASP), el cual es un experimento mundial y comunitario que se realiza cada dos años, obteniendo el primer lugar en seis de las siete ediciones en las que han participado. Los modelos de NS2B3 y NS3 obtenidos mediante I-TASSER fueron seleccionados sobre los obtenidos por *SWISS-MODEL*, uno de los

factores que influyó mucho esta decisión fue que el modelo construido para NS2B3 mediante el segundo algoritmo estaba incompleto. Por los motivos anteriores se decidió utilizar I-TASSER, sin embargo este algoritmo presento dificultad para poder modelar la estructura tridimensional de la NS2B, por lo que se decidió usar un servidor alternativo conocido como Robetta, bajo una metodología de *ab initio*, que básicamente consiste en la construcción *de novo* del modelo tridimensional.

Una vez obtenidos los modelos, estos fueron refinados mediante el uso de otro servidor web. El propósito del refinamiento de una estructura tridimensional consiste en aumentar la precisión de los modelos construido *in silico* mediante el ajuste de la estructura secundaria y la modificación de las interacciones de las cadenas laterales (Adiyaman & McGuffin, 2021). Como primer punto de la validación estructural de los modelos se obtuvieron los gráficos de Ramachandran de los péptidos. Los gráficos de Ramachandran sirven como herramientas de verificación indirecta de la estereoquímica y la geometría de una proteína, mediante la premisa de que las distintas geometrías se encuentran en regiones electrostáticamente desfavorables, también llamadas “prohibidas” (Patil et al., 2018). La teoría nos dice que un gráfico con $\geq 90\%$ de residuos en áreas favorecidas así como un valor $|Z| < 2$ (Bilal, et al 2019; Oleg, et al 2020) es sinónimo de una estructura con buena calidad, por lo que los tres modelos obtenidos se consideran aptos para su uso al tener buenos parámetros físicos/geométricos/estéricos.

Para llevar a cabo la validación de los modelos se utilizó una metodología de simulaciones de MD, donde los objetivos son:

- a) Verificar la integridad del modelo: Es necesario saber si el modelo es capaz de resistir ser sometido a un campo de fuerza para simular su comportamiento. El principal problema es la posible disrupción del modelo, ya que en las simulaciones de MD la ruptura de un enlace se presenta como una deformación elástica en la molécula (Baljon & Robbins, 1999), esto puede identificarse como el alargamiento de los enlaces. Para ello hay

que revisar la trayectoria de la simulación durante toda la duración de ésta, para verificar que los modelos se mantengan íntegros. Las trayectorias de los tres modelos se analizaron y no se observó ningún cambio “elástico” en las estructuras, por lo que los modelos cumplen con esta condición.

b) Comparar el modelo tridimensional con uno similar que haya sido obtenido de manera experimental: Esto es necesario para verificar si el comportamiento de las moléculas es similar, lo cual le da más validez al modelo construido *in silico*. Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, no existen modelos de la NS2B3 ni la NS2B, por lo que esta comparación no se puede realizar para dichos modelos de ZIKV, y únicamente se analizarán los resultados de la MD. Para la NS3 se utilizó el modelo 2whx perteneciente a DENV 4. En primer lugar se analizarán los modelos de NS2B3 y NS2B.

NS2B

De acuerdo con la base de datos DISPROT (Sickmeier et al., 2007) la NS2B es una proteína que contiene IDRs así como transiciones desorden – orden (Roy et al., 2017), es decir hay presencia de estructuras secundarias. Al analizar la estructura tridimensional obtenida se puede determinar que contiene regiones de *loops* y giros aleatorios, correspondientes a las IDRs, además la proteína carece de zonas de baja complejidad (repetidos de uno o dos residuos de aminoácidos) y de zonas altamente cargadas (regiones ricas en residuos de aminoácidos básicos y ácidos) (Gonçalves-Kulik et al., 2022), además cuenta con cuatro regiones de hélice alfa.

Las fluctuaciones de valores en los gráficos de RMSD y Rg se mantienen en un cierto intervalo (0.4 nm – 0.5nm y 1.325nm -1.375nm respectivamente) a partir de los 10 ns de simulación. Esto se interpreta como el tiempo necesario para que el sistema se equilibre, por lo que las simulaciones deben extenderse a un total de 110ns para así observar el comportamiento del modelo construido por al menos 100ns (tiempo estándar de análisis).

La variación del RMSD es indicador de lo que sucede con el modelo, donde una variación de hasta 2-3 Å es normal en una proteína que no cambia su plegamiento durante la simulación (Becker, 2001).

NS2B3

Para esta proteína el valor de RMSD es alto, ya que oscila por entre los 15 Å y 20 Å (1.5 y 2.0 nm respectivamente). En primera instancia esto significaría que el modelo es muy inestable, sin embargo, esto se puede atribuir a distintos factores:

- La presencia de zonas muy flexibles (IDRs) en la proteína, lo cual da como resultado una alta fluctuación en la estructura, esto se debe al alto dinamismo que tienen dichos segmentos (Mishra et al., 2020). Esto último se puede confirmar al analizar la trayectoria.
- Los resultados pueden cambiar dependiendo del campo de fuerza utilizado, ya que son parámetros empíricos. Recientemente se ha descrito que los campos de fuerza GROMOS cuentan con parámetros físicos incorrectos que pueden llevar a una desviación de valores en algunas características (Hess et al., 2019), por lo que analizar los modelos bajo otro campo de fuerza como OPLS, CHARMM o AMBER puede ser una opción válida para mejorar el resultado obtenido.

No es posible validar la estructura de NS2B3 ZIKV con la estructura de referencia NS2B3 DENV, sin embargo se puede comparar el comportamiento de ambas moléculas bajo condiciones similares. En primer lugar se encuentran grandes diferencias en el comportamiento descrito por el RMSD. Estos cambios se pueden atribuir a la presencia de la NS2B en el modelo de ZIKV, ya que el modelo de referencia sólo tiene 12 aminoácidos de dicha proteína. De forma interesante se observa que el modelo tridimensional de DENV presenta un RMSD de hasta 7 Å, lo cual según la literatura (Becker, 2001), correspondería a una estructura de baja calidad o que tiene algún problema, por ello se hace una reiteración en la estandarización de un protocolo en el que se incluya un campo de fuerza adecuado para estas proteínas.

El análisis de las trayectorias junto a las estructuras promedio a lo largo de la simulación muestran que los dominios IDRs confieren una alta flexibilidad, especialmente al dominio de proteasa de la NS2B3. Dicha alta movilidad del dominio NS3(pro), así como la menor compactación de la proteína indicada por el radio de giro, en presencia de la NS2B, podría indicar que dicho cambio estructural puede ser de utilidad para la actividad de proteasa que yace en este dominio de la NS2B3.

NS3

Esta proteína muestra un comportamiento intermedio al de la NS2B3 de ZIKV y la NS3 de DENV, a pesar de que su RMSD tiene valores más bajos ~ 10 Å, se observan mayores fluctuaciones estructurales en el RMSD y en el radio de giro, esto se refleja en que tan constante se mantiene un valor, aunque la proteína llega a un punto de equilibrio a partir de los 20ns. Se puede visualizar que la ausencia de la NS2B en el modelo estructural reduce la movilidad de la proteína, comparada con el modelo de NS2B3, sin embargo por los factores discutidos anteriormente se puede esperar que los resultados para este modelo sean mejores después de una correcta estandarización de las condiciones de simulación (campo de fuerza).

9.0 Conclusiones

Es necesario optimizar la metodología de Co-IP para poder obtener a la NS3 junto a las proteínas con las que interactúa. En este contexto el utilizar una metodología de *crosslinking* químico con formaldehído parece ser viable, ya que dicha reacción es reversible con la ebullición de la muestra, lo cual puede realizarse una vez obtenido el eluido de la Co-IP. Sin embargo también es necesario tener un *stock* constante de virus cuyas características (pase y origen) no cambien demasiado, ya que como se vio pueden tener impacto en las técnicas. La optimización de la técnica serviría para confirmar o refutar los resultados observados durante este trabajo, así como dar viabilidad a la siguiente fase del proyecto, que permitiría identificar las interacciones proteína – proteína a manera de *screening* mediante una espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés).

Por otro lado, los modelos son viables para su uso ya que se mantienen íntegros durante las simulaciones, sin embargo, hay que tener en cuenta las condiciones con las que se trabaja, sin olvidar que dichos sistemas simulados son una simplificación del ambiente celular real. Es necesaria la estandarización de los protocolos y algoritmos de simulación de MD, principalmente el campo de fuerza ya que no se pueden esperar resultados óptimos de un modelo analizado con un campo con físicas incorrectas. Esto permitiría realizar un trabajo *in silico* de mayor precisión.

10.0 Perspectivas

10.1 *In vitro*

Para esta parte del proyecto se propone lo siguiente:

- Inclusión de un *crosslinking* químico reversible en el protocolo de Co-IP
- Verificar los resultados obtenidos después de establecida dicha metodología.
- Obtención masiva de muestras para mandar a MS.
- Identificación de proteínas en interacción con la NS2B3 de ZIKV así como su comparación con los resultados de la revisión sistemática.
- Debido a la naturaleza de NS3, NS2B3 y de NS2B, realizar estudios que permitan obtener más información sobre su estructura, sin la necesidad de cristalizar la proteína, tales como: dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS), dicroísmo circular (CD).

10.2 *In silico*

Para la parte computacional se propone lo siguiente:

- Estandarización de las condiciones de simulación, lo que incluye:
 - Campo de fuerza.
 - Modelo de solvatación.
 - Condiciones y modelos para cálculos electrostáticos.
 - Energía de minimización y ensambles canónicos.
 - Algoritmo de integración.
- Realizar un *docking* molecular con proteínas de interés o con proteínas en interacción encontradas experimentalmente.

Anexo 1

Secuencia de NS3B3 de ZIKV

SWPPSEVLTAVGLICALAGGFAKADIEMAGPMAAVGLLIVSYVWSGKSVD
M YIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREILKVV
LMAICGMNPIAIPFAAGAWYVYVKTGKRSGALWDVPAPKEVKKGETTDGV
YRVMTRRLLGSTQVGVGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYW
GDVKQDLVSYCGPWKLDAAWDGLSEVQLLAVPPGERARNIQTLPGIFKTK
DGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIKNGSYVSAITQGKR
EEETPVECFEPSMLKKKQLTVLDLHPGAGKTRRVLPEIVREAIKKRLRTVIL
APTRVVAEMEEALRGLPVRYMTTAVNVTHSGTEIVDLMCHATFTSRLQ
PIRVPNYNLNIMDEAHFTDPSSIAARGYISTRVEMGEAAAIFMTATPPGTRD
AFPDSNSPIMDTEVEVPERAWSSGFDWVTDHSGKTVWVFPVSVRNGNEIA
ACLTAKAGKRVIQLSRKTFEFQKTKNQEWDFVITTDISEMGANFKADRVI
DSRRCLKPVILDGERVILAGPMPVTHASAAQRRGRIGRNPKNKPGDEYMY
GGGCAETDEGHAWLEARMLLDNIYLQDGLIASLYRPEADKVAIEGEFK
LRTEQRKTFVELMKRGDLPVWLAYQVASAGITYTDRRWCFDGTNTIME
DSVPAEVWTKYGEKRVLKPRWMDARVCSHAALKSFKEFAAGKR

Secuencia de NS3 de DENV 4

ADLSLEKAANVQWDSGALWDVPSPAAAQKATLTEGVYRIMQRGLFGKTQ
VGVGIHMEGVFHTMWHVTRGSVICHESGRLEPSWADVRNDMISYGGGW
RLGDKWDKEEDVQVLAIEPGKNPKHVQTKPGLFKTLTGEIGAVTLDFKPG
TSGSPIINKKGKVIKGLYVTKSGDYVSAITQAERIGEPDYEVEDEDIFRK
KRLTIMDLHPGAGKTKRILPSIVREALKRRLRTLILAPTRVVAEMEEALRG
LPIRYQTPAVKSDHTGREIVDLMCHATFTTRLLSSTRVPNYNLIVMDEAHFT
DPCSVAARGYISTRVEMGEAAAIFMTATPPGSTDPFPQSNPIEDIEREPE
RSWNTGFDWITDYQGKTWVFPVSIKAGNDIANCLRKSGKRVQLSRKTFD
TEYPKTKLTDWDFVTTDISEMGANFRAGRVIDPRRCLKPVILTDGPERVIL
AGPIPVTASAAQRRGRIGRNPQEQEDDQYVFSGDPLKNDEDHAHWTEAK
MLLDNIYTPEGIPTLFGPEREKTQAIDGEFRLRGEQRKTFVELMRRGDLP
VWLSYKVASAGISYKDREWCFTGERNNQILEENMEVEIWTREGEKKLRP
KWLDARVYADPMALKDFKEFASGRK

Referencias

- Acuner Ozbabacan, S. E., Engin, H. B., Gursoy, A., & Keskin, O. (2011). Transient proteinprotein interactions. In *Protein Engineering, Design and Selection* (Vol. 24, Issue 9, pp. 635–648). <https://doi.org/10.1093/protein/gzr025>
- Adiyaman, R., & McGuffin, L. J. (2021). ReFOLD3: Refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W589–W596. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab300>
- Agumadu, V. C., & Ramphul, K. (2018). Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.3025>
- Al-Wassiti, H. A., Thomas, D. R., Wagstaff, K. M., Fabb, S. A., Jans, D. A., Johnston, A. P., & Pouton, C. W. (2021). Adenovirus terminal protein contains a bipartite nuclear localisation signal essential for its import into the nucleus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073310>
- Armstrong, N., Hou, W., & Tang, Q. (2017). Biological and historical overview of Zika virus. *World Journal of Virology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.5501/wjv.v6.i1.1>
- Baljon, A. R. C., & Robbins, M. O. (1999). *A molecular view of bond rupture*.
- Barzon, L., Trevisan, M., Sinigaglia, A., Lavezzo, E., & Palù, G. (2016a). Zika virus: From pathogenesis to disease control. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 363, Issue 18). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw202>
- Barzon, L., Trevisan, M., Sinigaglia, A., Lavezzo, E., & Palù, G. (2016b). Zika virus: From pathogenesis to disease control. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 363, Issue 18). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw202>
- Basarab, M., Bowman, C., Aarons, E. J., & Cropley, I. (2016). Zika virus. In *BMJ (Online)* (Vol. 352). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1049>
- Becker, O. M. (2001). *Computational biochemistry and biophysics*. M. Dekker.

- Beckham, J. D., & Tyler, K. L. (2015). Arbovirus Infections. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 1599–1611). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000240>
- Berendsen, H. J. C., Van Der Spoel, D., & Van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation PROGRAM SUMMARY Title of program: GROMACS version 1.0. In *Computer Physics Communications* (Vol. 91). <http://rugmd0.chela.rug.nl/gmx/gmx,egi>
- Bhattacharya, D., & Cheng, J. (2013a). 3Drefine: Consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 81(1), 119–131. <https://doi.org/10.1002/prot.24167>
- Bhattacharya, D., & Cheng, J. (2013b). i3Drefine Software for Protein 3D Structure Refinement and Its Assessment in CASP10. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069648>
- Bhattacharya, D., Nowotny, J., Cao, R., & Cheng, J. (2016). 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W406–W409. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW336>
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z., & Foster, P. R. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(6), 684–690. <https://doi.org/10.1002/bit.10612>
- Carod-Artal, F. J. (2018). Neurological complications of Zika virus infection. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 16, Issue 5, pp. 399–410). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1466702>
- Ceballos Liceaga, S. E., & Carbajal Sandoval, G. (2023). Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa SEMANA EPIDEMIOLÓGICA 22, 2023. www.gob.mx/salud
- Chakhtoura, N., Hazra, R., & Spong, C. Y. (2018). Zika virus: A public health perspective. In *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* (Vol. 30, Issue 2, pp. 116–122). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000440>
- Chmiela, S., Sauceda, H. E., Müller, K. R., & Tkatchenko, A. (2018). Towards exact molecular dynamics simulations with machine-

- learned force fields. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06169-2>
- Cook, H. V., Doncheva, N. T., Szklarczyk, D., von Mering, C., & Jensen, L. J. (2018). Viruses.STRING: A virus-host protein-protein interaction database. *Viruses*, 10(10).
<https://doi.org/10.3390/v10100519>
- 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>
- Coyaud, E., Ranadheera, C., Cheng, D., Gonçalves, J., Dyakov, B. J., Laurent, E. M., St-Germain, J., Pelletier, L., Gingras, A.-C., Brumell, J. H., Kim, P. K., Safronetz, D., & Raught, B. (2018). Global Interactomics Uncovers Extensive Organellar Targeting by Zika Virus* □ *S. Molecular & Cellular Proteomics*, 17, 2242–2255.
<https://doi.org/10.1074/mcp>
- Craighead, J. E. (2000). CHAPTER 22 - Papovaviruses. In J. E. Craighead (Ed.), *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease* (pp. 327–334). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012195160-3/50023-6>
- da Silva-Júnior, E. F., & de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (Vol. 27, Issue 18, pp. 3963–3978). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.038>
- Daura, X., Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (1998). Parametrization of Aliphatic CH United n Atoms of GROMOS96 Force Field. *Journal of Computational Chemistry*, 19(5).
- de Jesús-González, L. A., Cervantes-Salazar, M., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Palacios-Rápalo, S. N., Pérez-Olais, J. H., Cordero-Rivera, C. D., Hurtado-Monzón, A. M., Ruíz-Jiménez, F., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2020). The nuclear pore complex: A target for NS3 protease of dengue and Zika viruses. *Viruses*, 12(6).
<https://doi.org/10.3390/v12060583>
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddock, 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)
- Diniz, W. J. S., & Canduri, F. (2017). Bioinformatics: An overview and its applications. In *Genetics and Molecular Research* (Vol. 16, Issue 1). Fundacao de Pesquisas Cientificas de Ribeirao Preto.
<https://doi.org/10.4238/gmr16019645>
- Döhner, K., Cornelius, A., Serrero, M. C., & Sodeik, B. (2021). The journey of herpesvirus capsids and genomes to the host cell nucleus. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 50, pp. 147–158). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.005>
- 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>
- Fishburn, A. T., Pham, O. H., Kenaston, M. W., Beesabathuni, N. S., & Shah, P. S. (2022). Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847588>
- Flather, D., & Semler, B. L. (2015). Picornaviruses and nuclear functions: Targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue MAY). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00594>
- Frenkel, D., & Smit, B. (2002). Chapter 4 - Molecular Dynamics Simulations. In D. Frenkel & B. Smit (Eds.), *Understanding Molecular Simulation (Second Edition)* (pp. 63–107). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012267351-1/50006-7>
- Ghadie, M. A., & Xia, Y. (2022). Are transient protein-protein interactions more dispensable? *PLoS Computational Biology*, 18(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010013>
- Ghosh, R., Gilda, J. E., & Gomes, A. V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 11, Issue 5, pp. 549–560). Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635>

- Golubeva, V. A., Nepomuceno, T. C., Gregoriis, G. de, Mesquita, R. D., Li, X., Dash, S., Garcez, P. P., Suarez-Kurtz, G., Izumi, V., Koomen, J., Carvalho, M. A., & Monteiro, A. N. A. (2020). Network of Interactions between ZIKA Virus Non-Structural Proteins and Human Host Proteins. *Cells*, 9(1).
<https://doi.org/10.3390/cells9010153>
- Gonçalves-Kulik, M., Mier, P., Kastano, K., Cortés, J., Bernadó, P., Schmid, F., & Andrade-Navarro, M. A. (2022). Low Complexity Induces Structure in Protein Regions Predicted as Intrinsically Disordered. *Biomolecules*, 12(8).
<https://doi.org/10.3390/biom12081098>
- González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École Thématique de La Société Française de La Neutronique*, 12, 169–200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>
- Gorshkov, K., Shiryaev, S. A., Fertel, S., Lin, Y. W., Huang, C. T., Pinto, A., Farhy, C., Strongin, A. Y., Zheng, W., & Terskikh, A. V. (2019). Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03252>
- Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K. W., Hills, S., Kuehnert, M. J., Mead, P., Meaney-Delman, D., Rabe, I., Staples, E., & Petersen, L. R. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. In *Journal of Infectious Diseases* (Vol. 216, pp. S875–S883). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix396>
- Gruba, N., Rodriguez Martinez, J. I., Grzywa, R., Wysocka, M., Skoreński, M., Burmistrz, M., Łęcka, M., Lesner, A., Sieńczyk, M., & Pyrc, K. (2016). Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease. *FEBS Letters*, 590(20), 3459–3468.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12443>
- Gutiérrez-Bugallo, G., Piedra, L. A., Rodriguez, M., Bisset, J. A., Lourenço-de-Oliveira, R., Weaver, S. C., Vasilakis, N., & Vega-Rúa, A. (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. In *Nature Ecology and Evolution* (Vol. 3, Issue 4, pp. 561–569). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>
- Hasan, S. S., Sevana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 13–20). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>

- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 15, Issue 9, pp. 1347–1350).
<https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- Hess, B., Van Der Spoel, D., Abraham, M. J., & Lindahl, E. (2019). *On The Importance of Accurate Algorithms for Reliable Molecular Dynamics Simulations*.
- Hilgenfeld, R. (2016). Zika virus NS 1, a pathogenicity factor with many faces . *The EMBO Journal*, 35(24), 2631–2633.
<https://doi.org/10.15252/emj.201695871>
- Hill, M. E., Kumar, A., Wells, J. A., Hobman, T. C., Julien, O., & Hardy, J. A. (2018). The Unique Cofactor Region of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Facilitates Cleavage of Key Host Proteins. *ACS Chemical Biology*, 13(9), 2398–2405.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00508>
- Hiranuma, N., Park, H., Baek, M., Anishchanka, I., Dauparas, J., & Baker, D. (2020). *Improved protein structure refinement guided by deep learning based accuracy estimation*.
<https://doi.org/10.1101/2020.07.17.209643>
- Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: Hijacking the dynamic nucleolus. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 119–127).
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1597>
- Hoffman, G. E., Murphy, K. J., & Sita, L. V. (2016). The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Current Protocols in Neuroscience*, 2016, 2.12.1-2.12.37.
<https://doi.org/10.1002/cpns.1>
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. In *Proteins: Structure, Function and Genetics* (Vol. 65, Issue 3, pp. 712–725). <https://doi.org/10.1002/prot.21123>
- Hou, W., Cruz-cosme, R., Armstrong, N., Obwolo, L. A., Wen, F., Hu, W., Luo, M. H., & Tang, Q. (2017). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*, 628, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>
- Hunt, L. (1984). Margaret Oakley Dayhoff 1925–1983. *Bulletin of Mathematical Biology*, 46(4), 467–472.
<https://doi.org/10.1007/BF02459497>

- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>
- Kasamatsu, H., & Nakanishi, A. (1998). HOW DO ANIMAL DNA VIRUSES GET TO THE NUCLEUS? In *Annu. Rev. Microbiol* (Vol. 52). www.annualreviews.org
- Kast, J., & Klockenbusch, C. (2010). Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin β 1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/927585>
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: Origine et propagation d'un virus transmis par des moustiques. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), 675-686C. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.171082>
- Lee, J. K., & Shin, O. S. (2019). Advances in zika virus–host cell interaction: Current knowledge and future perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20051101>
- Leonhard, S. E., Mandarakas, M. R., Gondim, F. A. A., Bateman, K., Ferreira, M. L. B., Cornblath, D. R., van Doorn, P. A., Dourado, M. E., Hughes, R. A. C., Islam, B., Kusunoki, S., Pardo, C. A., Reisin, R., Sejvar, J. J., Shahrizaila, N., Soares, C., Umapathi, T., Wang, Y., Yiu, E. M., ... Jacobs, B. C. (2019). Diagnosis and management of Guillain–Barré syndrome in ten steps. *Nature Reviews Neurology*, 15(11), 671–683. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0250-9>
- Li, Q., & Kang, C. (2020). Insights into structures and dynamics of flavivirus proteases from NMR studies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072527>
- Lin, H. H., Huang, L. M., & Wu, S. C. (2017). Zika virus molecular biology and perspectives for vaccine development: A review. In *Journal of Nursing Research* (Vol. 25, Issue 1, pp. 3–6). Taiwan Nurses Association. <https://doi.org/10.1097/jnr.000000000000205>
- Long, Q., Yan, R., Hu, J., Cai, D., Mitra, B., Kim, E. S., Marchetti, A., Zhang, H., Wang, S., Liu, Y., Huang, A., & Guo, H. (2017). The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation. *PLoS Pathogens*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006784>

- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. In *Viruses* (Vol. 9, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
- Lowe, R., Barcellos, C., Brasil, P., Cruz, O. G., Honório, N. A., Kuper, H., & Carvalho, M. S. (2018). The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph15010096>
- Mackerell, A. D. (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. In *Journal of Computational Chemistry* (Vol. 25, Issue 13, pp. 1584–1604). <https://doi.org/10.1002/jcc.20082>
- Marcellin, D. F. H., Guo, L., Yu, H., Wang, S., Pielnaa, P., Saro, A., Masokano, I. B., Adil, M. M., Yuan, L., Huang, Y., Cai, D., Zheng, R., Huang, Z., Luo, A., Disoma, C., Liu, P., Xia, Z., & Huang, J. (2022). Zika Virus and Its Association with Neurological Disorders. *Advances in Microbiology*, 12(04), 198–217. <https://doi.org/10.4236/aim.2022.124016>
- Martí, M. A., & Turjanski, A. A. (2009). *La bioinformática estructural o la realidad virtual de los medicamentos*. www.pdb.org
- Martinez Carranza, R. (2019). *Identificación de dominios de unión a calcio y el efecto de las fosforilaciones en la sialoproteína ósea, mediante análisis bioinformáticos y simulaciones de dinámica molecular*.
- Matreyek, K. A., & Engelman, A. (2013). Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. In *Viruses* (Vol. 5, Issue 10, pp. 2483–2511). <https://doi.org/10.3390/v5102483>
- Mattola, S., Aho, V., Bustamante-Jaramillo, L. F., Pizzioli, E., Kann, M., & Vihinen-Ranta, M. (2022). Nuclear entry and egress of parvoviruses. In *Molecular Microbiology* (Vol. 118, Issue 4, pp. 295–308). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/mmi.14974>
- Mishra, P. M., Uversky, V. N., & Giri, R. (2018). Molecular Recognition Features in Zika Virus Proteome. *Journal of Molecular Biology*, 430(16), 2372–2388. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.018>
- Mishra, P. M., Verma, N. C., Rao, C., Uversky, V. N., & Nandi, C. K. (2020). Intrinsically disordered proteins of viruses: Involvement in the mechanism of cell regulation and pathogenesis. In *Progress in*

- Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 174, pp. 1–78). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.03.001>
- Möller, J., Schroer, M. A., Ernkamp, M., Grobelny, S., Paulus, M., Tiemeyer, S., Wirkert, F. J., Tolan, M., & Winter, R. (2012). The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: From nonlinear pressure response to protein crystallization. *Biophysical Journal*, *102*(11), 2641–2648. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.043>
- Moore, C. A., Staples, J. E., Dobyns, W. B., Pessoa, A., Ventura, C. V., Da Fonseca, E. B., Ribeiro, E. M., Ventura, L. O., Neto, N. N., Arena, J. F., & Rasmussen, S. A. (2017). Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. In *JAMA Pediatrics* (Vol. 171, Issue 3, pp. 288–295). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.3982>
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. In *Chemical Biology and Drug Design* (Vol. 93, Issue 1, pp. 12–20). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13388>
- Muñoz, L. S., Parra, B., Pardo, C. A., & Study, N. E. in the A. (2017). Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl_10), S897–S905. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix511>
- Musso, D., Bossin, H., Mallet, H. P., Besnard, M., Brout, J., Baudouin, L., Levi, J. E., Sabino, E. C., Ghawche, F., Lanteri, M. C., & Baud, D. (2018). Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 5, pp. e172–e182). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30446-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30446-2)
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 125–142). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Ngan, N. T. T., Kim, S. J., Lee, J. Y., & Myoung, J. (2019). Zika virus proteins NS2A and NS4A are major antagonists that reduce IFN- β promoter activity induced by the MDA5/RIG-I signaling pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(10), 1665–1674. <https://doi.org/10.4014/jmb.1909.09017>

- Palacios-Rápalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). Nuclear localization of non-structural protein 3 (NS3) during dengue virus infection. *Archives of Virology*, 166(5), 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05026-w>
- Pan American Health Organization. (2023). *Epidemiological Update Dengue, Chikungunya and Zika*.
- Pan, Y., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., & Jia, R. (2021). The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.654494>
- Patil, V. M., Balasubramanian, K., & Masand, N. (2018). Dengue virus polymerase: A crucial target for antiviral drug discovery. In *Viral Polymerases: Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets* (pp. 387–428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815422-9.00014-0>
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. In *Virology* (Vol. 543, pp. 34–42). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). ZIKA virus: An emerging worldwide threat. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01417>
- Reverberi, R., & Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4), 227–240. <https://doi.org/10.2450/2007.0047-07>
- Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Cervantes-Salazar, M., Lagunes Guillen, A. E., Chávez-Munguía, B., Salas-Benito, J. S., & Del Ángel, R. M. (2018). Strand-like structures and the nonstructural proteins 5, 3 and 1 are present in the nucleus of mosquito cells infected with dengue virus. *Virology*, 515, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.014>
- Riedl, W., Acharya, D., Lee, J. H., Liu, G., Serman, T., Chiang, C., Chan, Y. K., Diamond, M. S., & Gack, M. U. (2019). Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-

- Mediated Innate Immunity. *Cell Host and Microbe*, 26(4), 493-503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.012>
- Ritter, J. M., Martines, R. B., & Zaki, S. R. (2017). Zika virus: Pathology from the pandemic. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(1), 49–59. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0397-SA>
- Rodríguez, R. A., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 75, Issue 2, pp. 297–307). <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-08>
- Roy, A., Lim, L., Srivastava, S., Lu, Y., & Song, J. (2017). Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180632>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P., & Van Gunsteren, W. F. (1999). The GROMOS biomolecular simulation program package. *Journal of Physical Chemistry A*, 103(19), 3596–3607. <https://doi.org/10.1021/jp984217f>
- Shah, P. S., Link, N., Jang, G. M., Sharp, P. P., Zhu, T., Swaney, D. L., Johnson, J. R., Von Dollen, J., Ramage, H. R., Satkamp, L., Newton, B., Hüttenhain, R., Petit, M. J., Baum, T., Everitt, A., Laufman, O., Tassetto, M., Shales, M., Stevenson, E., ... Krogan, N. J. (2018). Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell*, 175(7), 1931-1945.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.028>
- Sharma, V., Sharma, M., Dhull, D., Sharma, Y., Kaushik, S., & Kaushik, S. (2020). Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 66, Issue 2, pp. 87–98). Canadian Science Publishing. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0331>
- Shen, Q., Wu, C., Freniere, C., Tripler, T. N., & Xiong, Y. (2021). Nuclear import of hiv-1. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v13112242>

- Sickmeier, M., Hamilton, J. A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M. S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V. N., Obradovic, Z., & Dunker, A. K. (2007). DisProt: The database of disordered proteins. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl893>
- Smithburn, K. C. (1952). Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *The Journal of Immunology*, *69*(2), 223–234. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.69.2.223>
- Smithburn, K. C., Kerr, J. A., & Gatne, P. B. (1954). Neutralizing Antibodies Against Certain Viruses in the Sera of Residents of India. *The Journal of Immunology*, *72*(4), 248–257. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.72.4.248>
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 308, pp. 50–64). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
- Song, Y., Dimaio, F., Wang, R. Y. R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., & Baker, D. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*, *21*(10), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>
- Uchil, P. D., Kumar, A. V. A., & Satchidanandam, V. (2006). Nuclear Localization of Flavivirus RNA Synthesis in Infected Cells. *Journal of Virology*, *80*(11), 5451–5464. <https://doi.org/10.1128/jvi.01982-05>
- Uversky, V. N. (2010). Seven lessons from one IDP structural analysis. In *Structure* (Vol. 18, Issue 9, pp. 1069–1071). <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.08.003>
- Valente, A. P., & Moraes, A. H. (2019). Zika virus proteins at an atomic scale: How does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? In *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* (Vol. 25). Centro de Estudos de Venenos e Animais Peconhentos. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0013>
- Valentine, M. J., Murdock, C. C., & Kelly, P. J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. In *Parasites and Vectors* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3732-0>

- Van Den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular insights into the flavivirus replication complex. *Viruses*, 13(6).
<https://doi.org/10.3390/v13060956>
- Verlet, L. (1967). *“Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*.
- Walker, E. J., & Ghildya, R. (2017). Editorial: Viral interactions with the nucleus. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00951>
- Walker, J. M. (2012). *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™ Series Editor*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Wassenaar, T. A. (2006). *Molecular dynamics of sense and sensibility in processing and analysis of data*. s.n.].
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, 27(1), 293–315.
<https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- World Health Organization. (2022). *Zika Epidemiology Update*.
- Xu, Q., Dai, H., Zhao, T., & Wei, D. (2015). Introduction to Structural Bioinformatics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 827. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9245-5_1
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., Chen, X., Shi, P.-Y., Zhang, C. X., P-y, S., & Stacy Horner, E. M. (2019). *Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly*. <https://doi.org/10.1128/mBio>
- Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact

maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*, 1(3). <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>

Zhou, K., & Liu, B. (2022). Fundamentals of classical molecular dynamics simulation. In *Molecular Dynamics Simulation* (pp. 1–40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816419-8.00006-4>

Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang, G., & Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 17(10), 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>