



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Funciones de la proteína de cápside del virus de Zika durante la infección

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Guadalupe Soledad Costa Navarro

Directora de Tesis: Dra. Andrea V. Gamarnik

Consejera de estudios: Dra. Viviana Castilla

Fundación Instituto Leloir
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires - CONICET
Ciudad de Buenos Aires, Argentina
Buenos Aires, 23 de febrero de 2023

Resumen

Funciones de la proteína de cápside del virus de Zika durante la infección

El virus de Zika (ZIKV) es un virus emergente causante de epidemias en humanos. En la actualidad no existen antivirales ni vacunas aprobadas para su control. En este trabajo se abordó el estudio de aspectos bioquímicos y funcionales de la proteína de cápside de ZIKV. Se generaron herramientas para el estudio de la interacción de la proteína con membranas celulares y con ARN, proponiéndose un modelo de encapsidación. Asimismo, se desarrollaron herramientas genéticas para estudiar la localización, distribución y movilidad de la proteína en células infectadas por medio de microscopías avanzadas. La proteína se localizó en nucleolos, retículo endoplásmico y *lipid droplets*, y se identificaron por mutagénesis los residuos específicos responsables de la localización nuclear. En células vivas se estudió la movilidad de la proteína en las interfases citoplasma-núcleo y nucleoplasma-nucleolo observándose un comportamiento diferencial entre las proteínas de ZIKV y la del virus del dengue. Estudios de la región codificante de la proteína de cápside de ZIKV permitieron identificar elementos conservados que se atribuyeron a un requerimiento de señales a nivel del ARN y no a nivel de la proteína. Así, se descubrieron nuevas estructuras de ARN esenciales para la replicación viral. Mutaciones de esta estructura, sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína de cápside, impidieron la infección en células de mosquito y atenuaron la infección en células humanas. Los estudios realizados proveen información relevante para el diseño racional de drogas antivirales y mecanismos de atenuación con el fin de elaborar candidatos vacunales.

Palabras clave: Flavivirus, proteína de Cápside viral, virus de Zika, Virus de ARN, Replicación viral, Encapsidación viral, Interacción virus-célula

Abstract

Zika virus capsid protein functions during infection

Zika virus (ZIKV) is an emerging virus causing epidemics in humans. There are currently no approved antivirals or vaccines for its control. In this work, we studied biochemical and functional aspects of the ZIKV capsid protein. Tools were generated to evaluate the interaction of the protein with cell membranes and RNA. This study allowed us to propose an encapsidation model. In addition, genetic tools were developed to study the location, distribution and mobility of the capsid protein in ZIKV infected cells using advanced microscopy. The protein was localized in nucleoli, endoplasmic reticulum and lipid droplets, and the specific residues responsible for nuclear localization were identified by mutagenesis. In living cells, the mobility of the protein at the cytoplasm-nucleus and nucleoplasm-nucleolus interfaces was studied, observing a differential behavior between the ZIKV and dengue virus capsid proteins. Studies of cis-acting RNA elements present in the capsid protein coding region allowed us to identify conserved elements involved in viral replication. Mutations of this structure, without changing the amino acid sequence of the capsid protein, prevented infection in mosquito cells and attenuated infection in human cells. The studies carried out here provide new information about properties of the capsid protein that are relevant for both, the rational design of antiviral drugs and viral attenuation for designing vaccine candidates.

Keywords: Flavivirus, Viral Capsid, Zika virus, RNA virus, Viral replication, Viral encapsidation, virus-cell interaction

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que formaron parte de este trabajo de tesis tanto desde lo intelectual como desde lo emocional.

En primer lugar, quiero agradecer a la universidad pública y gratuita, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por permitirme desarrollarme en una nueva carrera. A la Fundación Instituto Leloir por darme un lugar y un ambiente de trabajo excepcionales y al CONICET y los organismos de financiamiento del laboratorio por facilitar los recursos necesarios para realizar este trabajo.

A mi directora, Andrea Gamarnik, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por confiar en mí. Gracias por enseñarme cómo se lleva a cabo un proyecto de investigación con entusiasmo y sobre todo con perseverancia.

A mis compañeros de laboratorio por el ambiente de trabajo siempre colaborativo. Gracias por enseñarme cosas todos los días y por el apoyo en cada uno de los momentos de la tesis. A Laura Byk por recibirme y enseñarme con paciencia cuando empecé en el laboratorio. Gracias por seguir apoyándome y acompañándome con la tesis, incluso a la distancia. A Hora, Luana, Mora, Diego y Santi, y a mis antiguos compañeros Juan, Leopoldo y Lauti. Gracias a todos por este gran grupo de trabajo, cada uno de ustedes me dejó un aprendizaje o un lindo recuerdo.

A mi comité de seguimiento de tesis conformado por Viviana Castilla, Jimena Rinaldi y Mariana Del Vas por demostrarme su interés en los resultados que fui presentando cada año, por sus aportes y por su calidez.

A mis amigos de la facultad, con los que también en el doctorado seguimos transitando este camino juntos, y nos acompañamos en los altos y bajos de la carrera. A mis amigos de toda la vida Pili, Seve, Sofi, Meni y Marco. A Hori, compañero de trabajo, compañero de todo, y mi hermano. A mis amigas del instituto, Anto, Nati y Yanni, por acompañarme en los momentos más difíciles y ayudarme a seguir adelante.

A mi familia, en especial a mis viejos, Ade y Diego por estar incondicionalmente conmigo, apoyándome siempre en todo lo que me propongo, y dándome todo el cariño del que son capaces. A mi hermana Sofi por ser la mejor amiga que me pudo dar la vida, que me escucha y me entiende y me hace sentir que merezco todo. A Cami, que me da fuerzas todos los días y me acompaña con amor y ternura, gracias por hacerme tan feliz. Una parte de esto es para devolverles un poquito de todo lo que me dan.

Índice	
Abreviaturas	8
Introducción	10
<i>Flavivirus: epidemiología y vectores</i>	10
Filogenia y origen de ZIKV y DENV	11
Ciclo de transmisión y síntomas	13
Diagnóstico	14
Tratamientos, vacunas y antivirales	15
Partícula viral	17
Estructura del genoma	19
Entrada del virus y ciclo de replicación	21
Proteína de Cápside	25
<i>Estructura y secuencia aminoacídica</i>	25
<i>Traducción, clivaje de cápside y formación de partículas</i>	27
<i>Flexibilidad funcional de cápside</i>	28
<i>Superposición de señales en la región codificante de cápside</i>	28
<i>Distribución subcelular y funciones de cápside en la célula</i>	29
<i>Cápside como blanco para estrategias antivirales</i>	32
Objetivos	33
Resultados	34
Capítulo 1: Desarrollo de herramientas para el estudio de las propiedades bioquímicas y funcionales de la proteína de cápside de ZIKV.	34
Introducción	34
Resultados	35
Desarrollo de herramientas moleculares para la caracterización de la proteína de cápside de ZIKV	35
Estudios bioquímicos de las proteínas de cápside de ZIKV y DENV y su interacción con membranas biológicas	37
Discusión Capítulo 1	43
Capítulo 2: Estudio de la distribución subcelular de la proteína de cápside de ZIKV durante la infección viral.	46
Introducción	46
Resultados	47
Obtención de anticuerpos específicos contra cápside de ZIKV	47
Caracterización de la distribución subcelular de cápside de ZIKV durante la infección	48

Determinantes moleculares de la localización nuclear de la proteína de cápside de ZIKV	52
Discusión Capítulo 2	59
Capítulo 3: Estudio de la dinámica de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas.	63
Introducción	63
Resultados	64
Construcción de herramientas genéticas para estudiar la distribución de la proteína de cápside en células infectadas vivas	64
Estudio de la dinámica de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas	66
Análisis del transporte de la proteína de cápside entre núcleo y citoplasma y la movilidad intracompartimento	71
Discusión Capítulo 3	75
Capítulo 4: Estudio de elementos de ARN en la región codificante de cápside de ZIKV necesarios para la replicación viral.	79
Introducción	79
Resultados	81
Discusión Capítulo 4	94
Conclusiones generales	99
Materiales y métodos	102
Líneas celulares	102
Virus y clones infecciosos	102
Construcción de virus mutantes	102
Construcción de virus recombinantes con proteínas fluorescentes	103
Transcripción <i>in vitro</i>	104
Transfección de ARN viral	105
Ensayos de actividad luciferasa	105
Ensayos de inmunofluorescencia	105
Clonado y expresión de proteínas en bacterias	105
Infecciones, <i>stocks</i> y ensayos de placas de lisis	106
<i>Western Blot</i>	107
Fraccionamiento subcelular	107
Ensayos de RT-PCR y PCR en tiempo real	107
Microscopía de fluorescencia y confocal	108
<i>Softwares</i>	108
Técnicas de RICS y 2D-PCF	108
Liposomas	109

Anexo	110
Referencias	114

Abreviaturas

2D-pCF	función de correlación de pares en dos dimensiones
3'SL	<i>3' stem loop</i>
ADE	amplificación dependiente de anticuerpos
ARNm	ARN mensajero
CHIKV	virus Chikungunya
CPE	efecto citopático
CS	secuencia conservada
DAR	<i>downstream AUG region</i>
DB	<i>dumbbell</i>
DENV	virus del dengue
DF	fiebre causada por dengue
DHF	fiebre hemorrágica causada por dengue
Dpi	días post infección
DSS	síndrome de shock causado por dengue
ERmix	mezcla lipídica similar a la composición del RE
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FMDV	virus de la fiebre aftosa
GUV	vesículas unilamelares gigantes
HCV	virus de la hepatitis C
Hpi	horas post infección
IDR	región intrínsecamente desordenada
IFN	interferón
JEV	virus de la encefalitis japonesa
KUNV	virus de Kunjin
LD	<i>lipid droplets</i>
Ld	líquido desordenado
LLPS	separación de fase líquido-líquido
Lo	líquido ordenado
LUV	vesículas unilamelares grandes
MBFV	Flavivirus transmitidos por mosquitos
MOI	multiplicidad de infección
MVEV	virus de la encefalitis del valle de Murray
NC	nucleocápside
NLS	señal de localización nuclear

NPC	complejo del poro nuclear
NS	no estructural
ORF	marco abierto de lectura
PSF	función de dispersión de punto (<i>point spread function</i>)
qPCR	PCR cuantitativa
RE	retículo endoplasmático
RICS	<i>Raster Image Correlation Spectroscopy</i>
ROI	región de interés (<i>region of interest</i>)
sfARN	ARN subgenómico de flavivirus
siARN	ARN pequeño de interferencia
SL	<i>stem loop</i>
TBEV	virus de encefalitis transmitida por garrapatas
UAR	<i>upstream AUG región</i>
UFP	unidades formadoras de placas de lisis
UTR	región no traducida, <i>untranslated region</i>
VEEV	virus de la Encefalitis Equina de Venezuela
VP	<i>vesicle packets</i>
WNV	virus del Nilo Occidental
YFV	virus de la fiebre amarilla
ZIKV	virus de Zika

Introducción

Flavivirus: epidemiología y vectores

Los Flavivirus componen un género de virus de ARN simple cadena pertenecientes a la familia *Flaviviridae* que ciclan entre vectores artrópodos y huéspedes vertebrados (por lo que también suelen ser llamados arbovirus), y son capaces de causar graves enfermedades en humanos. Los virus del dengue (DENV) y Zika (ZIKV) junto con los virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus Chikungunya (CHIKV) (arbovirus de la familia *Togaviridae*) ponen en riesgo a alrededor de 3.9 mil millones de personas que viven en 120 países de zonas endémicas (Shragai et al. 2017; WHO and TDR 2009). Se estiman alrededor de 390 millones de infecciones de dengue por año en el mundo (Bhatt et al. 2013) y, solamente en el continente americano, desde el año 2000 se han reportado 19.6 millones de casos de dengue, incluyendo 800 mil casos severos y 10 mil muertes (PAHO 2020). Estos patógenos emergentes y re emergentes constituyen un problema de salud pública, y su distribución podría expandirse a zonas geográficas no endémicas debido a diversos factores incluyendo el transporte no intencional de sus vectores (mosquitos de los géneros *Culex* o *Aedes*), la rápida adaptación de estos insectos a nuevos ecosistemas, a factores climáticos y de urbanización, y a la falta de vigilancia epidemiológica (Daep, Muñoz-Jordán, and Eugenin 2014; Gould and Solomon 2008). Se han desarrollado distintas estrategias orientadas al control del vector como por ejemplo el empleo de mosquitos infectados por bacterias endosimbióticas del género *Wolbachia* (Denton et al. 2022; Walker et al. 2011) o el uso de mosquitos transgénicos (Powell 2022), que aún son insuficientes debido a la multiplicidad de factores ecológicos y demográficos que influyen en la epidemiología de estas enfermedades. En un estudio reciente, se determinó que los mosquitos del género *Aedes* poseen la distribución geográfica más amplia, que abarca actualmente todos los continentes, incluyendo a Europa, y América del norte (Kraemer et al. 2015) (Figura 1). Distintos estudios proyectan que, a causa del cambio climático, el aumento de la temperatura media y los cambios en los patrones de precipitación se favorecerá la expansión geográfica de vectores del género *Aedes* y con ello, el riesgo de infecciones (Campbell et al. 2015; Ebi and Nealon 2016; Messina et al. 2015).

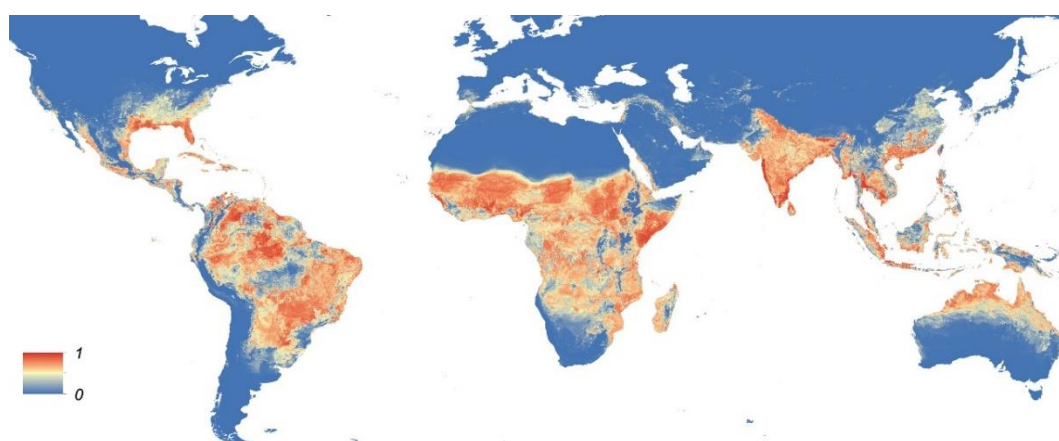


Figura 1. Mapa global de la predicción de la distribución de *Aedes aegypti*. Los colores representan la probabilidad de ocurrencia, siendo 0 en azul y 1 en rojo. La distribución de *Aedes aegypti* ocurre principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, con concentraciones en el norte de Brasil y el sudeste asiático, incluyendo India, pero con poca probabilidad en Europa (únicamente en España y Grecia), y en el sur de América del Norte. Resolución espacial 5 km x 5 km. Extraído de Kraemer et al. 2015.

Filogenia y origen de ZIKV y DENV

La familia *Flaviviridae* es un grupo de virus pertenecientes a la superfamilia 2 de virus de ARN de cadena positiva. Esta familia a su vez actualmente contiene cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* que en su mayoría infectan mamíferos y aves, aunque también infectan garrapatas y mosquitos (Figura 2) (Simmonds et al. 2017). Los miembros de la familia presentan las siguientes características en común: (a) viriones esféricos, envueltos, (b) con genomas de ARN de polaridad positiva no segmentado de entre 9.4 y 13 kb que codifica un único gran marco de lectura y (c) un conjunto de enzimas de replicación codificadas por el virus, como la proteína no estructural 3 (NS3) con actividad de serina proteasa y helicasa, y proteína NS5 con actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (Howley, Knipe, and Whelan 2021). Si bien comparten características de su ciclo de replicación, difieren en gran medida en diversas propiedades biológicas y no presentan reactividad serológica cruzada. El género *Flavivirus* está compuesto por más de 100 especies, de las cuales un gran número son patógenos humanos transmitidos por artrópodos (Howley et al. 2021; Simmonds et al. 2017). Las infecciones por *Flavivirus* pueden ser desde asintomáticas hasta causar fiebre hemorrágica fatal o enfermedades neurológicas.

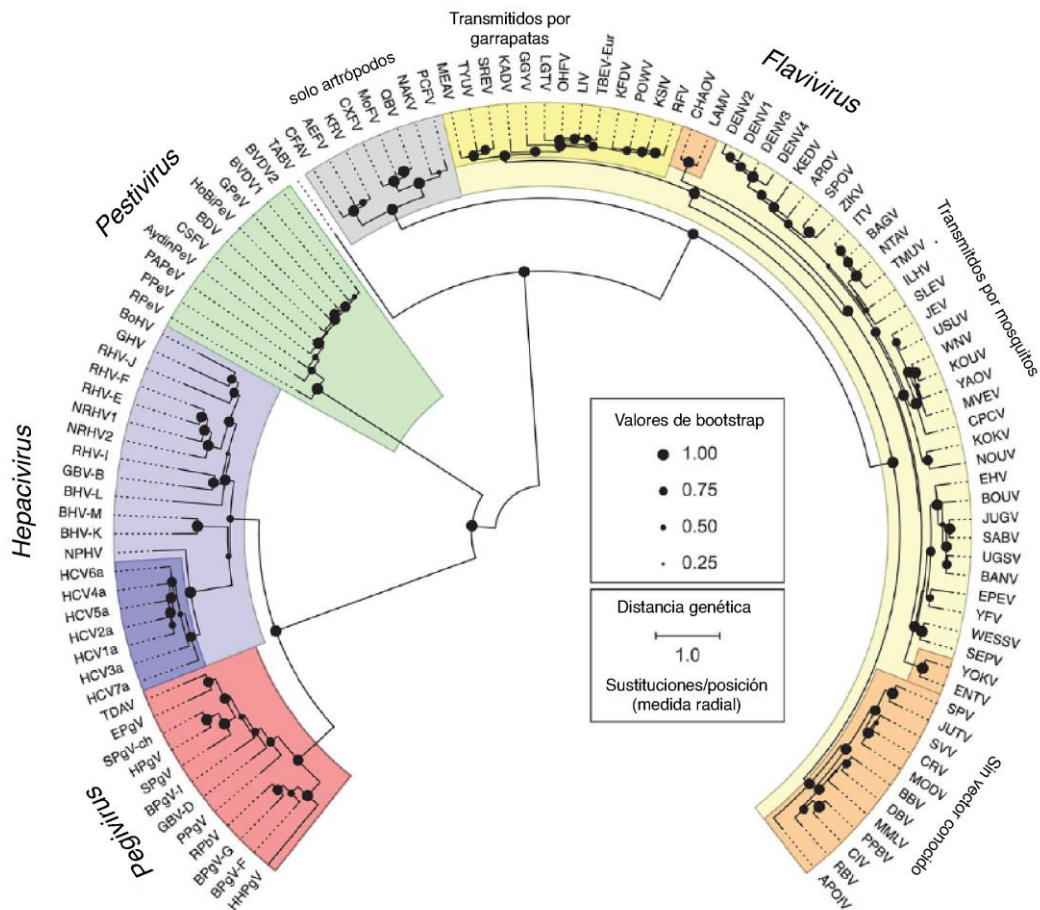


Figura 2. Árbol filogenético de todos los miembros actuales de la familia *Flaviviridae*. El árbol está basado en el análisis por máxima verosimilitud de la región conservada de 352 aminoácidos de la ARN polimerasa viral. Los clados de interés se encuentran como arcos coloreados. La escala corresponde a la distancia genética alrededor del eje radial. Las escalas circulares corresponden a los valores de *bootstrap* para cada nodo ($n=1000$ iteraciones). Modificado de Fields *Virology* 7ma edición (Howley et al. 2021).

Los *Flavivirus* se dividen en cuatro grupos ecológicos en base a sus rangos de hospedador y los vectores responsables de su transmisión: i) *Flavivirus* transmitidos por

garrapatas (o *tick-borne Flaviviruses*, TBFVs), ii) Flavivirus transmitidos por mosquitos (o *mosquito-borne Flaviviruses*, MBFVs), iii) Flavivirus de los cuales no se conoce el vector (o *no known vector Flaviviruses*, NKV) y iv) Flavivirus que solo fueron aislados de insectos (o *insect specific Flaviviruses*, ISFV) (Blitvich and Firth 2015; Gaunt et al. 2001; Rathore and St. John 2020) (Figura 3). Además, en base a sus manifestaciones clínicas, se pueden dividir a su vez en dos grupos epidemiológicos (Gaunt et al. 2001): (i) virus neurotrópicos, causantes de enfermedades neurológicas como encefalitis (como WNV o el virus de la encefalitis japonesa, JEV) asociados a mosquitos del género *Culex* como vector y reservorios en aves y (ii) virus no neurotrópicos, o viscerotrópicos (como DENV o YFV), que pueden causar fiebre hemorrágica, asociados a mosquitos del género *Aedes* como vector y huéspedes mamíferos.

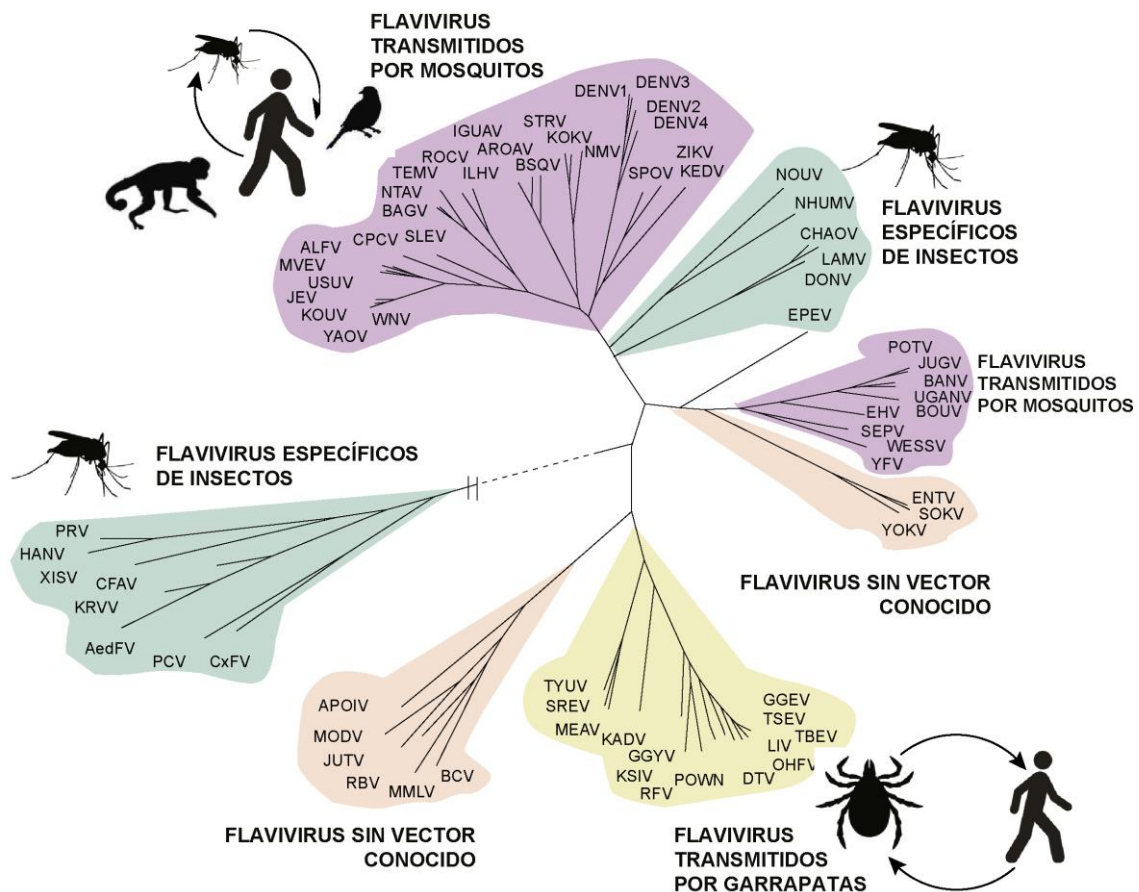


Figura 3. Representación esquemática del árbol de distancias para los cuatro grupos ecológicos de los Flavivirus, generado a partir del alineamiento de secuencias de la polimerasa NS5, utilizando el método de *neighbor joining* y el modelo de sustitución de *jukes-cantor*. Actualizado de Villordo et al. 2016 (Villordo et al. 2016).

Los virus de DENV y ZIKV están estrechamente relacionados por lo cual los presentamos en esta introducción en forma comparada. Ambos virus forman parte del grupo de MBFVs y son transmitidos principalmente por mosquitos del género *Aedes*. En el caso de DENV, existen cuatro serotipos (DENV1-4) que son genéticamente diversos con una identidad de secuencia aminoacídica limitada (alrededor del 60-75%) (Guzman and Harris 2015). Las diferencias genéticas entre serotipos, si bien conservan una reactividad serológica cruzada, les confieren distinta virulencia, fitness y potencial epidemiológico. La evidencia sugiere que el serotipo DENV-4 fue el primero en surgir en primates, en ciclos selváticos en África, y que el salto de especie sucedió luego de forma independiente para los cuatro serotipos (Gould et al. 2003).

Por otro lado, ZIKV fue descubierto en monos en el bosque de Zika en Uganda en 1947, y fue detectado por primera vez en humanos en 1952. Durante varias décadas no fue

considerado una preocupación de salud pública, hasta que a partir de 2007 comenzaron a detectarse brotes fuera de África y Asia, y luego se extendió al continente americano en 2015, generando una epidemia (Shragai et al. 2017). En base a las características geográficas y temporales, es posible dividir al ZIKV en dos linajes genéticos: Africano y Asiático, siendo el último el que contiene el ancestro en común que derivó en las cepas epidémicas detectadas a partir de 2015 (Yun et al. 2016).

Ciclo de transmisión y síntomas

Los ciclos de transmisión de DENV y ZIKV ocurren entre un mosquito vector y un mamífero susceptible. Existen dos ciclos ecológica y evolutivamente diferentes: un ciclo selvático o enzoótico en el cual el virus circula entre mosquitos *Aedes* arbóreos y primates no humanos (que ocurre principalmente en el sudeste asiático y en África occidental), y un ciclo urbano o humano, en el cual los virus circulan entre mosquitos domésticos (*Aedes albopictus* o *Aedes aegypti*) y los humanos (Figura 4) (Weaver et al. 2016). En algún momento, los mosquitos arbóreos pueden llegar a transmitir el virus desde los primates no humanos a los humanos cuando existe proximidad entre ellos, permitiendo el salto al ciclo urbano y la consecuente aparición de brotes de DENV silvestres (Chen and Vasilakis 2011; Diallo et al. 2014).

Existe también, de forma minoritaria, transmisión independiente del vector a través de transfusiones de sangre, trasplantes de médula u órganos y transmisión perinatal (Chen and Wilson 2016). En el caso de ZIKV, diferentes estudios han comprobado que puede transmitirse de una madre infectada a su feto durante el embarazo, ya que se ha detectado ARN viral en el líquido amniótico, orina y suero de las madres, y en cerebro, placenta y suero de los recién nacidos, demostrando el amplio tropismo del virus (Coyne and Lazear 2016; Miner and Diamond 2017). Por otro lado, existe evidencia de que ZIKV también puede transmitirse por vía sexual, y fue posible detectar el virus de forma persistente en semen de pacientes infectados, incluso luego de meses de la resolución de los síntomas (Counotte et al. 2018; Mansuy et al. 2016).

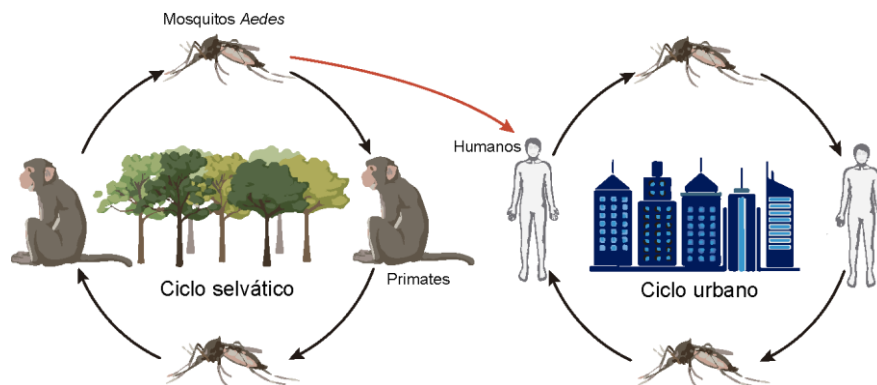


Figura 4. Ciclos ecológicos de transmisión de DENV y ZIKV y otros arbovirus. Un ciclo selvático de transmisión entre primates no humanos y mosquitos arbóreos, y un ciclo urbano entre humanos y mosquitos domésticos. La conjunción entre ciclos corresponde a la zona de emergencia, en donde los ciclos selváticos contactan poblaciones humanas en general en zonas rurales.

La infección por dengue en humanos luego de la inoculación por un mosquito puede causar un espectro de manifestaciones clínicas, desde una infección asintomática, una fiebre autolimitada (DF, del inglés *dengue fever*) o casos severos de fiebre hemorrágica causada por dengue (DHF, del inglés *dengue hemorrhagic fever*) y síndrome de shock por dengue (DSS, del inglés *dengue shock syndrome*). Luego de 2 a 7 días de incubación desde la inoculación, puede causar fiebre alta, artralgia, *rash*, dolor en las articulaciones, dolor retro orbital y fotofobia (Gould and Solomon 2008), y los pacientes suelen recuperarse totalmente dentro de 1 o 2 semanas. Sin embargo, un porcentaje de alrededor del 5% de los casos puede progresar al cuadro de dengue severo que puede

variar entre infecciones primarias o secundarias. Se caracteriza por fiebre, mialgia, vómitos y dolor abdominal agudo. DHF/DSS ocurre como una segunda fase de la enfermedad y se caracteriza por un aumento en la permeabilidad vascular, trombocitopenia y pérdida de plasma de los vasos sanguíneos a los tejidos, lo cual es particularmente riesgoso en niños y puede llevar a la muerte (Daep et al. 2014; Lindenbach and Rice 2007). La administración de fluidos oralmente es suficiente para DF, pero la administración de fluidos de forma intravenosa es esencial para prevenir el shock y la muerte (WHO and TDR 2009). Si bien la infección por un serotipo de DENV confiere inmunidad de por vida contra ese serotipo, los casos de dengue severo suelen ocurrir en mayor proporción en aquellos pacientes que se encuentran transitando una infección secundaria con un serotipo heterotípico. El mecanismo que se ha propuesto por el cual ocurre esto último es la amplificación dependiente de anticuerpos o ADE (del inglés, *antibody dependent enhancement*) y está causado por la presencia de anticuerpos de reacción cruzada contra el nuevo serotipo con capacidad sub neutralizante (Halstead, Chow, and Marchette 1973; Halstead and O'Rourke 1977). Durante la nueva infección, los anticuerpos sub neutralizantes se unen a las partículas virales del serotipo entrante de DENV y forman un complejo de virus-anticuerpo que es internalizado por los receptores Fc γ de las células blanco, lo que resulta en una infección exacerbada (Halstead et al. 2010; Katzelnick et al. 2017). Se desconocen aún los mecanismos que posibilitan el fenómeno de ADE, que constituye un fenómeno indispensable a tener en cuenta en el diseño de vacunas tetravalentes contra los cuatro serotipos de DENV.

Los síntomas de una infección por ZIKV suelen ser relativamente leves, siendo la mayoría de los casos asintomáticos. En los casos sintomáticos, suelen manifestarse *rashes*, dolor de cabeza, fiebre baja, dolor de articulaciones y conjuntivitis. A pesar de que alrededor del 70% de los casos son asintomáticos (Shragai et al. 2017), ZIKV fue declarado una emergencia de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Febrero de 2016. Esto fue debido a un sorpresivo aumento en los casos de microcefalia y anomalías congénitas en cerebro y ojos en niños recién nacidos de madres infectadas, asociado a una transmisión vertical del virus (Rasmussen et al. 2016). Esta condición solo se había descrito previamente relacionada a la infección con el virus de la rubeola y con citomegalovirus. Además, la infección con ZIKV se asoció a complicaciones neurológicas posteriores, como el síndrome de Guillain-Barré, que es una enfermedad autoinmune en la cual el sistema inmune ataca al sistema nervioso periférico causando hormigueos, debilidad muscular, parálisis o incluso la muerte (Goodfellow and Willison 2016). Este síndrome también fue asociado a la infección por otros arbovirus, como DENV y CHIKV, pero los mecanismos por los cuales estos virus desencadenan este síndrome son aún desconocidos.

Diagnóstico

El diagnóstico de DENV y ZIKV basado en síntomas clínicos es posible durante un brote, pero dado el gran espectro de síntomas no específicos de enfermedades febriles, la detección de marcadores de infección es de gran utilidad para su confirmación y la consecuente vigilancia epidemiológica de cada enfermedad. El diagnóstico puede basarse en la detección del agente infeccioso de forma directa (virus, genoma o antígenos) o de la respuesta inmune desencadenada (anticuerpos).

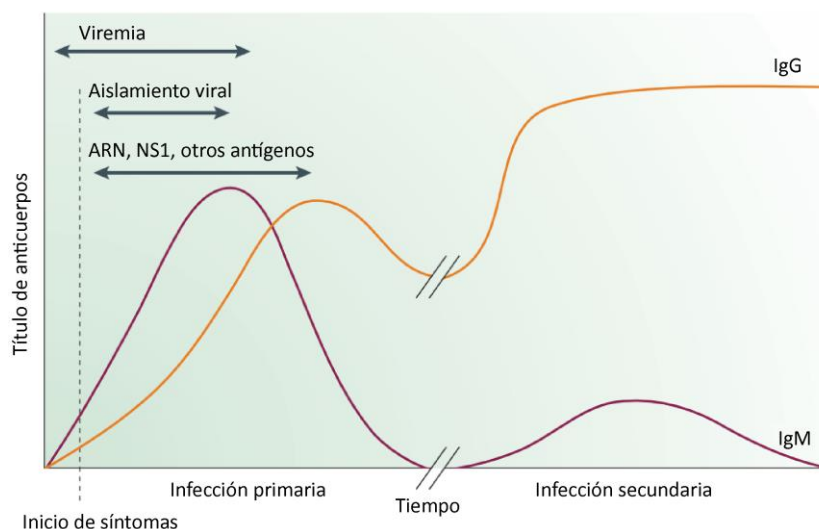


Figura 5. Marcadores de diagnóstico de infecciones por arbovirus. Se grafica el título de anticuerpos en función del tiempo, en donde se observa, durante una infección primaria, un aumento del título de anticuerpos IgM inmediatamente después de la manifestación sintomática, seguido de un aumento de anticuerpos de tipo IgG. Se señalan con flechas el período de viremia y las ventanas temporales en las cuales es posible detectar la carga viral por aislamiento del virus o detección de ARN o antígenos. Una infección secundaria se caracteriza por un rápido aumento de los anticuerpos IgG. Modificado de Peeling et al. 2010.

Durante la fase aguda de la enfermedad, en un tiempo menor a 5 días luego del inicio de síntomas, es posible detectar el genoma viral por RT-PCR a partir de muestras de suero, aunque también es posible detectarlo en plasma, orina y tejidos. Otros métodos de detección directa pueden ser el aislamiento viral o la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) por ensayos de ELISA (Figura 5). Dicha proteína se secreta fuera de la célula y se puede detectar en suero o plasma. Los métodos indirectos o serológicos se utilizan una vez que ha disminuido la viremia, que en general es de corta duración. La detección de anticuerpos puede realizarse a partir del quinto día del comienzo de síntomas, y puede durar meses (IgM) o incluso años (IgG) (Peeling et al. 2010). Debe tenerse en cuenta que existe reactividad antigénica cruzada entre distintos Flavivirus que puede dificultar la interpretación de estos resultados, en especial cuando circulan en la misma zona geográfica distintos virus, como es el caso del DENV, ZIKV, y YFV (OPS 2016).

Tratamientos, vacunas y antivirales

En la actualidad no existen tratamientos específicos para las enfermedades causadas por DENV, ZIKV u otros Flavivirus y no se dispone de drogas aprobadas como agentes terapéuticos contra ellas. Si bien existen lineamientos establecidos para el tratamiento a nivel clínico de las enfermedades causadas por estos virus (OPS 2016; WHO and TDR 2009), no hay herramientas para su control específico. En la actualidad tanto en el ámbito académico como en el privado en distintos lugares del mundo se observan esfuerzos por encontrar herramientas preventivas como vacunas, o drogas antivirales para la resolución de los síntomas una vez establecidos.

El desarrollo de una vacuna contra DENV ha demostrado ser una tarea desafiante debido a la existencia de sus cuatro serotipos y las complicaciones asociadas a su respuesta inmune. Es por esto que es necesario desarrollar una vacuna tetravalente capaz de inducir una respuesta balanceada contra los cuatro serotipos. En el momento existen tres vacunas a virus vivos atenuados que se encuentran avanzadas en su desarrollo contra el virus de dengue. La primera vacuna en ser licenciada en 2016 en

países endémicos fue Dengvaxia (CYD-TDV, Sanofi Pasteur) (Figura 6A), que es una vacuna quimérica que utiliza el esqueleto de la vacuna de fiebre amarilla YFV-17D e incorpora las proteínas estructurales prM y E de cada serotipo de DENV (Guirakhoo et al. 2001). La utilización de esta vacuna está limitada para personas mayores de 9 años y que ya son seropositivas para DENV, dado que existe un riesgo de desarrollar dengue severo en pacientes seronegativos (Halstead 2017; Sridhar et al. 2018). Por este motivo es necesario disponer de una vacuna que sea efectiva para los cuatro serotipos. Las otras dos vacunas que se encuentran en fase III de los ensayos clínicos también son quiméricas, vivas y atenuadas.

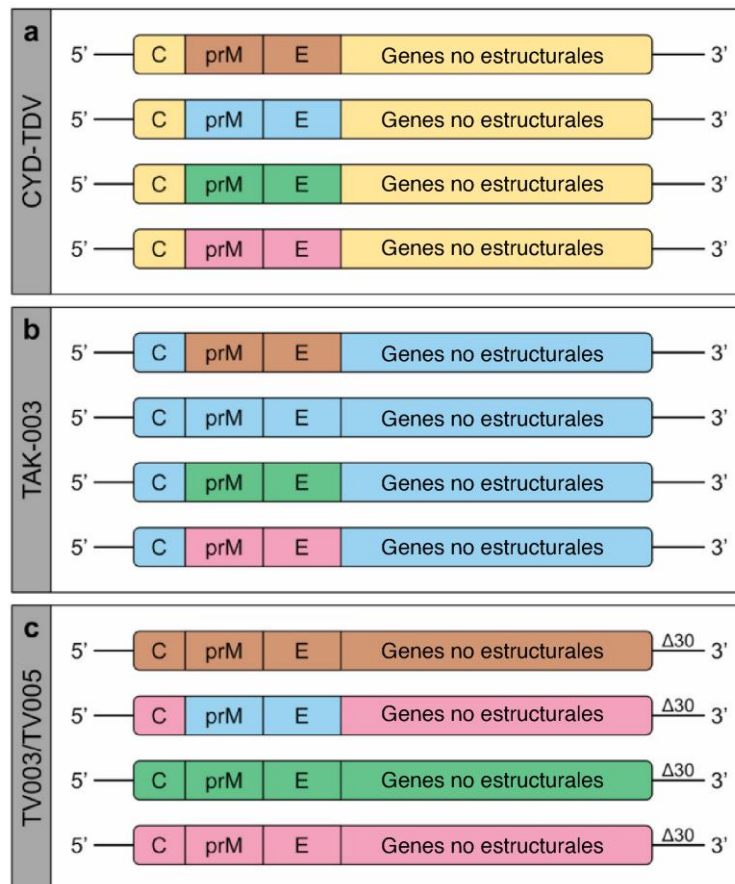


Figura 6. Vacunas vivas atenuadas tetravalentes para DENV. Se representa el genoma completo de la vacuna correspondiente a cada serotipo. A: Dengvaxia (CYD-TDV, Sanofi Pasteur) que utiliza el esqueleto de la vacuna de YFV (en amarillo) e incorpora proteínas estructurales de DENV. B: DENVax (Takeda) que utiliza el esqueleto de un virus atenuado de DENV2 (en azul) e incorpora proteínas estructurales de DENV1, 3 y 4. C: TV003/TV005 (NIH) que es una vacuna atenuada por la delección de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) en la región 3'UTR del genoma viral. Esta vacuna contiene DENV 1, 3 y 4 completos, mientras que el componente de DENV2 es una quimera en la cual las proteínas estructurales prM y E de DENV4 fueron reemplazadas por las de DENV2. Modificado de Wilken y Rimmelzwaan 2020.

Por un lado, la vacuna DENVax (Takeda) (Figura 6B) consiste en la cepa atenuada PDK-53 de DENV2 y tres virus quiméricos con las proteínas estructurales prM y E de DENV 1, 3 y 4 en el contexto de PDK-53 (Butrapet et al. 2000; Huang et al. 2003). Si bien los ensayos de fase I y II demostraron un gran porcentaje de seroconversión, las pruebas de fase III muestran una eficacia variada de acuerdo al serotipo, siendo menor la despertada contra DENV4 (Biswal et al. 2019). Por último, la vacuna TV003/TV005 (NIH) (Figura 6C) es una vacuna atenuada por la delección de 30 nucleótidos en la región 3'UTR del genoma viral (Durbin et al. 2001). Los componentes de DENV 1, 3 y 4 son

virus completos, mientras que el componente de DENV2 es una quimera en la cual las proteínas estructurales prM y E de DENV4 fueron reemplazadas por las de DENV2 (Blaney et al. 2006). Los ensayos de fase I y II arrojaron importantes porcentajes de seroconversión y los primeros resultados de fase III muestran que los vacunados están protegidos contra la infección por DENV2 que se empleó como desafío (Durbin et al. 2011; Whitehead et al. 2017).

Se han estudiado distintas estrategias para una vacuna contra ZIKV, que se encuentran en fases pre clínicas o clínicas. Si bien solo se ha identificado un serotipo para el virus de ZIKV, algunos estudios han sugerido que los anticuerpos contra ZIKV podrían generar reactividad cruzada contra DENV, lo que podría desarrollar ADE (Wen and Shresta 2019). Considerando que ambos virus son transmitidos por el mismo vector y circulan en las mismas regiones, es necesario elaborar estrategias que tengan en cuenta estos riesgos. Se han desarrollado plataformas de vacunas inactivadas, a vector viral y vacunas de ADN con resultados de seroconversión variados, pero hasta el momento ninguna ha sido licenciada (Vuitika et al. 2022; Yeasmin et al. 2022). Dado que en el momento no existen brotes de ZIKV en el mundo, algunos de los ensayos de fase II-III se encuentran suspendidos.

El desarrollo de drogas antivirales constituye un enfoque diferente para el manejo de los brotes de Flavivirus, debido a la dificultad en el desarrollo de vacunas efectivas y seguras. Los principales blancos de estas estrategias corresponden a las proteínas virales con actividad enzimática, la ARN polimerasa y metiltransferasa NS5, la helicasa NS3 y la proteasa NS2B-NS3. Existen inhibidores nucleosídicos y alostéricos para NS5 que fueron desarrollados inicialmente para el tratamiento de Hepatitis C (HCV, perteneciente al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*) que han probado tener actividad anti DENV (Y. L. Chen, Yokokawa, and Shi 2015). La búsqueda de inhibidores de la proteasa viral ha probado ser compleja debido a las características del bolsillo del sitio activo (Majerová et al. 2019), sin embargo, algunos compuestos existentes aprobados son capaces de inhibir la replicación de ZIKV *in vitro* (Li et al. 2017). Las proteínas estructurales también pueden ser utilizadas como blanco de estrategias antivirales, por ejemplo, moléculas que interfieren con la proteína de envoltura viral son capaces de bloquear la fusión de membranas y la infección (Schmidt et al. 2012). Por otro lado, la proteína de cápside constituye un posible blanco para antivirales debido a la baja probabilidad de desarrollo de resistencia a compuestos. Esto se debe a que la proteína de cápside es multifuncional y participa en numerosos procesos durante la infección viral, en los que debe oligomerizar (Klumpp and Crépin 2014; Mateo, Nagamine, and Kirkegaard 2015). Se han hallado compuestos como ST-148 capaces de inhibir los efectos de la infección por los cuatro serotipos de DENV, cuyo mecanismo consiste en estabilizar la proteína de cápside alterando los procesos de ensamblado y desnudamiento viral (Byrd et al. 2013; Scaturro et al. 2014). Por otro lado, un péptido mimético diseñado para inhibir la unión de cápside a los *lipid droplets* celulares se propuso como candidato para su desarrollo como droga antiviral (Martins et al. 2012). Sin embargo, no hay estudios clínicos avanzados para ninguna de las drogas mencionadas.

Partícula viral

Los Flavivirus son virus envueltos con un genoma de ARN de simple cadena y polaridad positiva. El ARN viral tiene un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína y esta flanqueado por las regiones 5' y 3' no codificantes que son altamente estructuradas. El genoma viral tiene múltiples funciones durante el ciclo de replicación del virus. Inicialmente actúa como ARN mensajero para la síntesis de proteínas virales,

luego se utiliza como molde para su propia amplificación y finalmente debe interactuar con la proteína de cápside durante la morfogénesis de nuevas partículas virales. El genoma codifica para al menos diez proteínas virales, de las cuales tres son proteínas estructurales que forman parte de la partícula (cápside, prM/M, y E) y siete proteínas son no estructurales, con distintas funciones en el ciclo de replicación (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) (Figura 9) (Knipe Howley, P. 1990).

La partícula viral madura de los Flavivirus está compuesta por un *core* formado por la nucleocápside, que es un complejo de múltiples copias de la proteína de cápside y una copia del genoma viral. La partícula se rodea de una membrana lipídica proveniente del hospedador, y una envoltura proteica altamente organizada compuesta por 180 copias de las proteínas E y M. La proteína E es una proteína de 53kDa que contiene un dominio transmembrana y tres ectodominios (ectodominios I, II y III) que funciona en el ensamblado, brotación, adsorción y fusión del virus a las células blanco (Mukhopadhyay, Kuhn, and Rossmann 2005; Sirohi and Kuhn 2017). Además, la proteína E es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes contra el virus. La proteína precursora de membrana prM es una proteína de 20kDa que forma heterodímeros con E y facilita su plegamiento y ensamblado del virus.

La partícula posee alrededor de 50nm de diámetro y las estructuras de DENV, WNV y ZIKV han sido resueltas con alta resolución por cryo-EM (Kuhn et al. 2002; Mukhopadhyay et al. 2003; Sirohi et al. 2016; Zhang et al. 2012). La partícula inmadura, en un pH neutro, es de un tamaño mayor y posee una superficie con picos generada por la disposición de los complejos formados por prM y E (Figura 7). Durante el transporte de la partícula por el *trans* Golgi, un cambio de pH a ligeramente ácido gatilla una reorganización de los complejos proteicos, dando como resultado una partícula madura de superficie lisa y de simetría icosaédrica (Kuhn et al. 2002; Prasad et al. 2017). La maduración del virus está regulada por el clivaje proteolítico de la proteína prM por la proteasa furina, que resulta en la liberación de la proteína pr y la permanencia del péptido M asociado a la membrana viral (Figura 7). Estudios realizados con el virus Kunjin (KUNV) demostraron que en la partícula inmadura la simetría icosaédrica es imperfecta debido al posicionamiento asimétrico del core nucleoproteico con respecto a la cubierta proteica (Therkelsen et al. 2018).

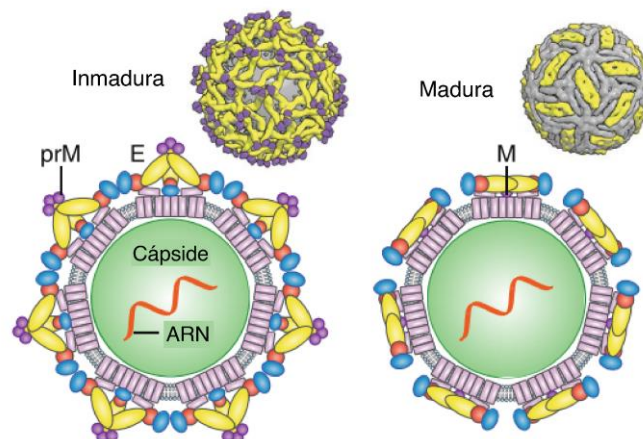


Figura 7. Maduración de la partícula viral de Flavivirus. Se observa la distinta disposición espacial de la proteína E en la partícula inmadura (izquierda) y madura (derecha). Los cambios conformacionales en la superficie viral son gatillados por un pH ácido y el clivaje de prM, lo que genera una partícula de superficie lisa y madura. Modificado de Pierson y Diamond 2020.

Durante la maduración del virus, el *core* se repositona de forma concéntrica. En trabajos recientes utilizando anticuerpos que estabilizan los estadios inmaduros del

virus, se han logrado resolver con alta resolución las proteínas de cápside dentro de la partícula viral (Tan, Fibriansah, Kostyuchenko, et al. 2020). Estos estudios revelaron que existe una pequeña proporción de proteína de cápside que conserva una hélice extra ($\alpha 5$), que corresponde a una porción transmembrana que se creía que era clivada durante la replicación del virus, pero se propone que es retenida en un porcentaje limitado de moléculas de la proteína. Dicha hélice permite la adopción de una estructura cuaternaria que le da la capacidad a cápside de actuar como un mediador, al interactuar tanto con el core de ARN como con las regiones transmembrana de prM y E, lo que aseguraría el correcto empaquetamiento de cada partícula con el genoma viral (Tan, Fibriansah, and Lok 2020) (Figura 8). En base a estos resultados, la proteína de cápside sería un componente central en el proceso de formación de partículas virales.

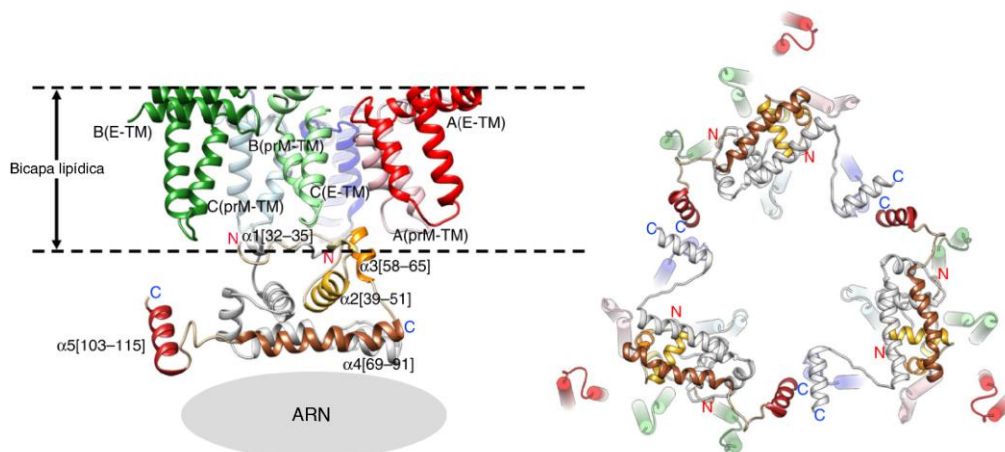


Figura 8. Esquema de la disposición de las proteínas estructurales en la partícula viral. A la izquierda se muestra una vista de costado mostrando la orientación de la proteína de cápside con respecto a bicapa lipídica y el ARN viral. Las hélices $\alpha 1$ del dímero forman una superficie hidrofóbica que interactúa con la membrana lipídica viral, y las hélices $\alpha 4$ con alta densidad de cargas positivas interactúan con el ARN viral. A la derecha hay una vista del interior del virus en la cual tres dímeros de cápside interactúan entre sí mediante la hélice $\alpha 5$ formando una red triangular. TM=transmembrana. Modificado de Tan et al. 2020.

Estructura del genoma

El genoma de DENV y ZIKV es de ARN simple cadena de alrededor de 11kb de largo, de polaridad positiva que contiene un CAP tipo 1 en su extremo 5' (m7GpppAmpN2) y carece de cola de polyA en su extremo 3' (Lindenbach and Rice 2007). La estructura de CAP estabiliza la molécula de ARN, permite la iniciación de la traducción y también interfiere en la respuesta inmune innata (Daffis et al. 2010). El ARN viral es infeccioso, y codifica para un único marco de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*) que se encuentra flanqueado por regiones 5' y 3' no codificantes (o *untranslated regions* en inglés, 5'-3' UTRs) de aproximadamente 100 y 450 pb de largo respectivamente (Figura 9).



Figura 9. Genoma de ZIKV. Se representan las estructuras de ARN presentes en los extremos 5' y 3' UTR. Los rectángulos representan a las proteínas codificadas en el único ORF. Las proteínas estructurales se encuentran en naranja y las no estructurales en gris.

En la infección, el genoma viral funciona como ARN mensajero (ARNm) para la traducción y a su vez, funciona como molde para la síntesis de nuevas copias de ARN. Estos dos procesos requieren una regulación fina que está mediada en parte por los elementos de ARN presentes en las regiones codificantes y no codificantes del genoma. En la región 5'UTR se encuentra una estructura con forma de Y muy conservada en Flavivirus llamada *stem loop A* (SLA) que funciona como promotor para la síntesis de ARN viral por la polimerasa viral NS5 (Filomatori et al. 2006). Rio abajo, dentro del 5' UTR y en la región codificante, existen distintos elementos estructurales y de secuencia, particulares de cada virus, que son necesarios para la replicación. En el 3' UTR existen estructuras regulatorias llamadas *dumbbells* (DB) que pueden encontrarse repetidas, y se encuentran en todos los MBFVs (de Borba et al. 2019). Además, en el extremo 3' del genoma existe una estructura llamada 3' *stem loop* (3'SL) que también se encuentra conservada y tiene funciones específicas del hospedador (Gebhard, Filomatori, and Gamarnik 2011).

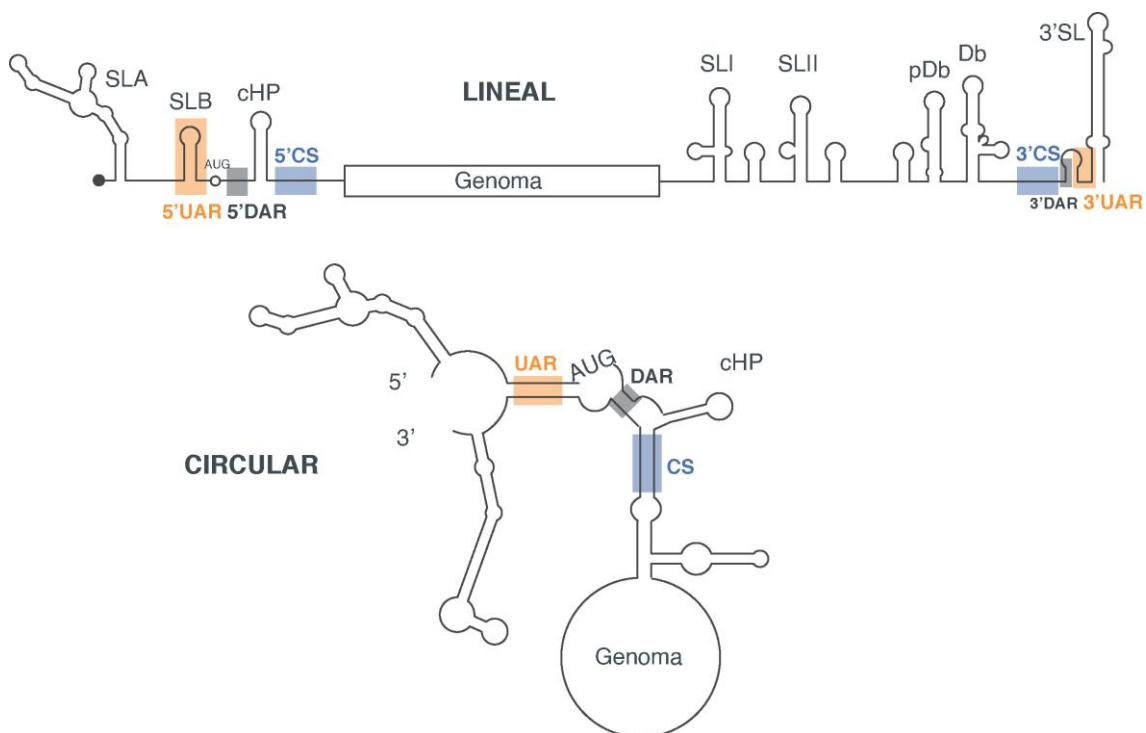


Figura 10. Genoma de ZIKV en conformación lineal y circular. Se indican las estructuras secundarias de ARN en los extremos 5'UTR, 3'UTR y en la región codificante de cápside, la primera proteína codificada en el ORF. En la conformación lineal se representan estructuras secundarias locales. En la conformación circular algunas estructuras locales se desorganizan para interactuar con regiones a larga distancia en el genoma. Las interacciones a larga distancia conservadas se encuentran sombreadas en naranja (UAR), gris (DAR) y celeste (CS). En ambos casos se indica la posición del codón de inicio de la traducción (AUG).

Por otro lado, además de las estructuras secundarias de ARN, los genomas de Flavivirus contienen secuencias invertidas en los extremos de la molécula de ARN viral que median interacciones a larga distancia. Estas interacciones son las responsables de la circularización del genoma, que es un proceso fundamental para la interacción entre NS5 y su promotor SLA, con el sitio del inicio de la replicación en el extremo 3' (Alvarez, Lodeiro, et al. 2005; Filomatori et al. 2006). En los MBFV, las interacciones están mediadas por una región rio arriba del codón de inicio de la traducción (5'UAR, del inglés *upstream AUG region*), otra rio abajo del codón de inicio (5'DAR, del inglés *downstream AUG region*) y una secuencia conservada o 5'CS (del inglés, *conserved sequence*) que se encuentra en el principio de la región codificante de cápside, que se

aparean con sus contrapartes complementarias presentes dentro del 3' UTR (3'UAR, 3'DAR y 3'CS) (Figura 10) (Alvarez, De Lella Ezcurra, et al. 2005; Alvarez, Filomatori, and Gamarnik 2008; de Borba et al. 2015; Friebe and Harris 2010; Khromykh et al. 2001; Villordo and Gamarnik 2009; Ziv et al. 2018). Numerosos estudios en distintos Flavivirus han demostrado que el establecimiento de estas interacciones implica el desensamblado parcial o total de algunas estructuras secundarias de ARN, lo que sugiere que existe una superposición de funciones. Es posible que la coexistencia de distintas conformaciones del genoma, mediante un balance dinámico entre estructuras lineales y circulares sea una forma de regulación de la replicación viral (Villordo, Alvarez, and Gamarnik 2010).

Entrada del virus y ciclo de replicación

La entrada de los Flavivirus a la célula es dependiente de la proteína E, y comienza con la adsorción de la partícula viral a la célula de forma no específica. Dado que estos virus son capaces de unirse a una gran variedad de tipos celulares, se cree que reconocen moléculas de superficie muy ubicuas, o que son capaces de utilizar múltiples receptores para su entrada. Diversos estudios han descrito factores de unión de células de mamífero, entre ellos el heparán sulfato, un polisacárido cargado negativamente presente en la superficie de células de numerosos tejidos animales, que podría funcionar como un factor de unión de baja afinidad (Chen et al. 1997). Las lectinas celulares de tipo C como DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) expresadas en células dendríticas y macrófagos pueden aumentar la eficiencia de unión de los virus a estas células mediante la interacción con azúcares que se encuentran unidos a las proteínas E y M del virión (Figura 11) (Davis et al. 2006; Navarro-Sanchez et al. 2003; Tassaneeritthep et al. 2003). Miembros de la familia TIM y TAM de receptores de tipo fosfatidilserina también podrían funcionar como factores de unión y de señalización, mediante la unión a lípidos presentes en la envoltura viral (Meertens et al. 2012). A pesar de que se han identificado numerosos factores que aumentan la eficiencia de unión e infección de Flavivirus a células, aún no está clara la relación entre la expresión de estos factores y el tropismo viral *in vivo*.

Una vez unidos a las células, la internalización de los viriones ocurre por endocitosis mediada por clatrina, tanto en células de mosquito como de mamífero (Acosta, Castilla, and Damonte 2008, 2009) (Figura 11). Estos estudios también describieron que DENV, dependiendo del serotipo y de la célula blanco, puede utilizar caminos alternativos de entrada independientes de clatrina, caveolas y *lipid rafts*. En el caso de DENV2 se determinó que las partículas virales, una vez unidas, migran a través de la superficie celular hasta encontrar una fosa recubierta de clatrina ya formada (Van Der Schaar et al. 2008). Posteriormente, la fosa recubierta de clatrina progresa y se internaliza de forma dependiente de proteínas como RNASEK y LY6E (Hackett et al. 2015; Hackett and Cherry 2018) y la invaginación de la membrana se cierra por la escisión mediada por dinamina, dando como resultado una vesícula endocítica recubierta de clatrina (Smit et al. 2011). La vesícula que contiene el virus se transporta a endosomas tempranos y luego a endosomas tardíos gracias a caminos dependientes de las proteínas Rab-5 y Rab-7 respectivamente, que son GTPasas regulatorias del tráfico vesicular (Acosta, Castilla, and Damonte 2012). El ambiente ácido de los endosomas es lo que gatilla la trimerización irreversible de la proteína de envoltura y la fusión de membranas, con la consiguiente liberación de la nucleocápsida al citoplasma (Smit et al. 2011; Stiasny et al. 2011).

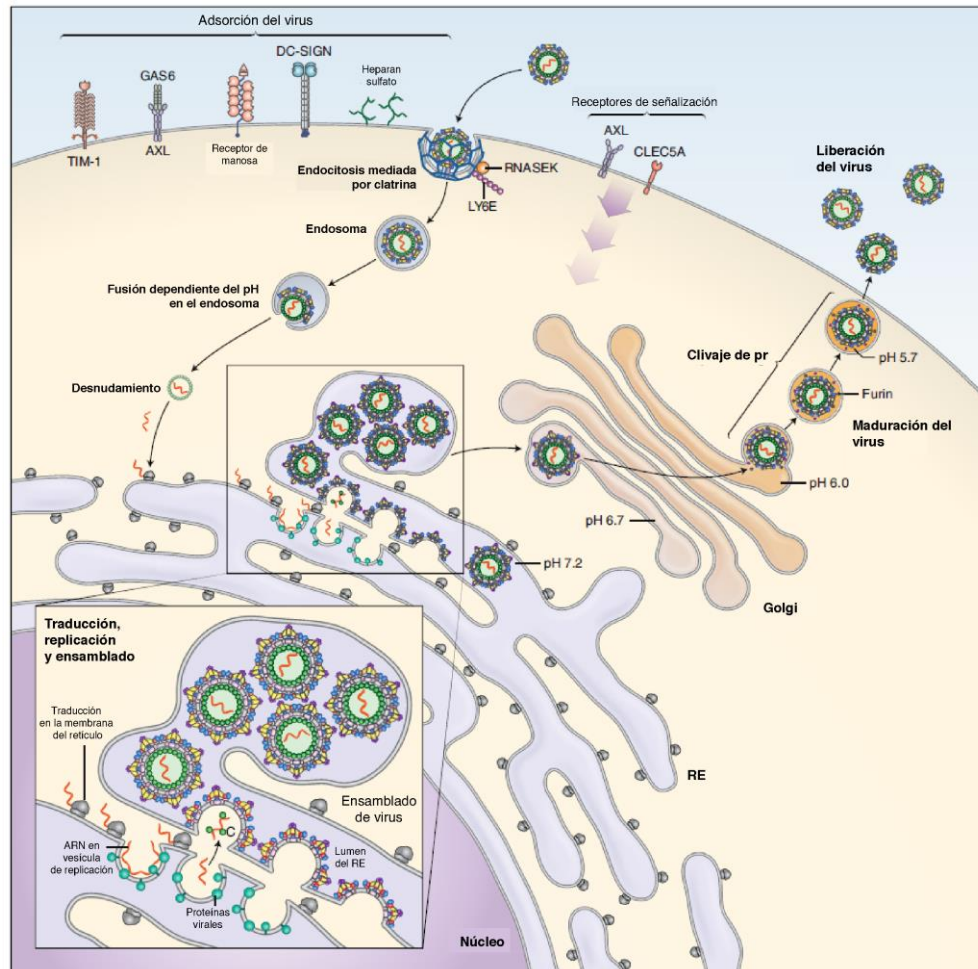


Figura 11. Ciclo de replicación de Flavivirus. Los Flavivirus se adhieren a las células de mamífero a través de interacciones con distintos factores de unión, incluidas moléculas que se unen a la membrana viral o carbohidratos asociados al virión. Las interacciones con factores de la superficie de la célula hospedadora pueden iniciar cascadas de señalización que modulan la respuesta inmune del huésped. Las partículas virales son internalizadas por mecanismos dependientes de la clatrina que usurpan los factores del huésped involucrados en la captación de grandes macromoléculas, incluida la RNASEK. La fusión de la membrana del virus con las membranas del huésped ocurre en el endosoma de una manera dependiente de bajo pH. La replicación del ARN viral ocurre en membranas del huésped reorganizadas por la acción de proteínas no estructurales. Estas estructuras de membrana inducidas por la infección coordinan espacialmente la replicación del ARN genómico viral y la morfogénesis del virión, y protegen los productos de replicación de los sensores de la respuesta inmune innata de la célula. Las partículas virales se ensamblan y brotan en el RE y salen de la célula. La maduración del virión, producida por la escisión de prM por una proteasa similar a la furina, se produce durante la salida. Modificado de Pierson y Diamond 2020.

El desnudamiento del genoma viral es un proceso muy poco estudiado. Estudios de nuestro laboratorio han determinado que ocurre por medio de un proceso dependiente de la ubiquitinación celular e independiente de la actividad del proteosoma (Byk et al. 2016). La inhibición de la actividad de la enzima activadora de ubiquitina E1 bloquea el desnudamiento del genoma, impidiendo su liberación (Figura 12). Sin embargo, el desnudamiento y la traducción ocurre en forma independiente de la degradación de la proteína de cápside.

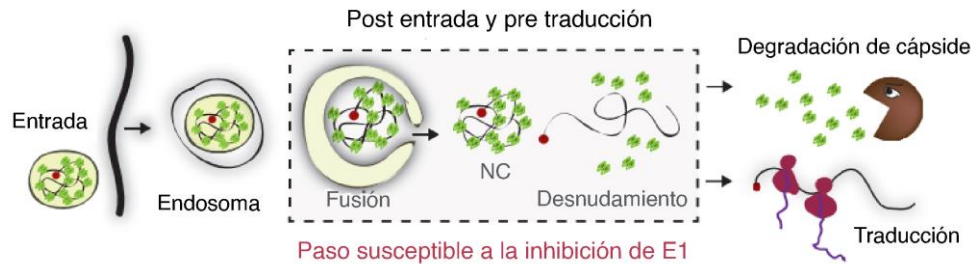


Figura 12. La liberación del genoma viral es dependiente de la ubiquitinación celular. Se representa un posible mecanismo de entrada del virus de DENV a la célula y el desnudamiento del genoma. En el recuadro punteado se representan los pasos susceptibles a ser inhibidos por el bloqueo de la enzima E1. Luego del desnudamiento, el genoma es susceptible de ser degradado, o puede ser traducido. Modificado de Byk et al. 2016.

Una vez liberado al citoplasma, el genoma de ARN tendrá una doble función: primero como ARNm para la traducción de las proteínas virales de forma dependiente de CAP, y en un segundo paso como templado de la replicación. La traducción del único ORF que contiene el mensajero ocurre asociada al retículo endoplasmático (RE) y da como resultado una poliproteína que adopta una disposición topológica particular en la membrana del RE (Figura 13) (Lindenbach and Rice 2007; Mackenzie 2005; Miller et al. 2007; Miller, Sparacio, and Bartenschlager 2006; Xie et al. 2013). La región N-terminal de la poliproteína codifica para las proteínas estructurales cápside, prM/M, y E, que son seguidas por las no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5. Estas proteínas deben ser clivadas y liberadas co y post traduccionalmente por la acción de proteasas virales y celulares. La peptidasa de señal de la célula hospedadora cataliza el clivaje del lado del lumen del RE entre las proteínas cápside/prM, prM/E, E/NS1, y 2K-NS4B (Figura 13). La serín proteasa viral NS2B-NS3 realiza el clivaje del lado citoplasmático entre cápside/prM, NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y NS4B/NS5 (Cahour, Falgout, and Lai 1992; Falgout et al. 1991). La enzima responsable por el clivaje entre NS1 y NS2A es una proteasa residente del retículo que, si bien se conoce la secuencia específica de reconocimiento en el extremo C terminal de NS1 (Addis et al. 2015; Falgout and Markoff 1995) aún no ha sido identificada.

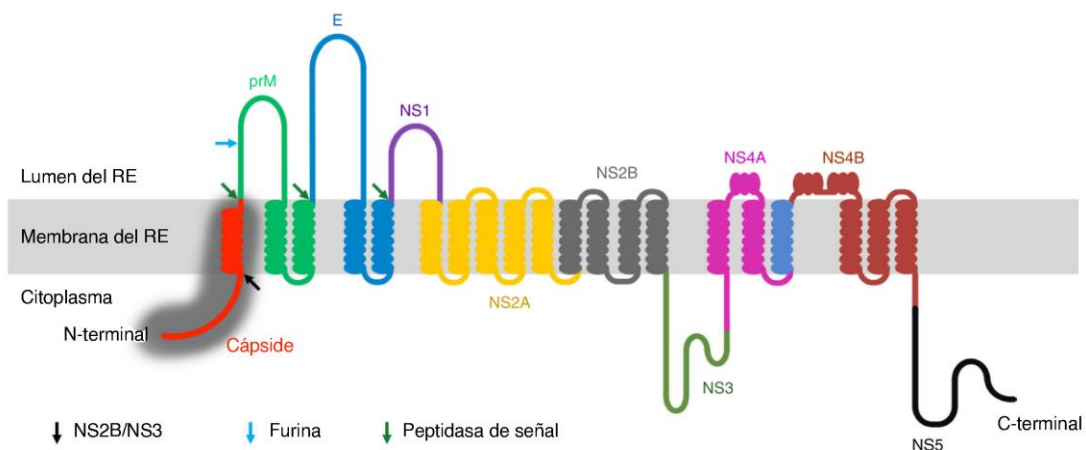


Figura 13. Disposición topológica en el RE de la poliproteína viral. Se representan con distintos colores las proteínas virales y su disposición hacia el lumen del RE o hacia el citoplasma. Se indican con flechas los sitios de cortes de proteasas virales y celulares. Modificado de Tan et al. 2020.

La mayoría de las proteínas no estructurales son multifuncionales: ejercen desde actividades enzimáticas fundamentales en el ciclo de replicación hasta funciones en la

remodelación de la célula para la generación de nuevas partículas y la evasión de la respuesta inmune innata del hospedador. En particular, las proteínas NS3 y NS5 poseen actividades ampliamente estudiadas. La proteína NS3 es una helicasa de ARN con actividades de ATPasa, RTPasa y *annealing* de ARN (Cui et al. 1998; Gebhard, Kaufman, and Gamarnik 2012; Yon et al. 2005) y una serín proteasa que actúa junto con NS2B en el procesamiento de la poliproteína (Falgout et al. 1991), aunque también se han descubierto funciones relacionadas a la producción de partículas virales (Gebhard et al. 2016). La proteína NS5 es una proteína con dos dominios estructurales y funcionales (El Sahili et al. 2019; Zhao et al. 2017): un dominio polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) que es el encargado de copiar el genoma viral (Koonin 1991; You and Padmanabhan 1999) y un dominio metiltransferasa (MTasa) que cataliza la metilación del CAP presente en el extremo 5' del genoma (Egloff et al. 2002). A la proteína NS2A se le han asignado funciones en el ensamblado de partículas, y un estudio reciente la ubica como un participante central, encargada de reclutar el ARN viral, las proteínas estructurales prM y E, y la proteasa NS2B/NS3 a los sitios de ensamblado (Leung et al. 2008; Zhang et al. 2019). Por otro lado, se ha determinado que la proteína NS2B, además de funcionar como cofactor de NS3, posee también funciones en el ensamblado de partículas (Li et al. 2016). La proteína NS1 se localiza en el lumen del RE y puede ser secretada al medio extracelular y se cree que podría estar involucrada en la patogénesis (J. Chen, Ng, and Chu 2015; Glasner et al. 2018). Múltiples estudios la han asociado como cofactor de otras proteínas virales, y recientemente se describió su rol como remodeladora del RE durante la replicación (Ci et al. 2020), junto con la proteína NS4A (Aktepe and Mackenzie 2018). Las funciones de la proteína NS4B no han sido muy estudiadas, pero se la asocia con roles en los cambios morfológicos de la célula en la replicación y como modulador de la actividad de NS3 (Umareddy et al. 2006).

En un momento determinado, los productos de la traducción viral estimularían la transición del uso del genoma viral como un sustrato para la traducción a su uso como templado para la replicación del genoma. La replicación ocurre en estructuras membranosas inducidas por el virus que pueden ser de diversas morfologías, como las “*convoluted membranes*” (CM), donde se propone que ocurre la traducción y procesamiento de la poliproteína, y los “*vesicle packets*” (VP) que representa el sitio de replicación de ARN, lo que constituye los llamados complejos de replicación (Figura 11) (Mackenzie 2005; Welsch et al. 2009). Estas estructuras, formadas por invaginaciones de la membrana del RE se formarían por la acción de componentes virales como NS4A y NS1 y componentes celulares como colesterol, enzimas productoras de ácidos grasos, y otras proteínas que inducen la adopción de la curvatura a las membranas (Aktepe and Mackenzie 2018; Ci et al. 2020).

Las proteínas no estructurales reclutan al genoma a los complejos de replicación, donde comienza la síntesis de una cadena negativa de ARN, que servirá como molde para la síntesis de nuevos genomas de cadena positiva. La reacción está catalizada por la polimerasa NS5 y la helicasa NS3, junto con otras proteínas virales y del hospedador. El inicio de la síntesis ocurre por un reconocimiento específico de NS5 al promotor SLA que es una estructura de ARN presente en el extremo 5' del genoma viral (Filomatori et al. 2006). El pegado de NS5 al SLA es seguido de la circularización del genoma para la relocalización de NS5 en el sitio de inicio de síntesis en el extremo 3' del ARN (Filomatori et al. 2006). La síntesis del ARN viral es asimétrica, ya que se detectan 10 veces más hebras positivas que negativas. Durante la replicación, existen tres especies de ARN viral: el genoma de cadena positiva, la forma replicativa de ARN doble cadena, y una población de intermediarios de replicación que son regiones de ARN recientemente

sintetizados que se desplazan por hebras nacientes que se encuentran en elongación (Chu and Westaway 1985). Además de las hebras positivas y negativas de la replicación, en las células infectadas se producen ARN subgenómicos (sfARNs) que son ARNs no codificantes derivados del 3'UTR (Clarke et al. 2015; Pijlman et al. 2008; Silva et al. 2010). Los sfARNs son producto de la degradación incompleta del genoma por la endonucleasa del hospedador XRN-1, que se bloquea al encontrar estructuras secundarias de ARN muy estables del 3'UTR viral. La acumulación de sfARN ha demostrado estar implicada en funciones en la replicación y patogénesis viral, y también en la evasión de la respuesta antiviral celular (Filomatori et al. 2017; Pallarés et al. 2020; Schnettler et al. 2012).

Los genomas recién sintetizados pueden utilizarse para nuevas rondas de traducción de proteínas virales o para la generación de nuevas partículas virales. El proceso de ensamblado se daría por la asociación de los dímeros de cápside con el genoma de ARN y, por la acción de otros dímeros de cápside que actuarían como mediadores de la interacción con las regiones transmembrana de prM y E presentes en las membranas del RE (Tan, Fibriansah, and Lok 2020). Algunos estudios han sugerido también que la coordinación temporal del clivaje de cápside de la poliproteína por la proteasa NS2B/NS3 sería fundamental en este proceso (Lobigs et al. 2010; Rana et al. 2018, 2019). De este modo, se produce la brotación de las partículas inmaduras al lumen del RE, con una bicapa lipídica recubierta de las proteínas prM y E (Figura 11 y Figura 14).

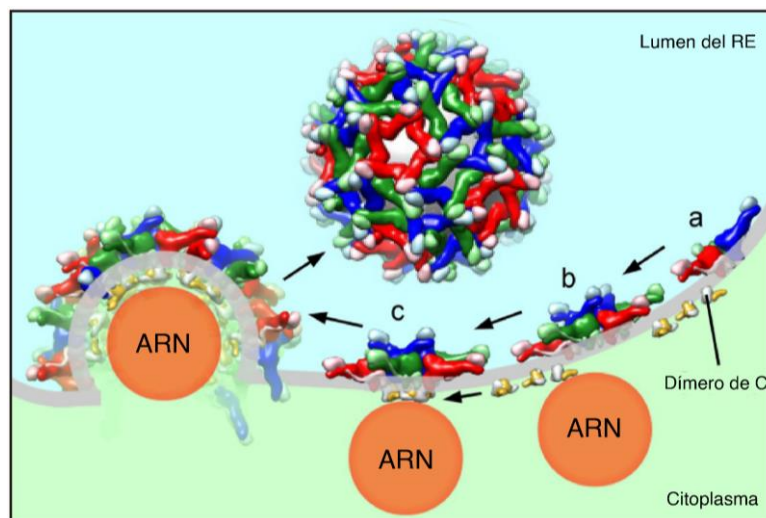


Figura 14. Modelo propuesto para la formación de partículas en las membranas del RE. Las proteínas E y prM forman una estructura de trípede invertido (a) que interactúan entre sí (b). Del lado citoplasmático, dímeros de cápside se unen a las regiones transmembrana de los trípedes de prM y E y también al ARN viral (c). Los dímeros de cápside interactúan con otros dímeros cercanos con sus hélices $\alpha 5$. Las partículas entonces comienzan a ensamblarse. Modificado de Tan et al. 2020.

Los viriones nacientes son transportados por la vía secretora hacia la superficie celular. En este proceso, las partículas inmaduras sufren rearrreglos conformacionales gatillados por el pH ácido del *trans*-golgi, donde la proteasa furina cliva a la proteína prM liberando el péptido pr (Figura 11).

Proteína de Cápside

Estructura y secuencia aminoacídica

En este trabajo de tesis nos centramos en el estudio de diferentes aspectos de la proteína de cápside de ZIKV y haremos un análisis comparado con la proteína de

cápside de DENV. La proteína de ambos virus es pequeña, de aproximadamente 100 aminoácidos (11kDa), que en solución se encuentra formando un homodímero, y posee una gran densidad de cargas positivas, lo que le permite unirse al ARN con gran afinidad y baja especificidad. Aproximadamente un cuarto de los aminoácidos que la componen son residuos básicos. La estructura tridimensional de las proteínas de cápside ha sido resuelta por RMN y cristalografía de rayos X para DENV (Ma et al. 2004; Xia et al. 2020) y ZIKV (Morando et al. 2019; Shang et al. 2018). La proteína está compuesta por cuatro alfa hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (Figura 15), y los primeros 20 aminoácidos se encuentran intrínsecamente desordenados (Ivanyi-Nagy and Darlix 2010; Ma et al. 2004; Morando et al. 2019), por lo que no poseen una estructura definida. Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$ de un monómero se ubican de forma antiparalela a las mismas hélices del monómero vecino y constituyen la mayor parte de superficie de contacto del dímero. El extremo N-terminal es flexible y presenta conformaciones y orientaciones variadas en distintos Flavivirus, lo que brindaría distinto nivel de hidrofobicidad en esa región (Shang et al. 2018).

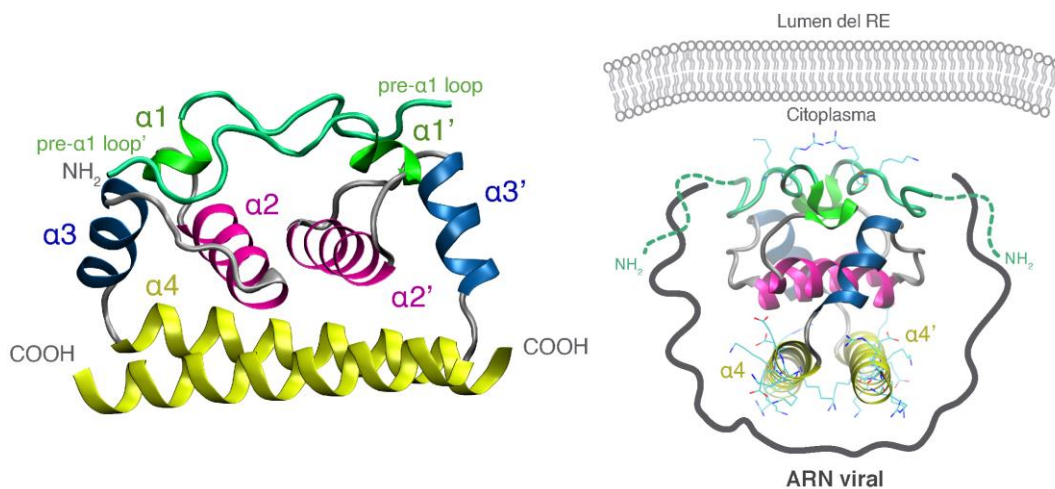


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de la proteína de cápside. Izquierda: estructura tridimensional de un dímero de la proteína de cápside de ZIKV. Se representan en distintos colores las regiones estructuradas de la proteína (hélices 1-4, y pre- $\alpha 1$ loop).

Derecha: Modelo de interacción con membranas y ácidos nucleicos. La estructura cristalográfica de la proteína se encuentra rotada con respecto a la figura de la izquierda. Se representan con líneas celestes los residuos cargados en los extremos N y C terminal de la proteína, responsables de las interacciones electrostáticas con el ARN viral. En línea punteada se encuentra el extremo N terminal desordenado de la proteína (no resuelto en la estructura cristalográfica), que posee un alto contenido de residuos básicos. PDB: 5YGH (Shang et al. 2018)

La proteína de cápside posee una distribución asimétrica de cargas: un lado del dímero contiene un bolsillo hidrofóbico (formado por la interfase de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 2'$) que sería responsable de la interacción con *lipid droplets* (LDs) y membranas (Ma et al. 2004; Samsa et al. 2009). El otro lado corresponde al extremo C-terminal que se encuentra cargado positivamente (interfase de las hélices $\alpha 4$ - $\alpha 4'$) que mediaría la interacción con ácidos nucleicos (Figura 15). Algunos estudios han propuesto que el extremo N-terminal desordenado podría contribuir a la asociación con membranas y LDs (Martins et al. 2012; Tan, Fibriansah, Kostyuchenko, et al. 2020) y también a la interacción con ácidos nucleicos, dada la gran densidad de cargas positivas (Khromykh and Westaway 1996; Samsa et al. 2012). Es posible que esta característica les confiera a las proteínas de cápside cierta flexibilidad para ejercer diferentes funciones necesarias en cada etapa del ciclo viral. Estudios de cápside de ZIKV realizados *in vitro* demostraron que es capaz de unirse tanto a ARN simple cadena como doble cadena y también a ADN (Shang et al. 2018), mientras que estudios realizados en DENV indicaron que esta proteína

adicionalmente puede tener actividad como chaperona de ARN (Pong et al. 2011). Sin embargo, los estudios de interacción *in vitro* de cápside con ácidos nucleicos son dificultosos por el hecho de que la proteína se agrega al unirse a los ácidos nucleicos. Es posible que la neutralización de las cargas positivas por la interacción con el ARN genere agregación por la región hidrofóbica.

El alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteínas de cápside de distintos Flavivirus arroja una identidad de secuencia menor a 40% (si se consideran residuos estereoquímicamente similares alcanza un 55%), lo que la convierte en la proteína viral menos conservada (Figura 16A) (Byk and Gamarnik 2016; Faustino et al. 2019). Sin embargo, las características estructurales y la distribución de cargas se encuentran altamente conservadas. Es posible identificar motivos dentro de ellas que son cruciales para el funcionamiento de la proteína. La región N-terminal (a pesar de ser desordenada) y la región estructurada (correspondiente a $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) se encuentran altamente conservadas en términos de aminoácidos cargados y presencia de residuos P/G que son los que interrumpen la continuidad de las alfa hélices (Figura 16B). La región de plegamiento flexible, ubicada entre las dos anteriores, permite mayor variabilidad, siendo que puede adoptar distintas conformaciones en cada uno de los virus.

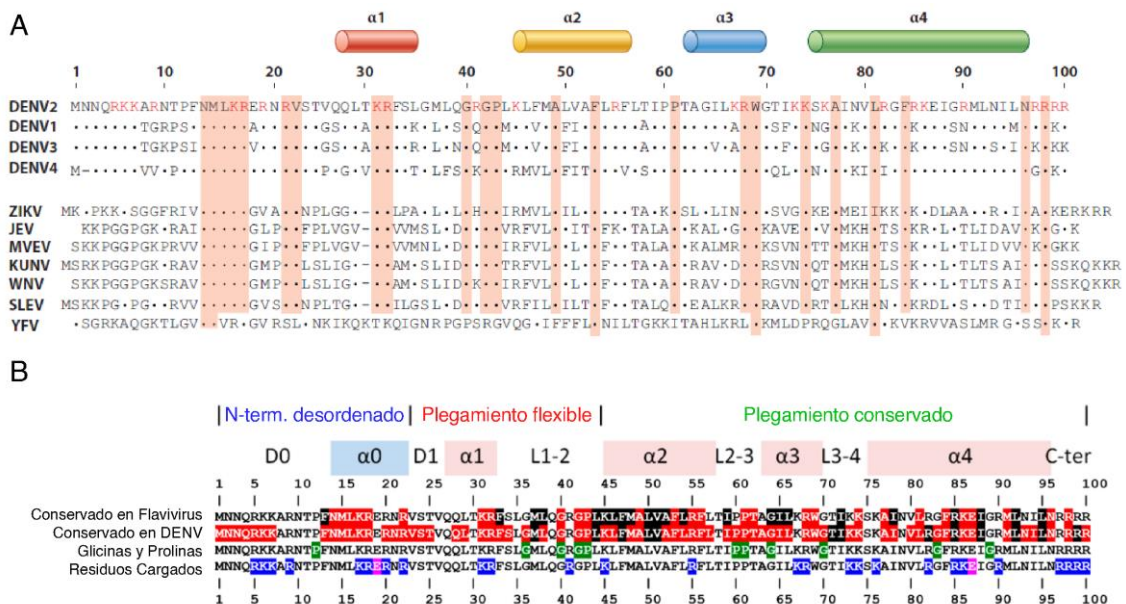


Figura 16. A: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteína de cápside de MBFVs. Los puntos indican residuos conservados y las rayas indican deleciones. El texto en rojo indica residuos básicos en la proteína de cápside de DENV2. Las cajas rosas resaltan residuos conservados en todos los virus alineados. La localización de las cuatro alfa hélices en DENV2 se indican con cilindros en la parte superior. B: Motivos conservados en las proteínas de cápside de Flavivirus. La región N-terminal desordenada y la de plegamiento conservado se encuentran conservadas tanto en presencia de aminoácidos cargados como de G/P. En cambio, la región de plegamiento flexible permite una mayor variabilidad. Su rol principal podría ser el de conectar la región N-terminal con la de plegamiento conservado, permitiendo distintas conformaciones. Los aminoácidos se encuentran numerados de acuerdo al consenso, coincidente con los números de residuos presentes en DENV2. Modificado de Byk y Gamarnik 2016 y Faustino et al. 2019.

Traducción, clivaje de cápside y formación de partículas

La proteína de cápside es la primera codificada en la poliproteína viral, y en su extremo C-terminal contiene una secuencia hidrofóbica (*anchor*) que al traducirse funciona como

péptido señal de translocación de la siguiente proteína (prM) al lumen del retículo. El clivaje secuencial por la proteasa viral NS2B-NS3 del lado citoplasmático seguida de la proteasa de señal del hospedador del lado del lumen (Figura 13) es fundamental para la liberación de cápside de una forma coordinada (Stocks and Lobigs 1998). Estudios de mutagénesis realizados en YFV, DENV y en el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVEV) demostraron que alterar el orden secuencial de los cortes de cada proteasa genera importantes efectos en la producción de partículas virales (Lee et al. 2000; Lobigs et al. 2010; Lobigs and Lee 2004; Rana et al. 2019). Estos trabajos proponen que el corte de la proteasa viral es lo que regula la exposición del sitio de corte del lado del retículo y el correcto acceso y procesamiento por parte de la proteasa celular. En relación a esto, se ha observado que, adicionalmente, la proteína viral NS3 es necesaria para la correcta formación de la nucleocápside. De forma llamativa, se encontraron funciones de la proteína NS3 en la formación de partículas virales que son independientes de sus actividades enzimáticas (Gebhard et al. 2016). Mediante estudios de mutagénesis en clones infecciosos en nuestro laboratorio, se determinó que una región no estructurada rica en prolinas del N-terminal de la proteína NS3 de DENV contiene residuos involucrados en la formación de partículas. Mutaciones puntuales en esta proteína impidieron la formación de partículas sin alterar la síntesis del ARN viral, atribuyendo a NS3 un posible rol en la coordinación del proceso de ensamblado de virus.

Flexibilidad funcional de cápside

Las proteínas de cápside de Flavivirus poseen una notable flexibilidad funcional y estructural. Estudios en distintos Flavivirus demostraron que son capaces de tolerar grandes deleciones internas. Un trabajo realizado en el virus de encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) demostró que la proteína de cápside es capaz de tolerar deleciones de hasta 16 aminoácidos en su dominio hidrofóbico y liberar virus viables (aunque también más partículas subvirales) (Kofler, Heinz, and Mandl 2002), y que frente a deleciones mayores genera virus pseudorevertantes con mutaciones espontáneas en la secuencia de cápside que aumentan su hidrofobicidad (Kofler et al. 2003). En YFV se observó que pseudovirus con deleciones de hasta 40 aminoácidos del N-terminal o de 27 aminoácidos del C-terminal conservaron la capacidad de empaquetar el genoma viral (Patkar et al. 2007). Por otro lado, la proteína de cápside de WNV tolera deleciones cortas en su hélice $\alpha 2$ hidrofóbica, mientras que deleciones grandes impiden la replicación (Schlick et al. 2009). De todos modos, si bien todas las mutaciones mencionadas fueron viables, muchas de ellas presentaron fenotipos atenuados de acuerdo a la magnitud de la deleción generada, lo que sugiere que es posible el diseño racional de candidatos vacunales con deleciones en cápside (He et al. 2021; Kofler et al. 2002; Xie et al. 2018).

Superposición de señales en la región codificante de cápside

La secuencia codificante de cápside contiene elementos de ARN necesarios para la replicación viral que se encuentran conservadas en Flavivirus. Un estudio sistemático realizado en nuestro laboratorio con el virus de DENV indicó que los primeros 160 de los 300 nucleótidos de la secuencia de cápside se encuentran formando estructuras conservadas de ARN o están involucrados en interacciones a larga distancia con otras regiones del genoma (de Borba et al. 2015). Estos elementos son la secuencia de circularización 5' CS mencionada previamente (Alvarez, De Lella Ezcurra, et al. 2005; Khromykh et al. 2001) (Figura 10), una estructura de ARN muy estable denominada cHP (*capsid hairpin*) (Clyde, Barrera, and Harris 2008) involucrado en la síntesis de ARN y una estructura de *pseudoknot* en la región llamada C1 que promueve la circularización (de Borba et al. 2015; Liu et al. 2013). Esta superposición de funciones del ARN en *cis*

limita el estudio de la función de los residuos del extremo N-terminal de la proteína. Por lo tanto, para manipular genéticamente a la proteína de cápside se requiere desacoplar estos elementos de ARN que, por un lado, actúan en *cis* para la síntesis del genoma, y por otro contienen la secuencia codificante para la traducción de la proteína. Estas estrategias incluyen duplicaciones parciales o totales de la secuencia de cápside para lograr disociar las dos funciones y estudiar determinantes de la formación de partículas sin alterar la síntesis del ARN.

Distribución subcelular y funciones de cápside en la célula

Durante la infección, la proteína de cápside de DENV se distribuye entre el núcleo y el citoplasma de las células infectadas (Figura 17). En el citoplasma se encuentra asociada a membranas del RE y a organelas lipídicas derivadas del RE rodeadas de una monocapa de fosfolípidos llamadas *lipid droplets* (LDs) (Samsa et al. 2009), mientras que en el núcleo se acumula en nucleolos (Bulich and Aaskov 1992; Wang et al. 2002). Dado que la formación de partículas ocurre en la superficie del retículo endoplásmico, aún no se ha determinado con claridad la función de la proteína de DENV en los distintos compartimentos. Esta distribución podría estar controlada espacial y temporalmente durante la infección, dado que mutaciones que alteran su localización tienen un gran efecto en la replicación viral (Samsa et al. 2009). Esta observación es muy interesante, ya que como se mencionó previamente, deleciones de la secuencia de cápside son toleradas, mientras que mutaciones puntuales que alteran la localización no lo son. Es posible que la distribución de cápside en los distintos compartimentos celulares sea importante para evitar la interacción prematura con el ARN durante la replicación del mismo. Los sitios de acumulación de cápside podrían actuar como reservorios de la proteína de modo de regular su disponibilidad durante el ciclo viral. Además, la maduración de cápside por el clivaje de *anchor* podría estar acoplada a la formación de partículas localmente, por lo que la proteína asociada a RE podría ser la proteína utilizada para la formación de nucleocápsides, mientras que la proteína localizada en nucleolos o LDs podrían cumplir otras funciones durante la infección.

Se ha propuesto que el transporte de cápside al núcleo estaría mediado por señales de localización nuclear (NLSs), que suelen ser series de residuos básicos en la secuencia. En este sentido, se han predicho tres posibles NLS en la proteína de cápside de DENV: ${}^6\text{KKAR}_9$, ${}^{73}\text{KKSK}_{76}$, y un motivo con estructura bipartita, ${}^{85}\text{RKEIGRMLNILNRRRR}_{100}$ del cual existen variaciones en todas las proteínas de cápside de Flavivirus (Bulich and Aaskov 1992). Sin embargo, los estudios disponibles no han sido concluyentes en cuanto a la importancia de los mismos para la localización nuclear de dicha proteína, y aún se desconoce la relevancia de la localización nuclear de cápside durante la infección viral (Netsawang et al. 2010; Sangiambut et al. 2008; Wang et al. 2002). En la proteína de cápside de JEV se han identificado los residuos conservados G42 y P43 como los responsables de la localización nuclear, cuya mutación genera adicionalmente efectos en la formación de partículas (Mori et al. 2005). En WNV se describió que la NLS bipartita y los residuos 42 y 43 son los involucrados en la localización nuclear y que este transporte estaría mediado por el complejo de importinas α/β (Bhuvanankantham, Chong, and Ng 2009). Además, la fosforilación de cápside de WNV en los residuos cercanos a sus NLS por la kinasa PKC sería moduladora del tráfico nuclear, alterando su capacidad de interacción con la importina α (Bhuvanankantham et al. 2010). En cuanto a la función de cápside en el nucleolo, existen distintos trabajos que identifican interacciones con proteínas nucleares y nucleolares. Se ha encontrado que la proteína de cápside de WNV es capaz de interactuar con la helicasa de ARN nucleolar DDX56 y provocar su exportación al citoplasma, lo que podría ser necesario para la formación de partículas (Xu, Anderson, and Hobman 2011). Un mecanismo similar se observó con la proteína de cápside de JEV, que durante la infección interacciona con la proteína nucleolar B23 y provoca su exportación al citoplasma (Tsuda et al. 2006). Además, la proteína de cápside de DENV es capaz de interactuar con histonas (Colpitts et al. 2011),

provocando el desarmado de los nucleosomas, y con nucleolina (Balinsky et al. 2013) cuya interacción se postula que podría estar involucrada en la replicación viral. Si bien se han identificado estas interacciones de la proteína de cápside viral con proteínas celulares, aún se desconocen los detalles moleculares de estas funciones y si la localización nuclear podría tener un rol en la replicación viral.

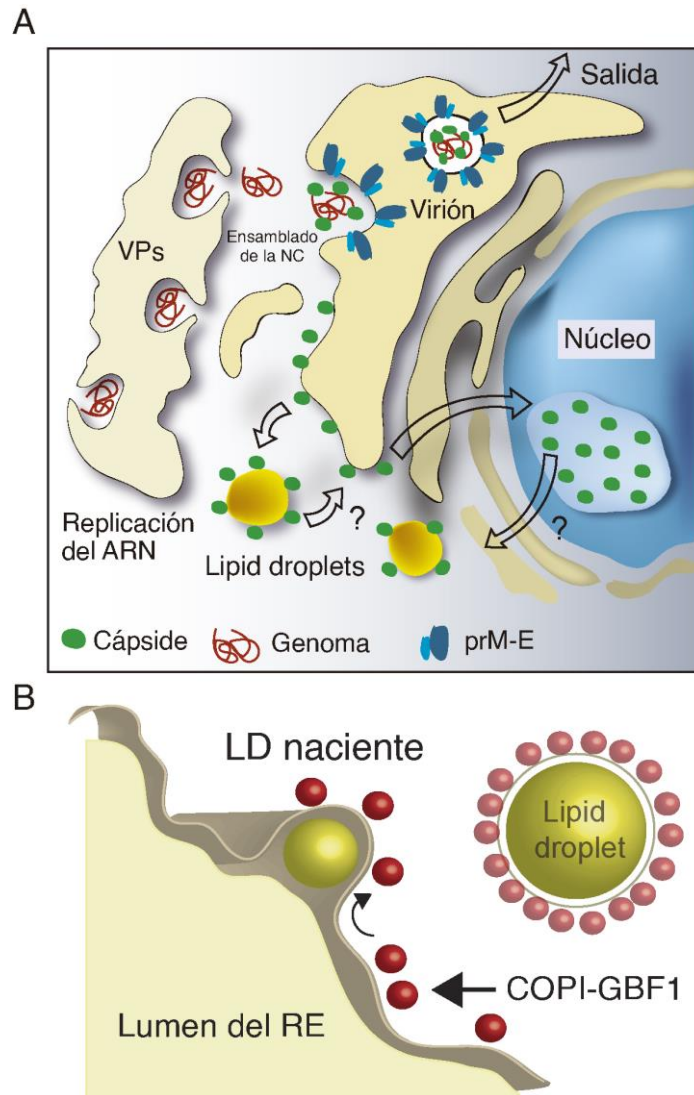


Figura 17. Localización subcelular de la proteína de cápside de DENV. A. Cápside (en verde) se localiza en nucleolos, LDs y en el RE. El ARN viral (en rojo) se amplifica en los complejos de replicación en los VPs. El genoma recién sintetizado se acompleja con cápside para formar la nucleocápside (NC), que brota del RE y adquiere la membrana y las proteínas estructurales prM/E. Modificado de Byk y Gamarnik 2016. B: El mecanismo de acumulación de cápside en LDs requiere una proteína GBF1 funcional, y es dependiente de COPI. Los LDs brotan del RE y son recubiertos por proteína de cápside, en forma de anillo. Modificado de Iglesias et al. 2015.

Respecto a la localización en LDs, estudios de mutagénesis realizados en nuestro laboratorio han logrado identificar a los residuos hidrofóbicos presentes en la hélice $\alpha 2$ de cápside como responsables de esta asociación (Samsa et al. 2009). En particular, la mutación puntual de los residuos L50 y L54 impidió la asociación a LDs y afectó la formación de partículas virales. La mutante doble de los residuos L50-L54 en simultáneo se vio además afectada en la síntesis del ARN viral. En contraste, la mutación de residuos no cargados en la hélice $\alpha 1$ o en el *loop* que conecta las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ no alteró la asociación a LDs. Se ha determinado que ciertas proteínas del tráfico vesicular, como COPI y COPII estarían involucradas en el transporte de proteínas celulares del RE a los LD (Soni et al. 2009). Estudios realizados en nuestro laboratorio analizaron el

mecanismo por el cual cápside se acumula progresivamente en los LDs durante la infección y los factores del hospedador que son necesarios en este proceso. En experimentos con siARNs contra los distintos componentes del sistema de tráfico celular en células humanas se observó que el transporte de cápside a los LDs sería a través de una función no canónica de la vía celular GBF1-Arf-COPI (Figura 17 B) (Iglesias et al. 2015). La depleción de la subunidad β COP (perteneciente a COPI) afectó de forma específica la asociación de cápside a los LDs. Este proceso demostró ser independiente de los componentes de COPII, ya que su depleción no afectó la distribución de cápside. Si bien se definió un rol importante de la asociación de cápside a los LDs en la formación de partículas infectivas, el mecanismo por el cual esto funcionaría aún no ha sido determinado. La acumulación de cápside en LDs podría ser un mecanismo para retener a esta proteína en etapas tempranas del ciclo viral, ya que los LDs se han descrito como reservorios temporales de proteínas celulares (Cermelli et al. 2006). Por otro lado, existe una relación entre la abundancia de LDs y la infección viral: se ha demostrado que la infección por DENV aumenta la abundancia de LDs (Samsa et al. 2009), en la infección por JEV disminuyen (Sarkar et al. 2021), y en la infección por ZIKV pueden aumentar o disminuir según la etapa de la infección (García et al. 2020; Monson et al. 2021), por lo que la asociación de cápside con los LDs podría tener funciones diferentes en la regulación del metabolismo lipídico de la célula. En el caso de DENV, se observó que la reducción de la cantidad de LDs en la célula infectada utilizando el compuesto C-75, logró inhibir en gran medida la producción de partículas virales (Samsa et al. 2009). Esto sugiere que la manipulación farmacológica de la disponibilidad de LDs podría ser una estrategia antiviral.

Otras funciones de cápside más allá de su rol estructural en la formación de partículas virales involucran interacción con componentes celulares nucleares y citoplasmáticos para promover la replicación viral y la generación de nuevos virus. Se ha descrito que la proteína de cápside de WNV puede ser fosforilada por la kinasa PKC y de ese modo interactuar con la proteína HDM2, promoviendo la apoptosis mediada por p53 (Bhuvanankantham et al. 2010; Yang et al. 2008). Las proteínas de cápside de DENV y ZIKV son capaces de interactuar también con componentes de los peroxisomas, como la proteína PEX19, inhibiendo la biogénesis de estas organelas (Farelo et al. 2022). En el caso de DENV se determinó que es capaz de interactuar a través de su extremo N-terminal con DDX3X, una helicasa de ARN dependiente de ATP con funciones antivirales que podrían ser contrarrestadas por esta interacción (Kumar et al. 2018). Por otro lado, se observó que la proteína de cápside de ZIKV es capaz de alterar el mecanismo de degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD), mediante su interacción con distintos factores involucrados en este mecanismo. Estudios de espectrometría de masa indicaron que cápside es capaz de interactuar con la proteína UPF1, un regulador central del NMD, y esta interacción resultaría en el etiquetado para su degradación vía proteosoma (Fontaine et al. 2018).

Por último, algunos trabajos han explorado cómo la proteína de cápside puede ejercer sus funciones contrarrestando la respuesta antiviral celular de forma directa. Recientemente se reportó mediante estudios de ARNseq, que las proteínas de cápside de distintos Flavivirus son capaces de inhibir la expresión de interferón (IFN) de tipo I y de genes estimulados por IFN (*IFN-stimulated genes*, ISGs) (Airo et al. 2022). El mecanismo involucrado sería a través de la interacción de cápside con la proteína TRIM25, una ubiquitina E3 ligasa encargada de activar al sensor citoplasmático RIG-I. Esta interacción bloquearía la ubiquitinación y activación de RIG-I y la consecuente activación de la cascada de IFN. En mosquitos, se observó que la proteína de cápside de YFV es capaz de antagonizar la respuesta de ARN pequeños antivirales a través de su interferencia con la proteína Dicer (Samuel et al. 2016). Llamativamente, un estudio

reciente sugiere que la proteína de cápside a su vez puede ser blanco de la respuesta antiviral de la célula. Se observó que la proteína de cápside de DENV es ubiquitinada en su lisina 76, pero que esta señal tendría un efecto antiviral, ya que constituye una señal de reconocimiento para la proteína p62 que la enviaría a degradación por autofagia (Wu et al. 2022).

Cápside como blanco para estrategias antivirales

La proteína de cápside es capaz de formar interacciones proteína-proteína (formación de homodímeros y oligómeros e interaccionar con proteínas celulares), proteína-ARN (formación de nucleocápside) y proteína-fosfolípidos (interacción con membranas). Las múltiples funciones de la proteína de cápside tanto en la formación de partículas virales como en el establecimiento de la infección en la célula la convierten en un atractivo blanco de estrategias antivirales (Klump and Crépin 2014; Sotcheff and Routh 2020). En virus de ARN, la emergencia de virus resistentes a drogas es un gran desafío. Las altas tasas de error asociadas a las polimerasas virales dan lugar a la selección de mutaciones que le permiten al virus adaptarse a distintos ambientes. Los virus resistentes a drogas que emergen son frecuentemente dominantes por sobre las variantes susceptibles, por lo que suelen utilizarse combinaciones de drogas o se eligen blancos celulares para evitar resistencia. En base a esta dificultad se ha propuesto un enfoque diferente en el que, para evitar el escape de variantes virales, se seleccionen blancos antivirales que funcionen en forma dominante (Mateo et al. 2015). En otras palabras, en algunos casos es posible que dentro de la población viral los genomas susceptibles sean dominantes dando lugar a un virus sensible a las drogas en cuestión. Este fenómeno ocurre cuando el blanco viral está constituido por una proteína capaz de formar oligómeros. De este modo, los virus resultantes contendrán una mezcla de proteínas funcionales y defectivas en la partícula que dará como resultado una menor infectividad. Por este motivo la mutación que ofrece la resistencia no será fácilmente seleccionada. Este es el caso de las proteínas de cápside de Flavivirus, que deben oligomerizar para asociarse con el ARN viral de tal forma que la incorporación de cápsides con mutaciones que podrían ofrecer resistencia a la droga serían recesivas y difícilmente seleccionadas. De hecho, se observó para el compuesto ST-148, un inhibidor de cápside mencionado anteriormente (Byrd et al. 2013) que los virus susceptibles fueron dominantes en co-infecciones con virus resistentes y no se observó la selección de virus resistentes tanto en ensayos en cultivo como en ratones (Mateo et al. 2015). Este ensayo funcionó como una prueba de concepto que evidencia que el uso de blancos antivirales dominantes podría reducir el número de drogas necesarias para inhibir las infecciones virales. Esta estrategia podría ser útil para el diseño de inhibidores que alteren las funciones de la proteína de cápside con el objetivo de disminuir la aparición de resistencia.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar las funciones de la proteína de cápside de ZIKV durante la infección viral y realizar análisis comparativos con la proteína de cápside de DENV. En base a este objetivo general abordamos los estudios de acuerdo a los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar herramientas específicas para el estudio de la proteína de cápside de ZIKV y analizar las propiedades de su interacción *in vitro* con membranas lipídicas y ácidos nucleicos.
2. Caracterizar la distribución subcelular de cápside de ZIKV durante la infección viral e identificar determinantes moleculares responsables de la localización nuclear.
3. Estudiar la movilidad *in vivo* de las proteínas de cápside de ZIKV y DENV en células infectadas y la dinámica del transporte entre núcleo y citoplasma.
4. Analizar la funcionalidad de elementos de ARN en la región codificante de cápside de ZIKV necesarios para la replicación viral.

Resultados

Capítulo 1: Desarrollo de herramientas para el estudio de las propiedades bioquímicas y funcionales de la proteína de cápside de ZIKV.

Introducción

La proteína de cápside de distintos Flavivirus es capaz de interactuar tanto con ácidos nucleicos como con membranas celulares (Khromykh and Westaway 1996; Ma et al. 2004; Martins et al. 2012; Samsa et al. 2009, 2012; Tan, Fibriansah, Kostyuchenko, et al. 2020). Esta capacidad es la que le permite, por un lado, interactuar con los diferentes componentes celulares como las membranas del RE, nucleolos y LDs y, por otro lado, interactuar con el ARN para generar partículas virales.

En las células eucariotas, una gran proporción de las reacciones enzimáticas y de señalización ocurren en solución acuosa, en organelas compartimentalizadas por membranas lipídicas que proveen la separación física requerida para estos procesos. Sin embargo, existe un nivel adicional de organización local tanto en el núcleo como en el citosol en la forma de ensamblajes macromoleculares, también llamados organelas sin membrana. Estos cuerpos sin membrana pueden tener tamaños de entre decenas de nm hasta decenas de μm , y son ensamblados dinámicos en los cuales los componentes pueden transicionar rápidamente entre la organela y el medio (Mitrea and Kriwacki 2016). Las organelas sin membrana se forman por un proceso llamado separación de fase líquido-líquido (*liquid-liquid phase separation*, LLPS) en el cual las proteínas condensan a partir de la fase en solución (Rhine, Vidaurre, and Myong 2020). Estas transiciones ocurren a partir de una semilla formada en *bulk* o en la interfase de componentes solubles, dando lugar a una nueva entidad líquida que posee propiedades físicas diferentes de las de su entorno (Uversky and Finkelstein 2019). El nucleolo representa un paradigma de estos compartimentos líquidos, y contiene una organización compleja y compartimentalizada en regiones que es capaz de desensamblarse durante la mitosis. Otros ejemplos de organelas sin membrana nucleares lo constituyen los nuclear *speckles*, los cuerpos de PML y los cuerpos de Cajal, involucrados en regulación génica y del metabolismo del ARN. En el citosol, por su parte, existen los *P-bodies* y gránulos de estrés que regulan el metabolismo de los ARN mensajeros y la homeostasis celular (Mitrea and Kriwacki 2016).

Se encuentra aceptado que una de las interacciones que gatilla la LLPS es la asociación de proteínas con ARN. Un mecanismo es posibilitando la multimerización de la proteína de unión a ARN (Rhine et al. 2020). Las interacciones multivalentes entre proteína-proteína o proteína-ARN son una de las fuerzas motoras de la formación de organelas líquidas, así como las interacciones multivalentes entre proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (*intrinsically disordered regions*, IDRs) (Wang et al. 2021) (Figura 18). Además, algunos estudios sugieren que las proteínas son capaces de auto separarse en una fase líquida en la interfase con una membrana lipídica (Feng et al. 2019). Las funciones asociadas a la formación de condensados macromoleculares pueden ser diversas. Algunos ejemplos son el ensamblado de un complejo de moléculas, como plataforma de reacciones enzimáticas, como secuestradoras de proteínas específicas para regular ciertos procesos, o el empaquetamiento y transporte de moléculas, entre otras (Figura 18).

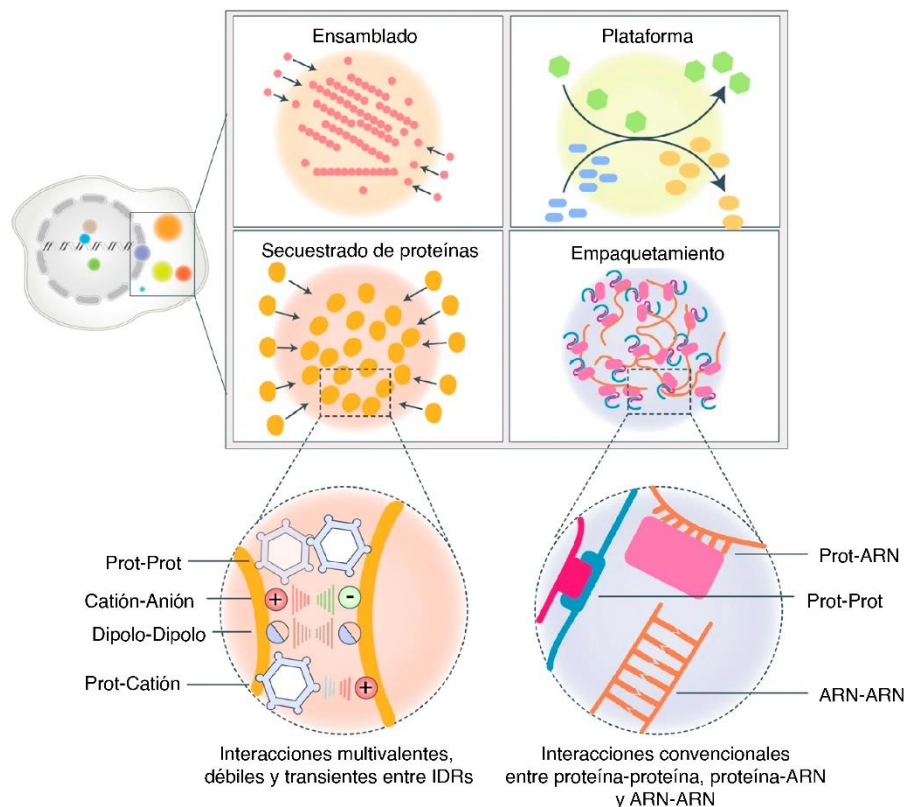


Figura 18. Representación esquemática de las interacciones que gatillan la LLPS y las funciones asociadas a su formación. Las posibles funciones son el ensamblado de un complejo de moléculas, como plataforma de reacciones enzimáticas, como secuestradoras de proteínas específicas para regular procesos, o el empaquetamiento y transporte de moléculas. Todas estas funciones se encuentran regidas por interacciones multivalentes entre IDRs ya sean proteína-proteína, catión-anión, dipolo-dipolo o proteína-catión o por interacciones convencionales entre proteínas-ARN o ARN-ARN. Modificado de Wang et al. 2021.

Las proteínas de cápside de ZIKV y DENV se encuentran normalmente como dímeros e interactúan con el ARN viral formando la nucleocápside (NC) en el proceso de formación de virus, en el cual también oligomerizan. En este proceso, las proteínas reclutan al genoma viral recién sintetizado, y el complejo NC formado brota hacia el lumen del RE, adquiriendo una membrana lipídica con las proteínas E y prM (Byk and Gamarnik 2016; Tan, Fibriansah, Kostyuchenko, et al. 2020). Sin embargo, el mecanismo molecular del proceso de encapsidación hasta el momento es desconocido.

En este capítulo, se presentan los resultados obtenidos a partir de un análisis bioquímico de la interacción de la proteína de cápside de los virus ZIKV y DENV con membranas y con ácidos nucleicos. Para esto empleamos sistemas reconstituidos *in vitro* con membranas que imitan la composición del RE y estudiamos cómo la proteína de cápside viral es capaz de reclutar membranas y ácidos nucleicos localmente, generando condensados macromoleculares.

Resultados

Desarrollo de herramientas moleculares para la caracterización de la proteína de cápside de ZIKV

El inicio de este trabajo de tesis coincidió con la emergencia del virus de Zika en el mundo y su llegada a la región de Latinoamérica. Por este motivo, si bien en nuestro laboratorio disponíamos de herramientas para el estudio del virus del dengue, la gran relevancia de ZIKV puso en evidencia la necesidad de generar herramientas moleculares específicas para este nuevo virus. Con el objetivo de estudiar la proteína

de cápside de ZIKV, se clonó el marco abierto de lectura de la proteína a partir de ARN de infecciones con el aislamiento KX198134 del virus (Senegal) en un vector de expresión bacteriano (pET). Luego, se realizó la puesta a punto de la expresión de la proteína en bacterias *E. coli* BL21 hasta obtener un nivel adecuado para su posterior purificación. Debido a la alta densidad de cargas positivas, es posible purificar las proteínas de cápside de este virus por cromatografía de afinidad por resinas de heparina (polisacárido cargado negativamente). La purificación se realizó a partir de lisados bacterianos sin necesidad de la presencia de una etiqueta de purificación. En este caso, se llevó a cabo la purificación por medio de columnas de heparina y elución con alta concentración de sal (Figura 19 A).

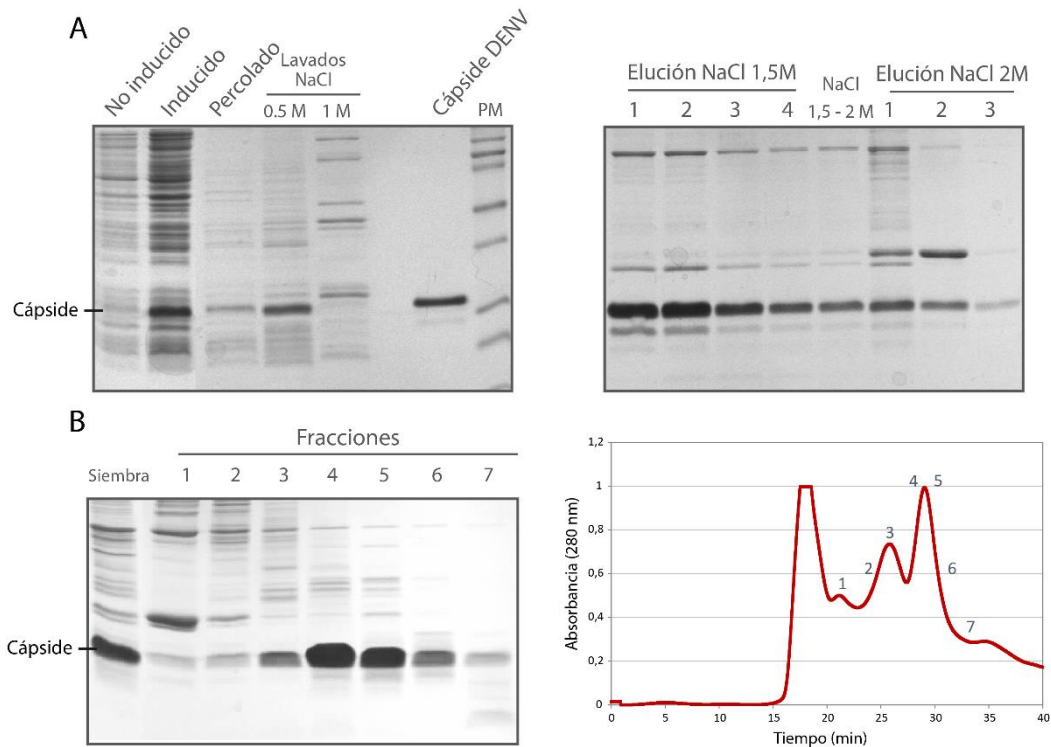


Figura 19. Expresión y purificación de la proteína de cápside de ZIKV. A: Fracciones correspondientes a la purificación por afinidad sembradas en geles de poliacrilamida 15% y teñidos con azul de Coomassie. Izquierda: medio de cultivo inducido y sin inducir, percolado de la columna y lavados con bajas concentraciones salinas. Derecha: eluidos de la columna con concentraciones altas de sal. La proteína es eluida en las primeras fracciones de 1,5M de NaCl. B: Izquierda: fracciones correspondientes a la purificación por exclusión molecular sembradas en geles de poliacrilamida 15% y teñidos con azul de Coomassie. Derecha: perfil de corrida obtenido durante la purificación de la proteína por medición de absorbancia a 280nm del eluido de la columna. Los números sobre la curva se corresponden con los números de fracciones presentadas en la figura de la izquierda. La calle de siembra corresponde a la muestra que se sembró en la columna.

Si bien con este método es posible eliminar la gran mayoría de proteínas, permanecen proteínas contaminantes de alto peso molecular. Por este motivo, como segundo paso de purificación, se empleó un método de exclusión molecular mediante una columna Sephadex S75. De esta forma las fracciones recolectadas de la columna de afinidad fueron sujetas al segundo paso, obteniéndose la proteína cápside viral con altos niveles de pureza (Figura 19 B). Una vez obtenida la proteína pura, se realizaron estudios bioquímicos de dispersión de luz y unión a ácidos nucleicos. Se determinó por dispersión estática de luz (*o static light scattering*) que, de acuerdo con lo esperado, la proteína de cápside en solución se encuentra como un dímero.

Estudios bioquímicos de las proteínas de cápside de ZIKV y DENV y su interacción con membranas biológicas

Si bien se sabe que la proteína de cápside debe unir al genoma viral para formar la NC durante la encapsidación, aún no se conoce el mecanismo por el cual dicha NC es reclutada a la membrana del RE para la formación de partículas virales. Para investigar dicho mecanismo, se utilizaron distintos métodos que se valen de la fluorescencia para evaluar la interacción de las proteínas de cápside de ZIKV y DENV con membranas que emulan el RE, en presencia o ausencia de ácidos nucleicos. Para este trabajo se estableció una colaboración con el equipo del Dr. Ernesto Ambroggio (Facultad de Ciencias Químicas, CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba).

Con este fin, se utilizaron las proteínas recombinantes expresadas en bacterias y purificadas a homogeneidad (Figura 19). Primero, se monitoreó el espectro de emisión del único triptófano (W) presente en las proteínas (Figura 20, A y D), en presencia o ausencia de vesículas grandes unilamelares (LUVs) compuestas por una mezcla lipídica similar a la composición del RE (ERMix). Las propiedades de fluorescencia del W dependen de la polaridad del medio en el que está inmerso. El espectro de emisión de ambas proteínas sufrió un desplazamiento a longitudes de onda más cortas (Figura 20 B/C y E/F) en presencia de LUVs. Esto indica que cuando las proteínas interactúan con membranas, el W censa un ambiente menos polar. El cambio de polaridad puede estar asociado a un reordenamiento estructural de la proteína, a un nuevo entorno por la proximidad del aminoácido a la membrana, o a ambos. Para responder esta pregunta, utilizamos la propiedad de transferencia de energía que ocurre entre el W y el colorante NBD (Figura 20 G).

La intensidad de fluorescencia de NBD aumenta a medida que se titula con LUVs teñidas con NBD con concentraciones crecientes de proteína de cápside (Figura 20 H/I). Estos resultados indican que las proteínas se unen a las membranas y que sus W se encuentran lo suficientemente cerca de la interfase de la membrana lipídica (2.2nm) como para transferir energía a NBD.

Al realizar los experimentos detallados previamente, se observó un cambio en la turbidez de la muestra, lo que sugiere que la interacción de la proteína con los liposomas podría inducir una agregación. Para estudiar si este proceso involucra un mezclado entre lípidos de distintos liposomas (por ejemplo, por fusión o hemifusión de LUVs), se realizó un ensayo de FRET utilizando el par NBD-fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y TRITC-PE (Figura 20 J). Al agregar cápside de DENV o ZIKV a la mezcla de liposomas marcados o no marcados, se observó un aumento en la fluorescencia de NBD alrededor de 1.5 veces sobre el control, lo que indica intercambio de lípidos entre LUVs (Figura 20 K). Estos resultados apoyan la idea de que ocurre hemifusión gatillada por la interacción proteína-membrana. Para obtener información con resolución espacial sobre esta interacción, se utilizó microscopía de fluorescencia confocal para visualizar de forma directa el anclaje de membranas entre ERMix GUVs (vesículas gigantes unilamelares compuestas por una mezcla lipídica similar a la composición del RE) y LUVs. Para ello, GUVs marcadas con TRITC se incubaron con LUVs marcadas con *pacific blue* (PB) en ausencia o presencia de proteína de cápside. En ausencia de proteínas, no se observó señal de LUVs en la membrana de las GUVs (Figura 20 M). Sin embargo, al agregar cápside de ZIKV o DENV, se observa un claro reclutamiento y enriquecimiento de las LUVs a la interfase de la membrana de las GUVs, en donde se observa una fuerte colocalización espacial de los fluoróforos (Figura 20 L,N,O).

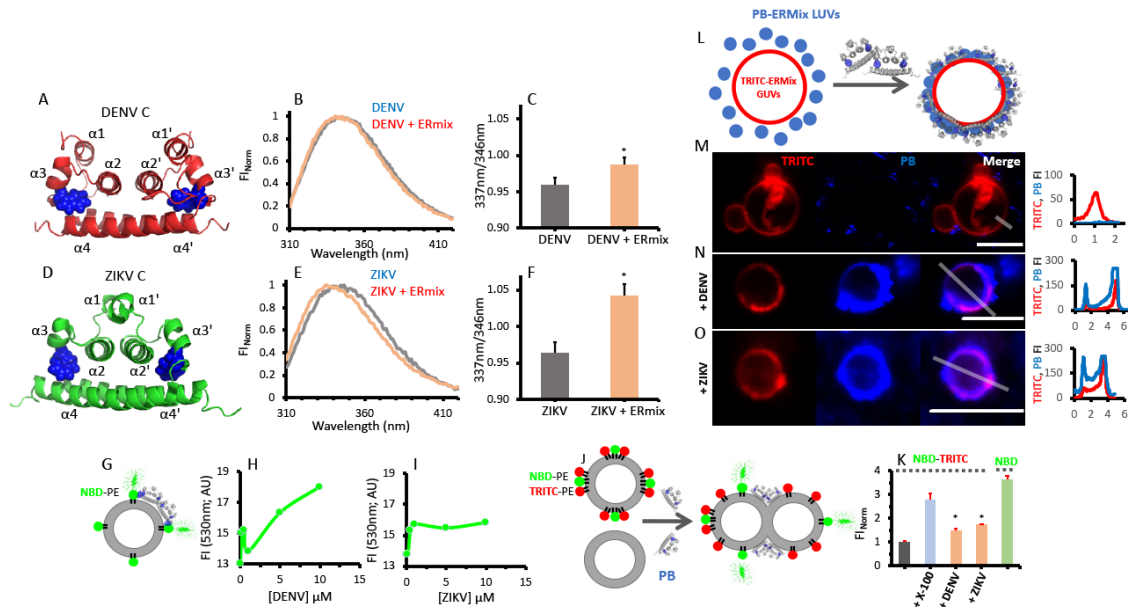


Figura 20. Estructuras de los dímeros de cápside de DENV (A) y ZIKV (D) donde el residuo W se representa con esferas azules. Espectros de emisión de fluorescencia de W y cuantificación de la relación de longitud de onda de 337/346 nm para DENV (B y C) y ZIKV (E y F), respectivamente, en ausencia (gris) y presencia (marrón claro) de LUVs. Representación esquemática del fenómeno de FRET entre W y NBD (G) cuando las proteínas de cápside interactúan con las LUVs marcadas con NBD-PE. El aumento en la intensidad de fluorescencia NBD (FI) debido a la proximidad de W ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) se mide en función de la adición de DENV (H) o ZIKV (I). El ensayo de mezcla de lípidos (J), donde la fluorescencia de NBD (colorante donante) aumenta cuando el contenido de lípidos de las LUV no marcadas se fusiona con las LUV teñidas con NBD-PE/TRITC-PE. Se muestra la IF normalizada de NBD de la mezcla de LUVs teñida con NBD-PE/TRITC-PE + LUVs solas para las diferentes condiciones (K). Se esquematiza un ensayo de acoplamiento GUVs-LUVs desencadenado por la adición de proteínas (L), donde las LUVs con marca fluorescente azul se reclutan en la membrana de los GUVs con marca roja después de la adición de las proteínas de cápside. Imágenes de fluorescencia confocal de las GUVs marcadas con TRITC-PE (canal rojo, TRITC) en presencia de LUVs marcadas con PB-PE (canal azul, PB) en ausencia (M) o en presencia de cápside de DENV (N) o ZIKV (O). A partir de la imagen combinada (Merge), se midió el perfil de FI de TRITC (línea roja) y PB (línea azul) a lo largo de la línea gris dibujada y se trazó a la derecha de cada imagen. Los perfiles de señal de fluorescencia de PB trazados en N y O alcanzan sus valores máximos, ya que las imágenes se adquieren exactamente con la misma configuración que el control (M). Los resultados son de al menos dos experimentos independientes (gráficos cuantitativos que muestran el promedio y las desviaciones estándar donde * indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la situación de control usando la prueba t de Student no pareada), y las imágenes muestran observaciones representativas. La barra de escala en imágenes confocales es de 5 μm . Los datos que se muestran son representativos de 2 a 4 repeticiones independientes.

Estos resultados indican una interacción de las proteínas de cápside con membranas. Es sabido que el complejo cápside-ARN debe estar en contacto estrecho con las membranas del RE para la morfogénesis de las partículas, pero no está claro si la interacción cápside-membrana lipídica sería la fuerza impulsora de este proceso crucial para la encapsidación. Para analizar el rol de la interacción de las proteínas con membranas en la interacción de cápside con ácidos nucleicos, se realizó un experimento en el cual las GUVs se incubaron con ADN o ARN simple cadena (ssADN marcado con FITC, ssARN marcado con Cy5) en presencia o ausencia de cápside (Figura 21). En ausencia de proteína, el ácido nucleico marcado en verde con el fluoróforo FITC se distribuyó de forma homogénea (Figura 21 B) por fuera de la membrana de las GUVs. Sin embargo, en presencia de proteína, el ácido nucleico fue reclutado masivamente a

la interfase de la membrana de las GUVs (Figura 21 C, D). Como se observa en las imágenes, el reclutamiento no fue uniforme en la superficie de las GUVs. Las partículas donde se evidenciaba marca de ADN (de un tamaño entre 1-2 μm de diámetro) se encontraron unidas a membrana o rodeadas por ella (Figura 21 C, D). Además, en presencia de LUVs y ssADN marcados, tanto los liposomas como los ácidos nucleicos fueron dirigidos a la interfase de las GUVs por medio de las proteínas de cápside (Figura 21 E-H).

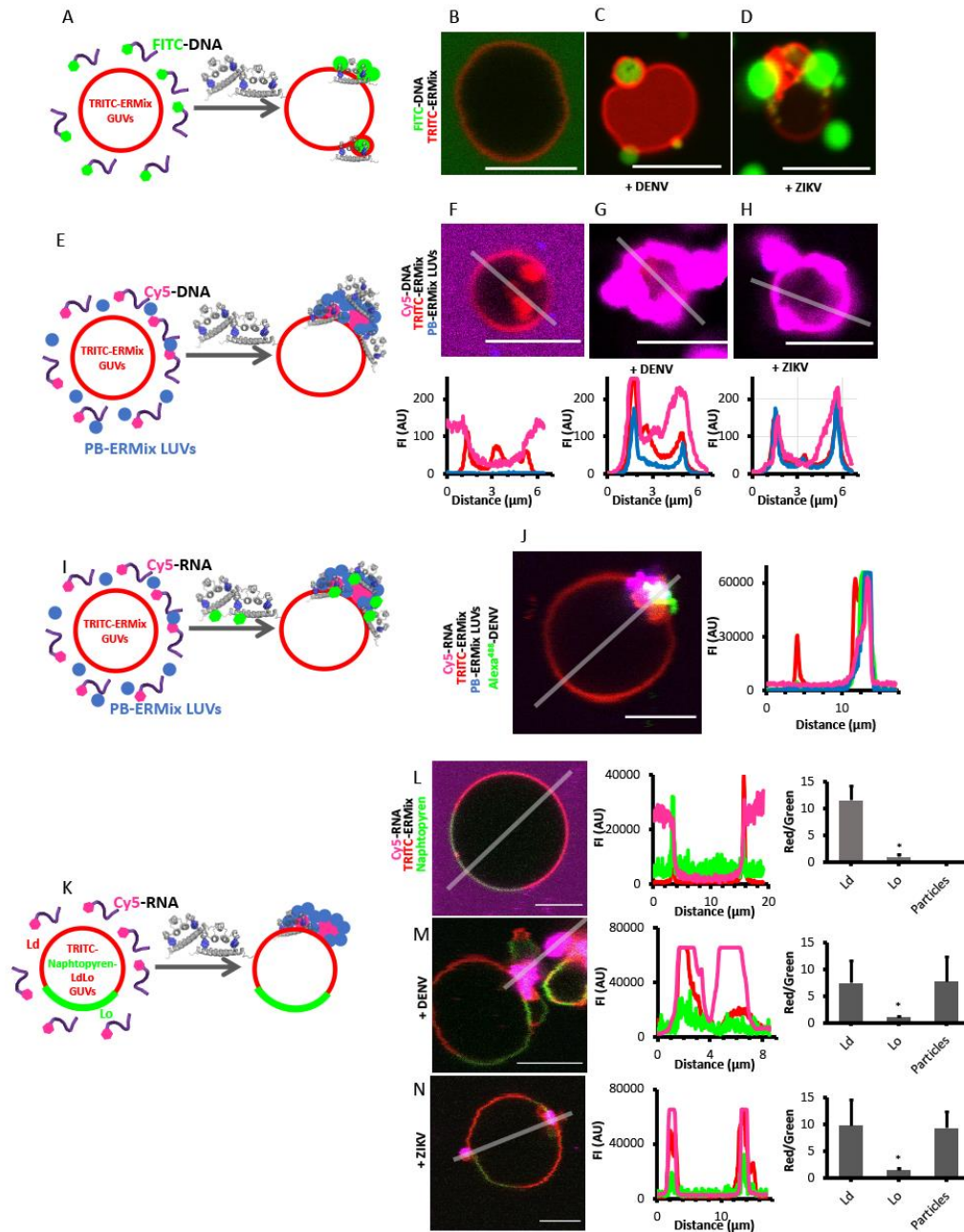


Figura 21. Representación esquemática del reclutamiento de ssADN marcado con FITC en la membrana de GUVs marcadas con TRITC-PE después de la adición de cápside (A). Las imágenes de fluorescencia confocal muestran la superposición de los canales de GUVs marcadas con TRITC-PE (canal rojo) incubadas con FITC-ADN (canal verde) en ausencia (B) o en presencia de cápside de DENV (C) o ZIKV (D). El reclutamiento de oligonucleótidos y liposomas por proteínas en las membranas de las GUVs se muestra en forma de esquema en E. Las imágenes de fluorescencia confocal muestran la superposición de los canales de GUVs marcadas con TRITC-PE (canal rojo) incubadas con ADN Cy5 (canal magenta) y con LUVs

marcados con PB, en ausencia (F) o en presencia de cápside de DENV (G) o ZIKV (H). Los paneles inferiores F–H muestran el perfil de intensidad de fluorescencia de los canales rojo, magenta y azul a lo largo de la línea gris. La proteína de cápside de DENV marcada con Alexa488 también provoca el reclutamiento de oligonucleótidos y LUVs en la membrana de GUVs (I). Imágenes representativas de fluorescencia confocal con superposición de canales de GUVs TRITC-PE (canal rojo) incubadas con Cy5-ADN (canal magenta) y con LUVs marcadas con PB (J) después de la adición de Alexa488-C_{DENV} (canal verde) (J). El panel derecho en J muestra el perfil de IF de los canales rojo, magenta, azul y verde a lo largo de la línea gris. Las proteínas de cápside de DENV y ZIKV reclutan ARN marcado con Cy5 en regiones Ld de la membrana de GUV con fases lipídicas Lo/Ld (K). Imágenes de fluorescencia confocal de GUVs marcadas con TRITC-PE (canal rojo, marcador Ld) y naftopireno (canal verde, marcador Lo) incubadas con Cy5-ADN (canal magenta) antes (L) y después de la adición de proteínas de cápside de DENV (M) o ZIKV (N). Los paneles centrales en L–N muestran el perfil de FI de los canales rojo, magenta y verde a lo largo de la línea gris representada. Los diagramas de barras cuantitativas en los paneles de la derecha de L–N muestran la proporción de FI rojo/verde para las regiones Ld y Lo y en la región de la membrana donde se observan las partículas de ARN Cy5. Algunos perfiles de señal de fluorescencia trazados alcanzan sus valores máximos porque las imágenes se adquieren con exactamente los mismos ajustes que el control. Los resultados provienen de al menos dos experimentos independientes (gráficos cuantitativos que muestran el promedio y las desviaciones estándar donde * indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los valores graficados de la prueba t de Student no pareada), y las imágenes muestran observaciones representativas. La barra de escala en imágenes confocales es de 5 μm . Los datos que se muestran son representativos de 2 a 4 repeticiones independientes.

Para caracterizar mejor el sistema, se marcó también la proteína de cápside. Para lograr esto, fue necesario generar proteína recombinante con un cambio puntual de un aminoácido de modo de incorporar una cisteína, ausente en la secuencia original, para su marcación con un derivado de maleimida. La mutación se incorporó reemplazando la asparagina en la posición 93 de la proteína de cápside de DENV por una cisteína, generando un nuevo plásmido de expresión en bacterias: pET-C_{DV}N93C (ver Materiales y métodos). La proteína se expresó y purificó de forma similar a lo explicado para cápside de ZIKV y se marcó con Alexa488-maleimida. La adición de Alexa488-cysC_{DENV} a la cosuspensión de GUVs, ARN marcado con Cy5 y LUVs marcadas con PB generó el mismo efecto en la interfase de las GUVs, lo que confirma que las proteínas virales gatillan y están contenidas en estos agregados supramoleculares (Figura 21 I, J). Estas observaciones son muy relevantes ya que indican que las proteínas de cápside de DENV y ZIKV son capaces de reclutar espontáneamente ácidos nucleicos y membranas a la interfase de una membrana blanco.

Los fosfolípidos que componen las membranas biológicas son capaces de transicionar de fase bajo ciertas condiciones fisiológicas, lo que implica principalmente cambios en la entropía del sistema (Faller 2021). Las fases resultantes pueden ser líquido desordenada (Ld), caracterizada por un estado altamente fluido y un empaquetamiento irregular de los componentes, o líquido ordenada (Lo) con alto contenido de esteroides que le confieren una gran rigidez. Con el fin de estudiar si existe una preferencia por la composición y el ordenamiento de las membranas, se utilizaron GUVs con dominios de líquido ordenado/desordenado (Lo/Ld). Al incubar las GUVs Lo/Ld con proteína de cápside y ácidos nucleicos, las partículas formadas se localizaron en regiones correspondientes a fases Ld (Figura 21 L-N), lo que sugiere una asociación sitio específica cuando las proteínas reclutan ácidos nucleicos. Estos experimentos en su conjunto sugieren que el proceso involucra una gran cantidad de material agrupado en un punto que es potenciado por la presencia de ácidos nucleicos. Estos agregados son similares a los condensados líquidos reportados para condiciones similares en las que proteínas cargadas positivamente y ácidos nucleicos (cargados negativamente) interactúan (Sing and Perry 2020).

Durante los ensayos, se observó que cuando los ácidos nucleicos interactúan con las proteínas de cápside se genera un aumento en la turbidez de la muestra y se evidencia la presencia de agregados adheridos al vidrio (similar a los observados asociados a GUVs). Con el fin de caracterizar estos agregados, las partículas formadas se observaron en un microscopio de fluorescencia y se detectó una amplia distribución de tamaños (Figura 22 A y B). Las partículas formadas por cápside de DENV interactuando con ADN-Cy5 presentaron un diámetro promedio de 0,87 μm , mientras que las formadas por cápside de ZIKV en las mismas condiciones fueron de 0,77 μm en promedio.

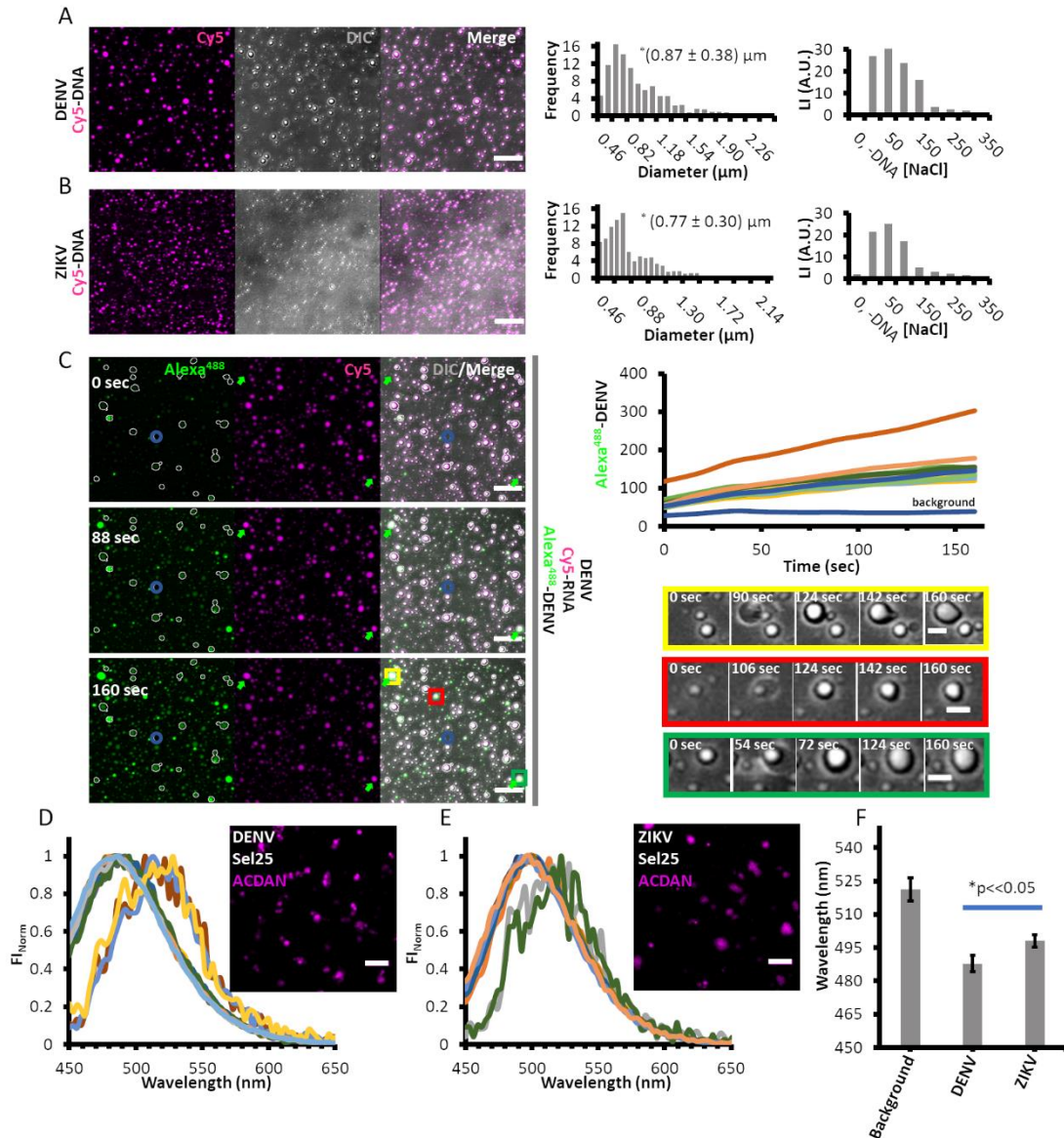


Figura 22. Las proteínas de cápside de DENV y ZIKV se separan en gotas líquidas cuando se unen a oligonucleótidos. Imágenes de fluorescencia confocal de oligonucleótidos de ADN-Cy5 (magenta) incubados con cápside de DENV (A) o ZIKV (B) donde el oligonucleótido marcado colocaliza con las partículas esféricas observadas por contraste por interferencia diferencial (DIC) (canal gris). Los paneles a la derecha de las imágenes muestran los histogramas de distribución de tamaños de las partículas. En el panel derecho de A y B, se representan las mediciones de nefelometría que muestran la intensidad de la luz dispersa en función de la concentración de NaCl cuando cápside de DENV (A) o ZIKV (B) interactúa con ADN. La incubación de C_{DENV} con ARN-Cy5 genera gotas marcadas con Cy5 que son capaces de reclutar Alexa488-cys C_{DENV} inyectada de forma exógena (C), de forma dependiente del tiempo (C, panel derecho). En el panel derecho inferior de C, se muestran ejemplos de formación o fusión de

partículas nuevas en función del tiempo que se señalan en las imágenes de la izquierda con rectángulos amarillos, rojos y verdes. Medición con microscopía de fluorescencia espectral la relajación dipolar del agua utilizando el compuesto ACDAN (D-F). Se observa un desplazamiento espectral hacia el azul para el espectro de emisión de ACDAN cuando colocaliza con partículas formadas por cápside de DENV (D) o ZIKV (E) estabilizadas con ADN con respecto a la solución. El análisis cuantitativo de las imágenes espectrales (F) evidencia una longitud de onda de emisión máxima diferente en cada condición (*background*: sin partículas). Los resultados son de al menos dos experimentos independientes (gráficos cuantitativos que muestran desviaciones promedio y estándar), y las imágenes muestran observaciones representativas. Las barras de escala en las imágenes confocales son de 5 μm (A y C, panel izquierdo; D y E) y 1 μm (C, panel inferior derecho). * en F representa una diferencia estadística significativa entre los valores comparados evaluados con una prueba t de dos muestras asumiendo varianzas iguales ($\alpha = 0.05$). Los datos que se muestran son representativos de 2 a 4 repeticiones independientes.

De acuerdo a su tamaño y forma, estos condensados son similares a las gotas líquidas capaces de autoensamblarse en presencia de ácidos nucleicos, previamente reportadas para otros sistemas (Rhine et al. 2020). Por lo tanto, decidimos explorar el proceso de separación de fase evaluando las propiedades fisicoquímicas de la nueva fase, como su reversibilidad y dinamismo. Por ejemplo, el ensamblado del agregado puede ser revertido aumentando la fuerza iónica del medio. Esto se encuentra representado en los paneles de la derecha de la Figura 22 A y B, en donde a bajas concentraciones de NaCl (<150 mM), la turbidez de las muestras es alta indicando la presencia de partículas que pueden dispersar la luz, mientras que este efecto disminuye en concentraciones mayores de sal. Otra característica de las gotas líquidas es que, una vez formadas, son capaces de reclutar una proteína agregada de forma exógena. Cuando se inyectó Alexa488-cysC_{DENV} a la cámara que contenía partículas ya estabilizadas de C_{DENV}/ARN-Cy5, no solo todas las partículas se marcaron con la versión fluorescente de cápside (Figura 22 C panel derecho arriba), sino que también se observó formación de gotas nuevas o a partir de semillas preexistentes (Figura 22 C panel derecho abajo). Este dinamismo es una característica fundamental de estas entidades que se proponen como reservorios de distintas biomacromoléculas.

Por otro lado, también exploramos si la relajación dipolar del agua en esta fase es diferente comparada con agua sola. Para ello se utilizó el compuesto ACDAN (6-acetil-2-dimetilaminonaftaleno) cuyas propiedades fluorescentes son sensibles a la polaridad del medio (Bagatolli and Stock 2016). En la Figura 22 D y E se observa el cambio en el espectro de fluorescencia de ACDAN en el interior de las partículas de cápside-ADN ya estabilizadas con respecto a la solución, medido por microscopía de fluorescencia espectral. En la figura Figura 22 F se observa un desplazamiento del máximo de emisión de ACDAN, que resultó significativamente diferente entre las partículas formadas con C_{DENV} o C_{ZIKV}, lo que indica una capacidad diferencial entre las proteínas para afectar el agua en las partículas.

Por último, para explorar la termodinámica de la transición de fase líquido-líquido, realizamos mediciones de anisotropía de fluorescencia de los oligonucleótidos marcados con Cy5. Un aumento en la turbidez de la muestra puede originar una disminución en la anisotropía, efecto que podría explicar nuestros resultados. En la Figura 23 se graficó el cambio de anisotropía del oligonucleótido de ARN/ADN-Cy5 al ser titulado con las proteínas de cápside de DENV o ZIKV. Este ensayo permitió calcular parámetros termodinámicos como la constante de asociación y energía libre, y también evaluar la cooperatividad del proceso utilizando la ecuación de Hill. La cuantificación de la formación del complejo ADN/ARN-proteína a medida que se agregaba proteína confirmó que el proceso de agregación es cooperativo, dado que los coeficientes de Hill (n) obtenidos fueron mayores a 1 (Figura 23 C y F). Se obtuvieron constantes de

disociación aparentes K_d del orden de 10^2 nM, y los cálculos de energía libre de las interacciones estimaron que el proceso sería exergónico.

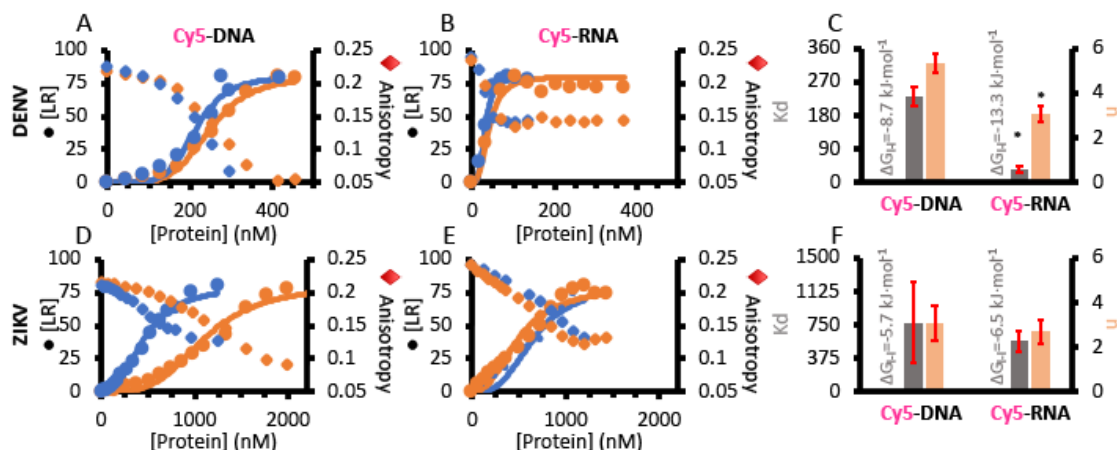


Figura 23. Termodinámica de la interacción de cápside de DENV y ZIKV con oligonucleótidos evaluada por anisotropía de fluorescencia. Concentración del complejo oligonucleótido-proteína ([LR], círculos) y cambios de anisotropía (rombos) de ADN-Cy5 (A y D) y ARN-Cy5 (B y E) en función de la concentración de C_{DENV} (A y B) o C_{ZIKV} (D y E). Los datos azules y naranjas representan diferentes experimentos individuales, y las líneas continuas en A, B, D y E son los datos experimentales que se ajustan a la ecuación de Hill. Los ajustes permiten obtener la constante de disociación, K_d (C y F; barras grises) y el coeficiente de Hill, n (C y F; barras de color marrón claro) para la interacción de Cy5-DNA y Cy5-RNA con las proteínas de cápside de DENV (C) o ZIKV (F). Los resultados que se muestran son dos experimentos independientes (gráficos cuantitativos que muestran el promedio y las desviaciones estándar). * en C representa una diferencia estadística significativa entre los valores comparados evaluados con una prueba t de dos muestras asumiendo varianzas iguales ($\alpha = 0.05$). Los datos mostrados son representativos de 2 a 4 repeticiones independientes.

Discusión Capítulo 1

La formación de las partículas de los Flavivirus es un proceso complejo del cual aún se sabe poco a nivel molecular. La asociación del genoma viral con la proteína de cápside y su interacción con las membranas del RE parecería ser un evento coordinado. Este proceso se inicia con la liberación de cápside de la poliproteína por parte de la proteasa NS2B/NS3. Este corte también da lugar a la gemación de partículas inducida por las proteínas prM-E que se procesan en forma secuencial después del corte por parte de NS2B/NS3 en el citoplasma. El ARN recientemente sintetizado en las proximidades del RE sería primero empaquetado por las proteínas de cápside para luego brotar hacia el lumen del RE incluyendo a las proteínas prM-E insertadas en la membrana (Byk and Gamarnik 2016). Trabajos recientes con el virus de ZIKV sugieren que algunas moléculas de cápside podrían no procesarse por la proteasa y retener al péptido transmembrana (anchor), lo que promovería la oligomerización de cápside sobre la membrana del RE. Este evento podría facilitar la interacción con las regiones transmembrana de prM y E y el consecuente ensamblado de la partícula (Tan, Fibriansah, Kostyuchenko, et al. 2020). De este modo, el interior de la partícula conformaría una fase líquida densa y condensada como resultado de las interacciones mencionadas.

Para comprender cómo se estabiliza esta fase durante los pasos de morfogénesis de partículas, estudiamos la interacción de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV con modelos de membrana que simulan la composición del RE y el efecto de la presencia de ácidos nucleicos. Determinamos que ambas proteínas unen liposomas para

promover el intercambio de membranas, probablemente como producto de eventos de hemifusión. Además, este reclutamiento se observó en simultáneo con la unión de ADN/ARN en la interfase de liposomas gigantes. Las proteínas de cápside asociadas a la membrana son capaces de anclar LUVs y ácidos nucleicos, generando importantes concentraciones locales en la superficie de liposomas gigantes. Los condensados de proteína, ácidos nucleicos y lípidos se localizaron en los dominios de líquido desordenado de los GUVs, lo que demostró que existiría un estado preferencial de la interfaz lipídica para la formación de partículas. Además, describimos cómo las proteínas de cápside de DENV y ZIKV son capaces de separarse de fase al unirse a ácidos nucleicos. Determinamos que la nueva fase posee forma de gota y que es capaz de reclutar moléculas exógenas como proteína de cápside de DENV marcada o ácidos nucleicos. Al analizar el nivel de relajación dipolar del agua con el compuesto ACDAN, observamos una leve diferencia espectral dentro de las gotas líquidas formadas por DENV o ZIKV. La magnitud de la relajación del agua censada por ACDAN en el caso de DENV fue menor con respecto a ZIKV. Estas diferencias pueden deberse a diferencias estructurales entre ambas proteínas de cápside (Ma et al. 2004; Shang et al. 2018) que podrían tener un impacto en su capacidad de acomodar las moléculas de agua. La proteína de cápside de ZIKV parecería ser más flexible que la proteína de DENV, lo que podría influenciar la relajación dipolar del agua adentro de las gotas líquidas. Por otro lado, las características termodinámicas de la transición líquido-líquido muestran que es un proceso espontáneo y muy cooperativo, donde se observa una interacción muy fuerte con los oligonucleótidos (en el orden de 10^{-10} nM).

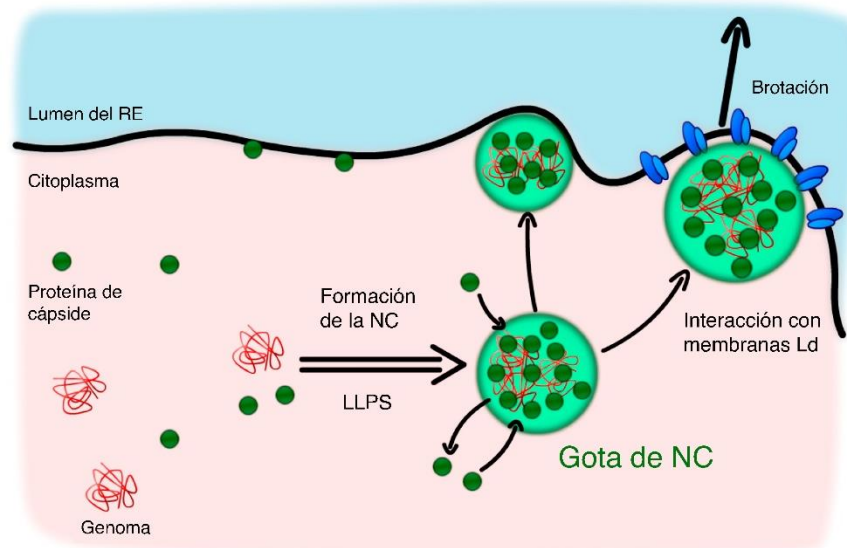


Figura 24. Representación esquemática de un modelo de encapsidación, en el que estaría involucrado un proceso de separación de fases líquido-líquido (LLPS). La interacción entre la proteína de la cápside (círculos verdes) y el genoma viral (rojo) da como resultado una transición de fase líquido-líquido para formar la NC (gota verde clara). Estas gotas se asocian con las membranas del RE durante la formación de partículas virales, lo que estabiliza la interacción NC-membrana para que las partículas virales broten en la luz del RE.

En su conjunto, los experimentos realizados proveen información sobre las propiedades fisicoquímicas de los complejos formados por membranas, proteínas virales y ácidos nucleicos, lo que nos permitió proponer un modelo en el que serían centrales los eventos de formación de gotas líquidas y de anclaje a membranas (Figura 24). En este contexto, el proceso de encapsidación viral no sería resultado solo de interacciones moleculares, sino de la emergencia de una nueva fase líquida que podría explicar aspectos

importantes de la formación de complejos supramoleculares. Este fenómeno ha sido observado previamente en virus como Influenza A (Alenquer et al. 2019) o SARS-CoV-2 (Iserman et al. 2020) en los cuales las nucleoproteínas virales tendrían un rol en el empaquetamiento de los genomas de ARN. Además, se ha observado en infecciones virales que los compartimentos de replicación podrían ser producto de LLPS, lo cual podría ser gatillado por conjuntos de proteínas virales que contienen IDRs (Heinrich et al. 2018; Nikolic et al. 2017; Zhou et al. 2023).

Es posible proponer funciones para la emergencia de una nueva fase en el proceso de formación de partículas. Dado que cápside tiene el rol de proteger la integridad del genoma viral, la separación de fases podría contribuir a la exclusión de factores celulares que podrían comprometer esta estabilidad. El hecho de que la actividad del agua es diferente en esta nueva fase podría traer como consecuencia una disminución de la degradación enzimática dependiente de agua, como las ARNasas hidrolíticas (Ding, Qin, and Chen 2016; Ilinskaya and Shah Mahmud 2014). Por lo tanto, comprender en profundidad la capacidad de cápside de unir membranas y reclutar ácidos nucleicos a la interfase lipídica en una nueva fase, podría abrir un abanico de nuevos blancos para impedir la formación de partículas virales. En este sentido, el desarrollo de nuevas terapias antivirales podría orientarse en el impedimento de la asociación de cápside con el RE o con el ARN y la formación de gotas líquidas. Perturbar los procesos dependientes de LLPS podría interferir incluso con la replicación viral, lo que confiere un gran potencial a posibles moduladores del proceso como agentes antivirales de amplio espectro (Li et al. 2022).

Los resultados presentados en este capítulo son parte del trabajo *“Dengue and Zika virus capsid proteins bind to membranes and self-assemble into liquid droplets with nucleic acids”* publicado en la revista JBC en el año 2021.

Capítulo 2: Estudio de la distribución subcelular de la proteína de cápside de ZIKV durante la infección viral.

Introducción

Trabajos previamente publicados indican que las proteínas de cápside de DENV y WNV se localizan en distintos compartimentos celulares durante la infección. Se ha demostrado que estas proteínas se distribuyen subcelularmente entre el citoplasma, la superficie de LDs, las membranas del RE y los nucleolos (Bhuvanankantham et al. 2009; Bulich and Aaskov 1992; Netsawang et al. 2010; Samsa et al. 2009; Sangiambut et al. 2008; Wang et al. 2002). En este capítulo generamos herramientas propias para estudiar la distribución de la proteína de cápside de ZIKV durante el proceso de infección, analizamos los determinantes moleculares asociados a esta distribución y realizamos un estudio comparativo entre las proteínas de cápside del DENV y de ZIKV.

A partir de un alineamiento de las secuencias codificantes y de la comparación estructural de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV, podemos observar que a pesar de la baja identidad aminoacídica (37%), tienen características estructurales conservadas. En la Figura 25 A se encuentra un alineamiento de las secuencias de estas dos proteínas, indicando los cuatro dominios alfa hélice de acuerdo a las estructuras determinadas por cristalografía de rayos X (Shang et al. 2018; Xia et al. 2020) (Figura 25 B y C).

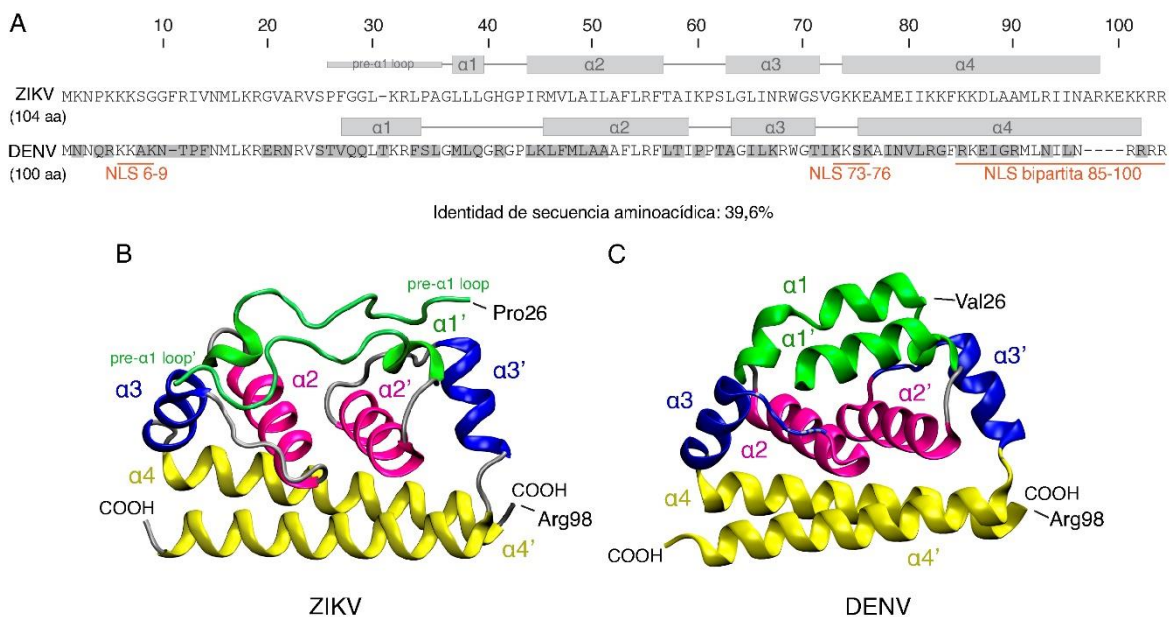


Figura 25. A: Alineamiento aminoacídico entre las proteínas de cápside de DENV y ZIKV. Se encuentran resaltadas las diferencias en la secuencia de DENV. Por encima de cada secuencia se encuentra la estructura secundaria correspondiente, representada con recuadros grises. En naranja se indican las NLS descritas para DENV. Representación de las estructuras cristalográficas de cápside de ZIKV (B) y DENV (C) (Shang et al. 2018; Xia et al. 2020). Se indican con colores las alfa hélices de cada monómero. Los residuos presentes en los extremos N- y C- terminal de las estructuras cristalográficas resueltas de las proteínas se encuentran señalados. En ambos casos, los primeros 25 aminoácidos no lograron ser resueltos.

Las diferencias más notorias se observan en la región correspondiente a la hélice α 1 de cápside de DENV, que en ZIKV se encuentra como un "loop" desordenado seguido de una hélice muy corta (Figura 25 B y C, hélices representadas en verde). Por otro lado,

la proteína de cápside de ZIKV contiene 4 residuos más que la proteína de DENV. Al respecto, se observa una inserción cerca del extremo C-terminal, previo al sitio de corte de la proteasa viral, donde existe una conservación de los cuatro residuos básicos requeridos para el reconocimiento de NS2B-NS3. Análisis comparativos entre las estructuras de DENV, WNV y ZIKV señalan que la proteína de cápside de ZIKV contiene una mayor superficie de contacto entre monómeros, en parte debido a la interacción y estabilización mutua entre sus pre- $\alpha 1$ loops, lo que resulta en un dímero muy estable (Shang et al. 2018). Esta característica podría alterar su capacidad y forma de unión a membranas biológicas debido a la menor exposición de sus regiones hidrofóbicas.

En relación a la localización nuclear, los estudios realizados empleando a la proteína de cápside del DENV señalan al menos tres regiones no redundantes que podrían ser responsables del transporte al núcleo (indicadas en naranja en la Figura 25 A). Las tres señales descriptas son: ${}^6\text{KKAR}_9$, ${}^{73}\text{KKSK}_{76}$, y el motivo bipartito ${}^{85}\text{RKEIGRMLNILNRRRR}_{100}$ (Bulich and Aaskov 1992; Sangiambut et al. 2008; Wang et al. 2002), cuya principal característica es la presencia de residuos básicos en tándem, expuestos al solvente. Estos estudios sugieren que el mecanismo de entrada de cápside al núcleo sería por transporte activo y que no es necesaria la presencia de otras proteínas virales para su acumulación en los nucleolos (Wang et al. 2002). Se han llevado a cabo estudios de mutagénesis sobre residuos individuales que, además de lograr abolir la localización nuclear, se ven acompañados por una disminución en la replicación o propagación viral (Sangiambut et al. 2008). Esto sugiere que cápside podría estar ejerciendo alguna función en los nucleolos con impacto en la infección viral.

En relación a la localización de cápside de DENV en los LDs, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran una acumulación progresiva de la proteína en la superficie de estas organelas formando anillos. Como se mencionó en la introducción general, los determinantes moleculares responsables de la asociación de cápside a los LDs fueron identificados en el dominio de la hélice $\alpha 2$. La generación de virus con sustituciones en esta región hidrofóbica permitió la identificación de los residuos L50 y L54 como determinantes para la acumulación de cápside en LDs. Virus recombinantes con mutaciones puntuales en estos residuos mostraron un defecto en la producción de partículas virales, indicando un rol importante de la asociación de cápside a los LDs en dicho proceso (Samsa et al. 2009).

En el comienzo de este trabajo de tesis, no existían herramientas para el estudio de las distintas proteínas de ZIKV y se desconocía la distribución y movilización de la proteína de cápside durante la infección. En este capítulo se presentan los resultados de la generación de herramientas para la detección de esta proteína en células infectadas, y la identificación de determinantes moleculares para su localización.

Resultados

Obtención de anticuerpos específicos contra cápside de ZIKV

En el capítulo anterior se detalló el proceso de clonado, expresión y purificación de la proteína de cápside recombinante producida en bacterias para la realización de estudios bioquímicos. Con el objetivo de detectar a la proteína de cápside en células infectadas mediante ensayos de inmunofluorescencia, y para la detección de la proteína por medio de *western blot*, se generaron anticuerpos policlonales en ratón y conejo. Se realizó un seguimiento de los animales inmunizados y se seleccionaron los tiempos y animales que mostraron inmunidad contra la proteína viral. Los sueros policlonales obtenidos en ambas especies reconocieron específicamente a la proteína de cápside de ZIKV, sin reaccionar con la proteína homóloga de DENV. En la Figura 26 se muestran, a modo de

ejemplo, ensayos de *western blot* e inmunofluorescencia de células infectadas con los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo.

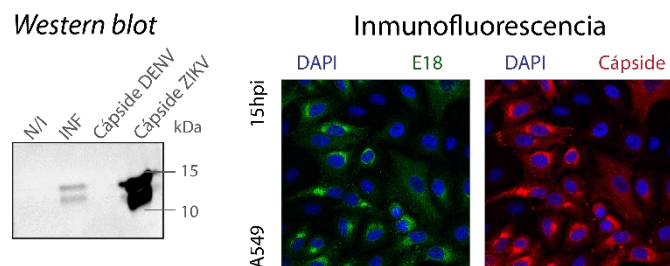


Figura 26. Evaluación de los anticuerpos policlonales de conejo contra cápside de ZIKV. Se muestra un *western blot* empleando una muestra proveniente de lisados de células infectadas con ZIKV y proteína de cápside obtenida en forma recombinante (izquierda). A la derecha se muestran imágenes de inmunofluorescencias de células A549 infectadas. N/I: no infectado, INF: infectado. E18: marca de la proteína viral de envoltura en verde. DAPI: marcación de núcleos en azul. Marcación específica de cápside en rojo.

Una vez generada esta nueva herramienta, los sueros fueron utilizados para los estudios que se detallan a continuación.

Caracterización de la distribución subcelular de cápside de ZIKV durante la infección

Con el fin de describir la distribución subcelular de la proteína de cápside durante la infección viral se llevaron a cabo infecciones con aislamientos epidémicos y no epidémicos del virus de Zika tanto en células de mamífero como de mosquito. La multiplicidad de infección (MOI) utilizada fue alta ($MOI > 2$) y se monitoreó la infección hasta observar un efecto citopático leve. Las infecciones fueron cosechadas entre las 16 y las 24 horas post infección (hpi) con el objetivo de obtener un 80%-90% de células infectadas conservando la integridad de las estructuras subcelulares y evitando la muerte celular. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando marcadores de organelas celulares y los anticuerpos específicos generados contra cápside. El marcador utilizado para evidenciar los nucleolos fue un anticuerpo contra nucleofosmina/B23, una proteína nucleolar involucrada en la biogénesis de ribosomas. En el caso del RE, se seleccionó la proteína calreticulina, responsable del control de calidad de proteínas del RE como marcadora de esta organela. Los LDs se marcaron con BODIPY, un compuesto fluorescente no polar capaz de unirse a lípidos neutros, y con un anticuerpo contra la proteína ADRP (o Perilipin-2) que rodea a los LD en forma de anillos en su superficie y participa en su biogénesis.

En células humanas A549 la proteína de cápside de ZIKV, se localizó principalmente en nucleolos, RE y LDs (Figura 27). Esta observación muestra similitudes con la proteína de cápside de dengue.

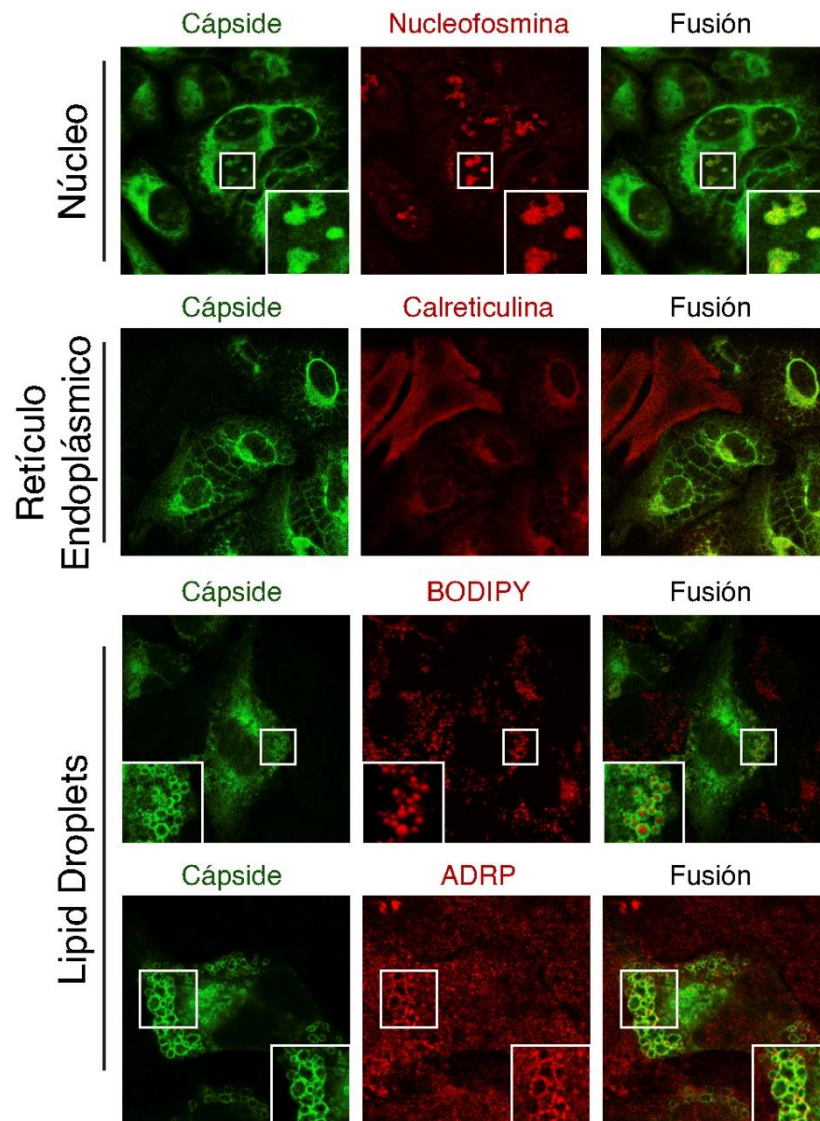


Figura 27. Distribución subcelular de la proteína de cápside en células infectadas con ZIKV, MOI=5. Inmunofluorescencia de células A549 con anticuerpos policlonales anti cápside hechos en conejo (verde) y distintos marcadores de organelas (rojo). La imagen marcada con nucleofosmina corresponde a 24 hpi, mientras que las imágenes marcadas con calreticulina, BODIPY y ADRP corresponden a 16 hpi. Nucleofosmina: marcador de nucleolos (B23). Calreticulina: marcador de RE. *Lipid droplets* marcados con el marcador lipídico BODIPY (primer panel) o ADRP (proteína de superficie de LDs). Objetivo: 63x.

Observamos que la proteína colocaliza con nucleofosmina en los nucleolos celulares, y con calreticulina, en el RE. Además, se localizó formando anillos alrededor de los LDs (marcados con BODIPY), de forma similar a la proteína ADRP. En células de mosquito C6/36 también se observó una distribución en forma de anillos alrededor del marcador de LDs (Figura 28). El anticuerpo monoclonal contra nucleofosmina humano no reconoce la proteína homóloga de mosquito, por lo cual no se dispuso de un marcador nucleolar en células de mosquito, aunque fue posible observar marcación de cápside dentro del núcleo en una fracción de las células de mosquito infectadas. Esto puede

deberse a que en células de mosquito la localización nuclear es menos frecuente que en células humanas, o a la dificultad técnica de la observación.

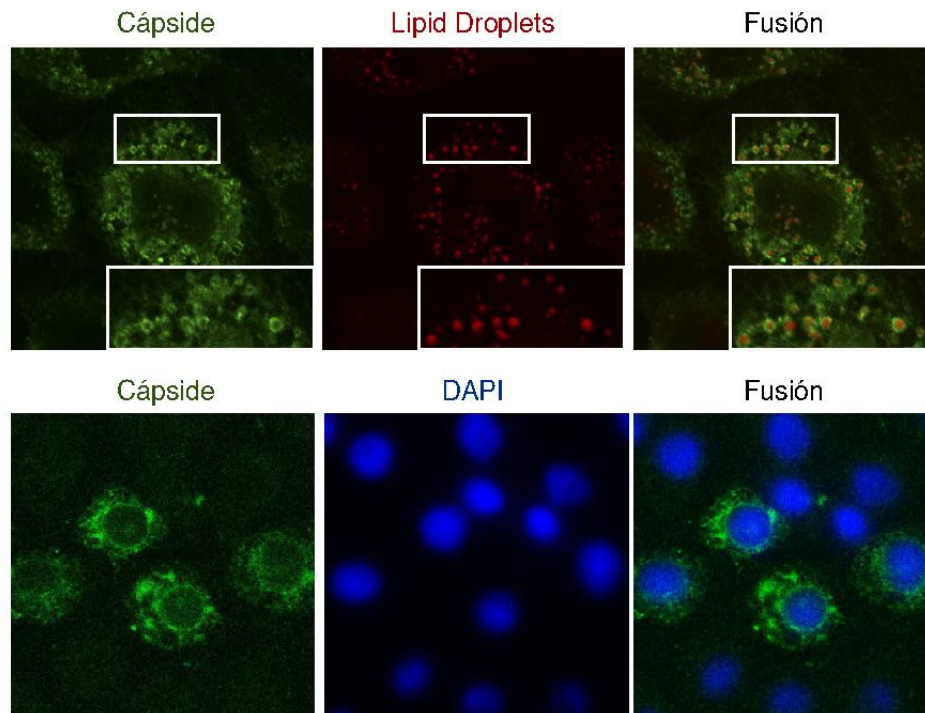


Figura 28. Inmunofluorescencia de células de mosquito C6/36 infectadas con ZIKV a 48 hpi, MOI=2, marcada con anticuerpos policlonales anti cápside hechos en conejo (verde), BODIPY como marcador de LDs (rojo) y DAPI como marcador de núcleo. Se observa la presencia de cápside en LDs y núcleo de células de mosquito. Arriba: objetivo 100x. Abajo: objetivo 63X.

Es importante señalar el particular efecto citopático observado en la infección con ZIKV, que incluye una gran vacuolización de la célula y una desorganización profunda del RE. En la Figura 27 se puede observar, en los paneles con marca de calreticulina, cómo las células infectadas presentan un aspecto vacuolado y un citoplasma reducido en comparación con las células sin infectar (células rojas). Además, se observó que, a medida que progresa la infección, la marca de nucleofosmina comienza a perderse en las células infectadas, lo que sugeriría una desorganización de la estructura interna del núcleo producto de la infección. Estos efectos se comienzan a observar a partir de las 20-24 horas post infección y el efecto citopático progresa rápidamente hasta las 30-48 horas post infección, donde comienza a observarse muerte celular de forma generalizada.

Al comparar la cinética de la infección de ZIKV con infecciones de las mismas células humanas con el virus de DENV, se observó una diferencia marcada entre ambos virus en la distribución de la proteína de cápside en cada etapa de la infección. En tiempos tempranos (6-10 hpi) la proteína de cápside de ZIKV se localiza principalmente en citoplasma y LDs y posteriormente, en etapas medias-tardías de la infección (10-20 hpi) se detecta también en RE y nucleolos. La proteína de cápside de DENV posee una cinética de acumulación diferente, siendo detectada tempranamente en nucleolos y posteriormente en RE y LDs (Figura 29). Estas diferencias sugieren que las proteínas de cápside de DENV y ZIKV podrían tener propiedades particulares que les confieren la capacidad de interactuar de forma diferencial con los componentes celulares durante la infección con estos dos virus. Es posible que incluso ejerzan funciones diferentes durante el establecimiento de la infección en células humanas.

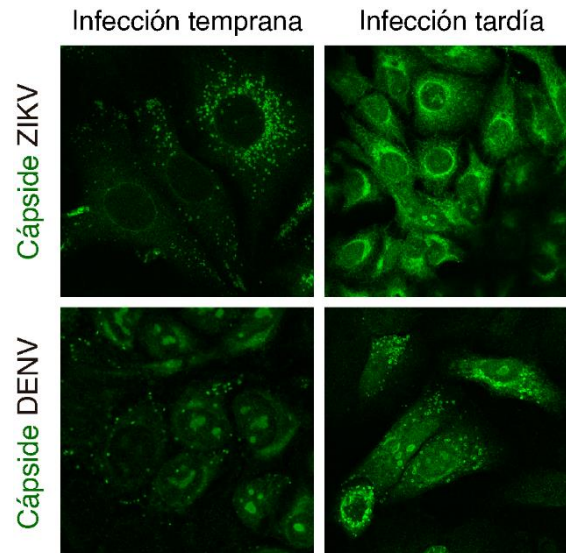


Figura 29. Inmunofluorescencia de células A549 infectadas con ZIKV o DENV (MOI=2) reveladas con anticuerpos específicos anti proteína de cápside hechos en conejo (verde) a tiempos tempranos (6-10 hpi) o medios-tardíos (10-20 hpi) de la infección. Se observa una diferencia en la cinética de acumulación de cápside en los distintos compartimentos entre los virus. Objetivo: 63x.

Con el fin de confirmar las observaciones sobre la distribución subcelular de la proteína de cápside del ZIKV, se realizaron ensayos de fraccionamiento de células humanas A549 infectadas con ZIKV a distintos tiempos post infección. Las fracciones fueron separadas secuencialmente utilizando *buffers* de extracción de distinta composición (QProteome cell compartment kit, QIAGEN, ver Materiales y métodos). Así, se detectó la proteína de cápside asociada a cuatro fracciones diferentes: citoplasma, membranas, núcleo y citoesqueleto. Los lisados de cada fracción se analizaron por *western blot* y se utilizaron marcadores específicos como control del fraccionamiento. Como marcador de citoplasma se utilizaron anticuerpos contra la proteína de la glucólisis GAPDH. Para la fracción de membranas se utilizaron anticuerpos contra la chaperona Calnexina, residente del RE, y para la fracción nuclear se detectó la histona H3.

De acuerdo con lo observado por inmunofluorescencia, fue posible detectar a la proteína de cápside en la fracción citoplasmática (asociada al menos en parte a LDs), de membranas (RE) y nuclear (nucleolo) desde las 10 hpi en adelante (Figura 30). Entre las 15 y las 24 hpi se puede observar un cambio en la abundancia relativa de cápside entre la fracción de membranas y la nuclear, en concordancia con lo observado en la Figura 29.

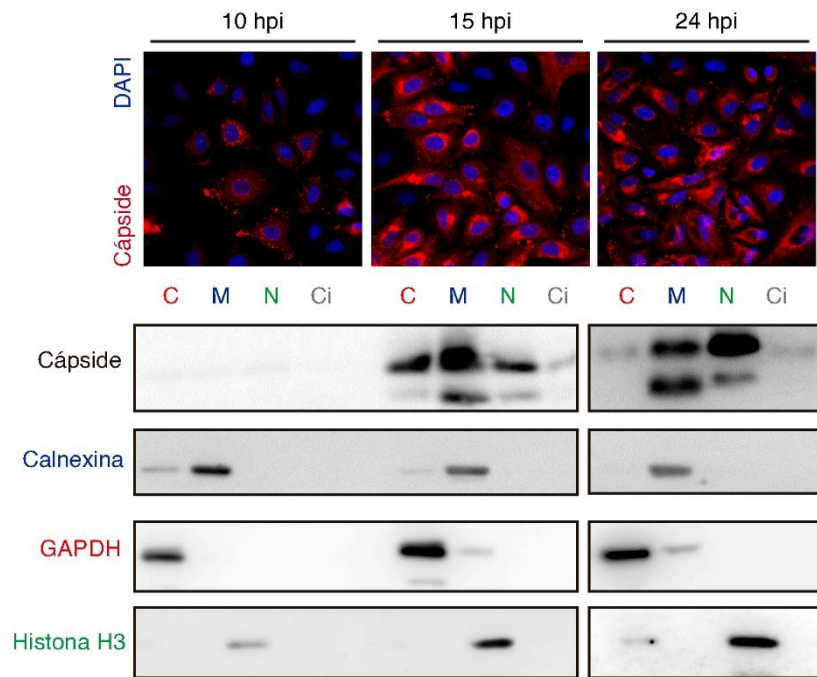


Figura 30. Fraccionamiento subcelular de células infectadas con ZIKV, MOI=5. Arriba: inmunofluorescencia de células A549 infectadas, reveladas con anticuerpos anti cápside de ZIKV (rojo) de los tiempos seleccionados para el fraccionamiento. Los núcleos se encuentran marcados con DAPI (azul). Objetivo: 20x. Abajo: *western blot* de fracciones citoplasmática (C), de membranas (M), nuclear (N) y de citoesqueleto (Ci) con anticuerpos anti cápside y marcadores de cada fracción. Se observa la acumulación de cápside en citoplasma (LD), núcleo (nucléolos) y membranas (RE).

Determinantes moleculares de la localización nuclear de la proteína de cápside de ZIKV

Con el objetivo de estudiar los determinantes moleculares de la localización nuclear de la proteína de cápside de ZIKV, se realizó un análisis bioinformático de las posibles señales de localización nuclear (NLS) de la proteína. En general, las NLS consisten en una o más series cortas de aminoácidos cargados positivamente expuestos a la superficie de la proteína (Kosugi et al. 2009). Los predictores utilizados (Prosite, NLStradamus, PsortII, NucPred y RostLab, disponibles en línea) arrojaron resultados variados que coincidieron en la predicción de señales dentro de la hélice $\alpha 4$. Dichas predicciones incluyen una señal bipartita que abarcaría los aminoácidos 82-99 y otra señal que incluiría los aminoácidos 101-104 de la proteína de cápside. A diferencia de DENV, los predictores no encontraron señales en el extremo N-terminal de la proteína. En la Figura 31 se indican, debajo de la secuencia completa, las señales encontradas en la secuencia aminoacídica de cápside. En base a este análisis, decidimos evaluar la funcionalidad de estas posibles señales en la proteína de cápside de ZIKV.

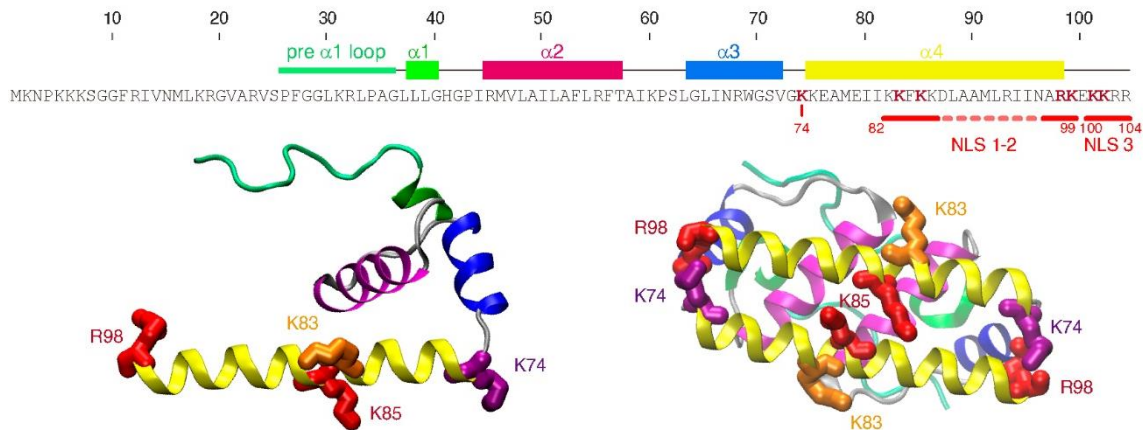


Figura 31. Secuencia aminoacídica completa de cápside de ZIKV. Arriba de la secuencia se representan con rectángulos de colores las regiones estructuradas de la proteína (alfa hélices). Las NLS predichas se indican con líneas en naranja (NLS 1-2, NLS 3). Los aminoácidos elegidos para generar las mutaciones se encuentran en rojo. Abajo, se esquematiza la estructura cristalográfica de la proteína (PDB: 5YGH) en forma de monómero para facilitar su visualización (izquierda) o dímero (derecha) y los residuos relevantes en rojo, naranja y violeta, pertenecientes a NLS 1-2. Es importante aclarar que los residuos que conforman a la NLS 3 no se encuentran resueltos en la estructura cristalográfica.

En nuestro laboratorio se construyó un clon infeccioso de un aislamiento epidémico del virus de ZIKV (Pallarés et al. 2020). Este clon infeccioso fue generado a partir de un aislamiento del virus proveniente de un paciente argentino. La secuencia completa de este virus fue amplificada y ensamblado en un plásmido bajo un promotor de la polimerasa T7 de ARN. Una reacción de transcripción *in vitro* a partir de este molde permite generar una molécula de ARN de 10807 bases que contiene al genoma completo del virus. El clon infeccioso constituye una poderosa herramienta que permite realizar estudios de mutagénesis en posiciones definidas del genoma, y analizarlas en el contexto de una infección con el virus completo. De este modo, con el fin de estudiar los determinantes aminoacídicos de la localización nuclear de la proteína de cápside, diseñamos mutantes en el clon infeccioso de ZIKV en el cual se sustituyeron los residuos involucrados en las señales predichas. Se abordó una estrategia amplia, abarcando las dos regiones de la potencial señal bipartita (que denominamos NLS 1 y NLS 2) y la región terminal (que denominamos NLS 3) (Figura 31). Dentro de la señal NLS 1, se encuentra la secuencia ⁸²KKFKK⁸⁶ que muestra similitud con un motivo presente en la proteína viral NS5 (KRFRR) que fue descrito previamente como NLS de esta proteína en DENV (Tay et al. 2016), por lo que constituye un candidato interesante a evaluar. Para el diseño de las mutaciones de NLS 1 ⁸²KKFKK⁸⁶, se empleó la estructura cristalográfica disponible de cápside y se evaluaron los residuos más expuestos al solvente que no participaran de interacciones con otros residuos en la hélice α_4 (esto se puede observar en la Figura 31). De esta forma se seleccionaron los aminoácidos K83 y K85 para realizar las substituciones (Tabla 1). En relación a la región NLS 2, se mutaron los residuos básicos 98-99 que constituyen el final de la hélice α_4 , también expuestos al solvente. En la región NLS 3, por otra parte, diseñamos la mutación de los aminoácidos 101-102 tomando en consideración que en este lugar (¹⁰¹KKRR¹⁰⁴) se encuentra la señal de reconocimiento de la proteasa NS2B-NS3 para el clivaje y liberación de cápside. Los sitios de clivaje de la proteasa viral en otras regiones del genoma están constituidos por una glicina seguida de aminoácidos básicos. Por lo tanto, con el objetivo de modificar los residuos básicos y conservar lo mejor posible el sitio de clivaje, decidimos generar la mutación K101SK102G (Tabla 1). En base a resultados no publicados del laboratorio en los que se identificó el residuo K73 de DENV como importante para la localización nuclear (previamente identificado como parte de una NLS, Figura 25), con el fin de evaluar la conservación de la función en esta posición,

incorporamos una sustitución de KxS en la posición homóloga en la secuencia de ZIKV (K74), (Figura 31 y Tabla 1). Por último, diseñamos un virus mutante que incluye la combinación de las sustituciones mencionadas previamente, con el objetivo de evaluar la redundancia de las señales predichas (mutante combinada, Tabla 1).

Tabla 1. Cambios aminoacídicos introducidos en las NLS predichas en la secuencia de la proteína de cápside. Las mutaciones fueron incorporadas en el clon infeccioso de ZIKV.

Virus mutante	Modificaciones aminoacídicas
NLS 1	K83 → S + K85 → A
NLS 2	R98 → S + K99 → A
NLS 3	K101 → S + K102 → G
K74S	K74 → S
Combinada	K74 → S + K83 → S + K85 → A + R98 → S + K99 → A + K101 → S + K102 → G

Las mutantes diseñadas fueron incorporadas al clon infeccioso de ZIKV mediante PCR por solapamiento y clonado por restricción (ver Materiales y métodos). La incorporación de las mutaciones fue confirmada por secuenciación en todos los casos. A partir de los plásmidos de las respectivas mutantes se obtuvieron los ARN virales por transcripción *in vitro* con polimerasa T7, reacción en la cual se les incorporó un análogo de CAP para la traducción. Se transfectó el ARN infeccioso de los virus mutantes y el virus *wild type* (WT) en una primera instancia en células de mosquito C6/36 y se evaluó la progresión de la infección por inmunofluorescencia en función del tiempo (Figura 32). En base a este análisis, pudimos observar que las mutantes NLS 1 y NLS 2 presentaron un retraso en la propagación viral con respecto al virus WT, que no fue significativo por este método en el caso de la mutante NLS 3, ni en la mutante K74S. En el caso de la mutante combinada, no fue posible observar células positivas para el antígeno viral hasta los 6 días post transfección, evidenciando que este número de mutaciones en cápside no pudo ser tolerado, resultando en un ARN no infeccioso. Con el fin de evaluar la localización de la proteína de cápside, se obtuvieron *stocks* virales que fueron cosechados cuando el 90-100% de la monocapa se encontraba infectada.

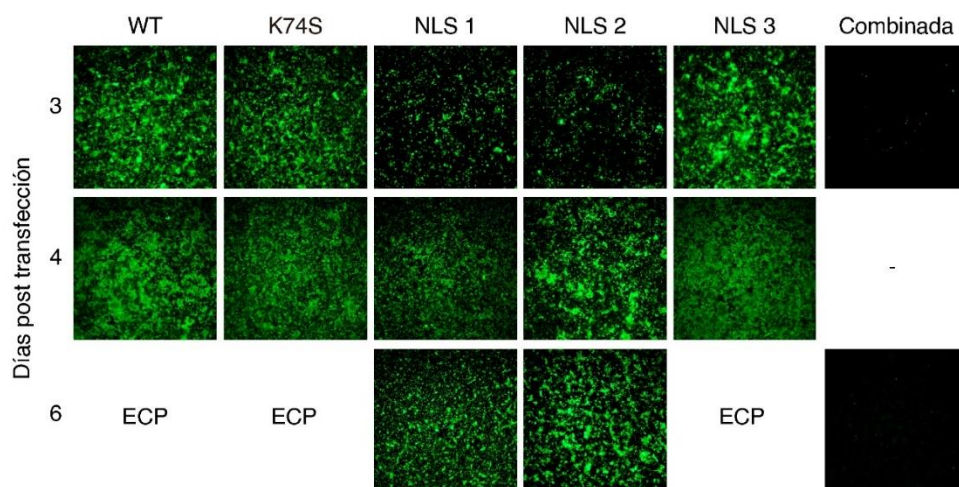


Figura 32. Inmunofluorescencia de células C6/36 transfectadas con el ARN de ZIKV WT y de los virus con mutaciones en las NLS predichas. En verde se encuentra la proteína viral NS3. Se observa la aparición de células positivas y la progresión de la infección. Para el caso de NLS 1 y 2, se observa un retraso en la infección. El virus con las mutaciones combinadas no evidencia células positivas. ECP: efecto citopático. Objetivo: 20x.

A partir de los *stocks* generados en células de mosquito, se infectaron células humanas A549 y, luego de 24 horas post infección, se realizaron inmunofluorescencias de las células utilizando un anticuerpo anti cápside de ZIKV y un marcador de nucleolo con el fin de evaluar la presencia o ausencia de cápside en los nucleolos. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de cápside en nucleolo en el virus WT, que fue indistinguible del virus mutante K74S. Sin embargo, en el caso de las mutantes NLS 1-2-3 se observaron diferencias evidentes en la localización de cápside al compararlo con el virus WT (Figura 33, izquierda). Se tomaron imágenes de 6 campos de cada una de las infecciones y se cuantificó la cantidad de células que presentaron localización nuclear de cápside sobre el total de células infectadas. El análisis de las imágenes demostró que las 3 mutantes disminuyen significativamente la localización de cápside de ZIKV en el nucleolo de forma considerable (Figura 33, derecha).

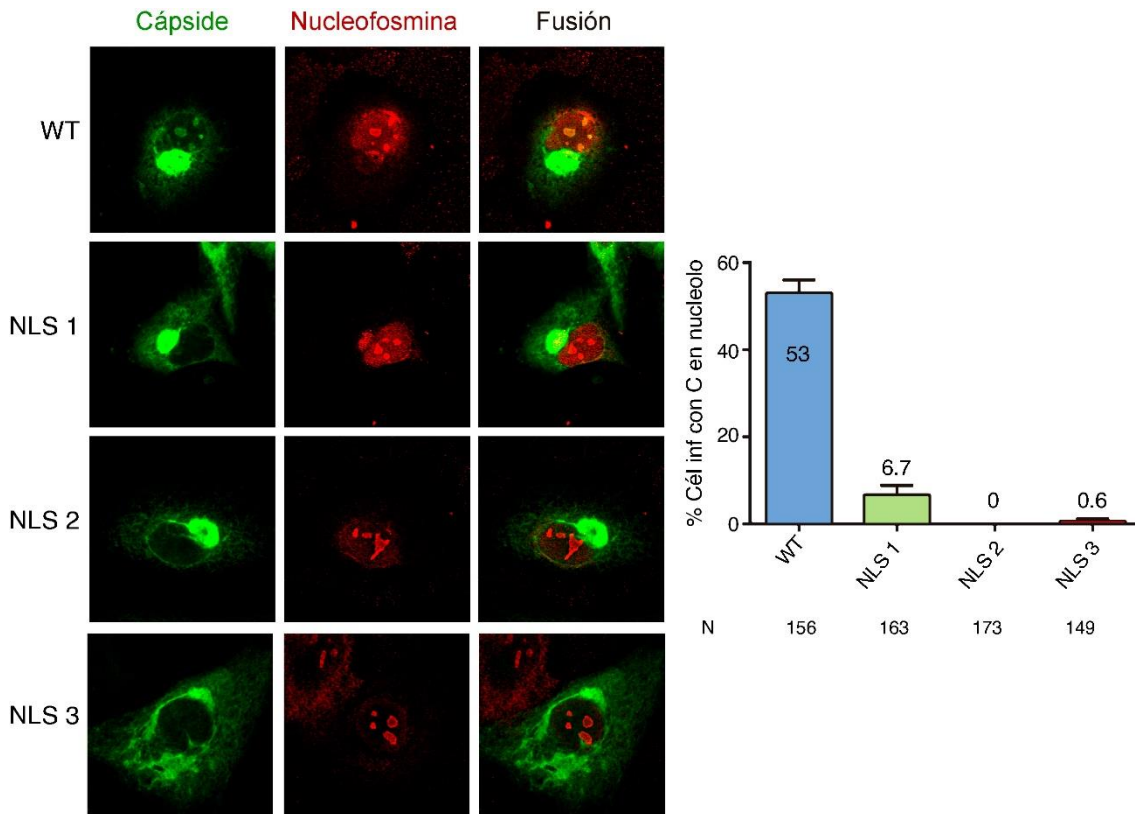


Figura 33. Inmunofluorescencia de células A549 infectadas con virus WT o mutantes (MOI=2) a 24 hpi. Se marcó en verde a la proteína de cápside y en rojo al marcador de nucleolo nucleofosmina. Objetivo: 63X. A la derecha se encuentra la cuantificación del porcentaje de células infectadas con localización nuclear de cápside. Las barras corresponden a los desvíos estándar. N: número total de células infectadas analizadas. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indican que existen al menos 3 señales importantes para la localización nuclear no redundantes, y que la mutación de cada una en forma independiente es suficiente para afectar dicha localización en células humanas infectadas. A fin de evaluar con mayor detalle las propiedades de un virus con defectos en la localización nuclear de cápside, elegimos a la mutante NLS 1 como modelo.

Primero, se analizó la cinética de replicación de la mutante NLS 1 en células humanas empleando curvas de crecimiento. Con este fin, se evaluó la amplificación del genoma viral por qPCR y la cantidad de partículas infectivas liberadas al sobrenadante por titulación en función del tiempo de la infección. Debido a que la cuantificación de partículas infectivas se realizó por medio de la formación de placas de lisis, pudimos observar el tamaño de las placas como una característica fenotípica diferencial. Al respecto, las placas de la mutante NLS1 mostraron un menor tamaño que las del virus

WT (Figura 34), lo que sugiere algún defecto en la mutante en la replicación o propagación viral.

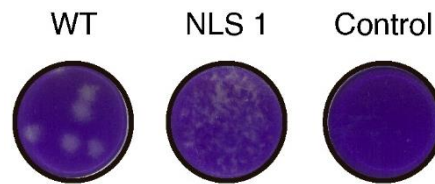


Figura 34. Imágenes representativas de un ensayo de placas de lisis para el virus mutante NLS 1 y el virus WT. Se observa un tamaño menor de placas de lisis en el virus mutante con respecto al virus WT. El control corresponde a un pocillo sin infectar.

En relación a la acumulación del genoma viral adentro de la célula en función del tiempo de la infección, observamos que la mutante NLS 1 mostró niveles de ARN viral similares a los del virus WT (Figura 35). Por otro lado, evaluamos las partículas liberadas al sobrenadante en cada punto para cuantificar el proceso de salida. Este análisis indicó una marcada diferencia entre la mutante y el WT, con una disminución en la liberación de partículas de la mutante de casi 1000 veces (Figura 35). Estos resultados indican que la mutante en la NLS 1 presenta un defecto ya sea en la encapsidación o en el proceso de infección, sugiriendo un rol de la localización de cápside en el núcleo en esos procesos, o alternatively una superposición de funciones. Esto último es particularmente relevante porque tanto la función de localización nuclear como el empaquetamiento de ARN viral requiere de residuos básicos en la proteína de cápside.

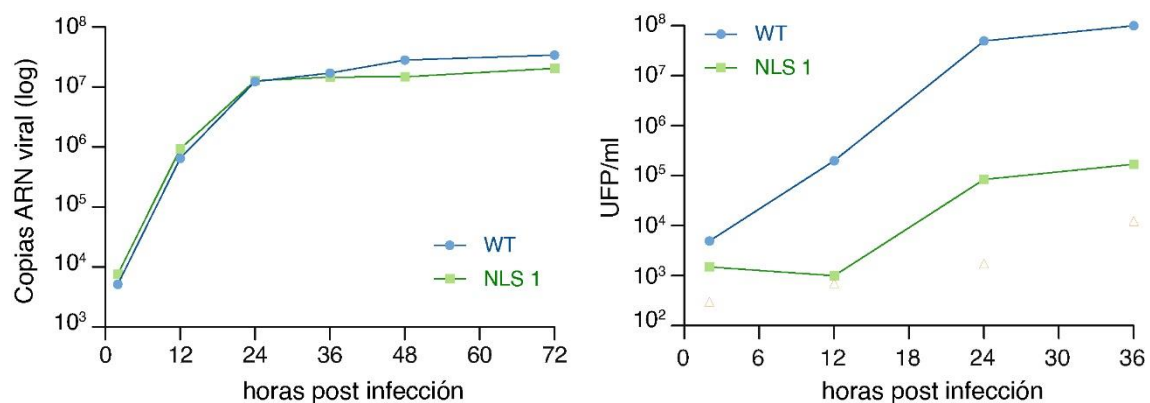


Figura 35. Cinética de replicación del virus WT y mutante NLS 1 en células A549 con MOI=0.2. Los desvíos estándar se encuentran representados, aunque al ser inferiores al 5% del valor medio de cada punto no es posible observarlos en el gráfico, que se encuentra en escala logarítmica. A la izquierda se grafican las copias de ARN viral cuantificadas por qPCR, y a la derecha las partículas infectivas en sobrenadante cuantificadas por placas de lisis. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el fin de evaluar si las mutaciones incorporadas en NLS 1 tienen algún efecto sobre la localización de cápside en los LDs que pudiese afectar la producción de partículas infectivas, estudiamos la acumulación de cápside en la superficie de los LDs comparando la mutante NLS 1 con el virus WT. Para esto, se infectó con ambos virus y se evaluó la asociación a LDs por medio de inmunofluorescencia indirecta. Los estudios muestran que en las infecciones con el virus mutante NLS 1, cápside forma los típicos anillos, con tinción rodeando a los LDs, similar a lo observado para el virus WT (Figura 36).

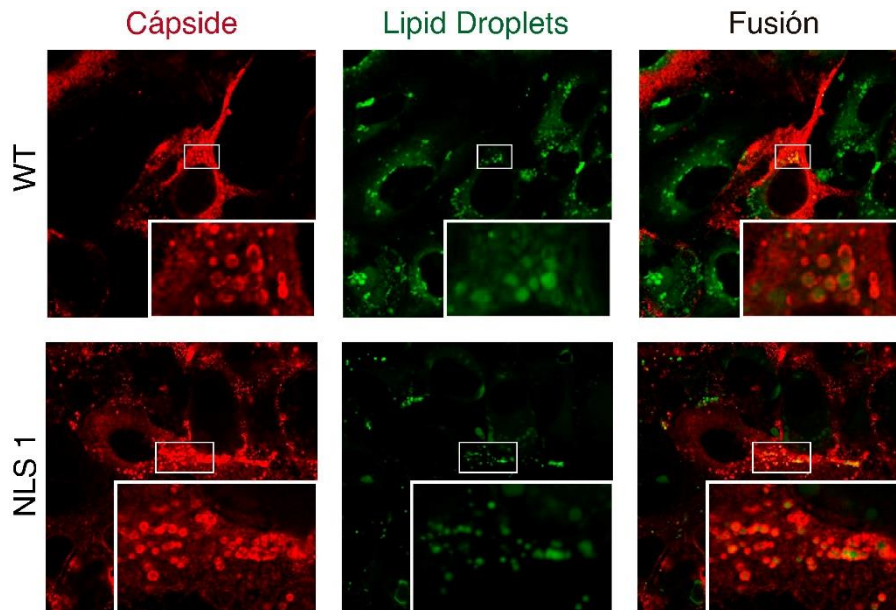


Figura 36. Inmunofluorescencia de células A549 infectadas con virus WT o mutante NLS 1 (MOI=2) a 16 hpi. Se marcó en rojo a la proteína de cápside y en verde al marcador de LD, BODIPY. La proteína de cápside de ambos virus se localizó en forma de anillos en los LDs. Objetivo: 63X.

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que la mutante NLS1 incluye dos sustituciones (Tabla 1), con el fin de profundizar en el estudio de los determinantes de localización y en un intento de desdoblar posibles funciones superpuestas, generamos las mutaciones individuales (K83S y K85A) en el contexto del genoma completo del virus. Nuevamente, transfectamos células de mosquito para generar *stocks* y con ellos infectamos células humanas para evaluar la localización nuclear. En la Figura 37 se muestran imágenes representativas de células infectadas por los virus K83S, K85A y WT. Al analizar la localización nuclear, observamos que la mutante individual K83S fue capaz de localizar en nucleolo de forma similar al virus WT, mientras que la mutante K85A pierde esta capacidad, mimetizando el fenotipo de la mutante doble NLS 1 (Figura 37, panel de la derecha). Además, al observar el fenotipo de placa de lisis, la mutante K83S generó placas idénticas al virus WT mientras que la mutante K85A contiene un defecto en el fenotipo de placa similar a la mutante NLS 1 (Figura 38). Estos resultados indican que identificamos un residuo en la proteína de cápside del ZIKV cuyo cambio (K85A) es suficiente para interrumpir la localización nucleolar de cápside y que además resulta en un marcado defecto en la infección, dando lugar a un virus atenuado.

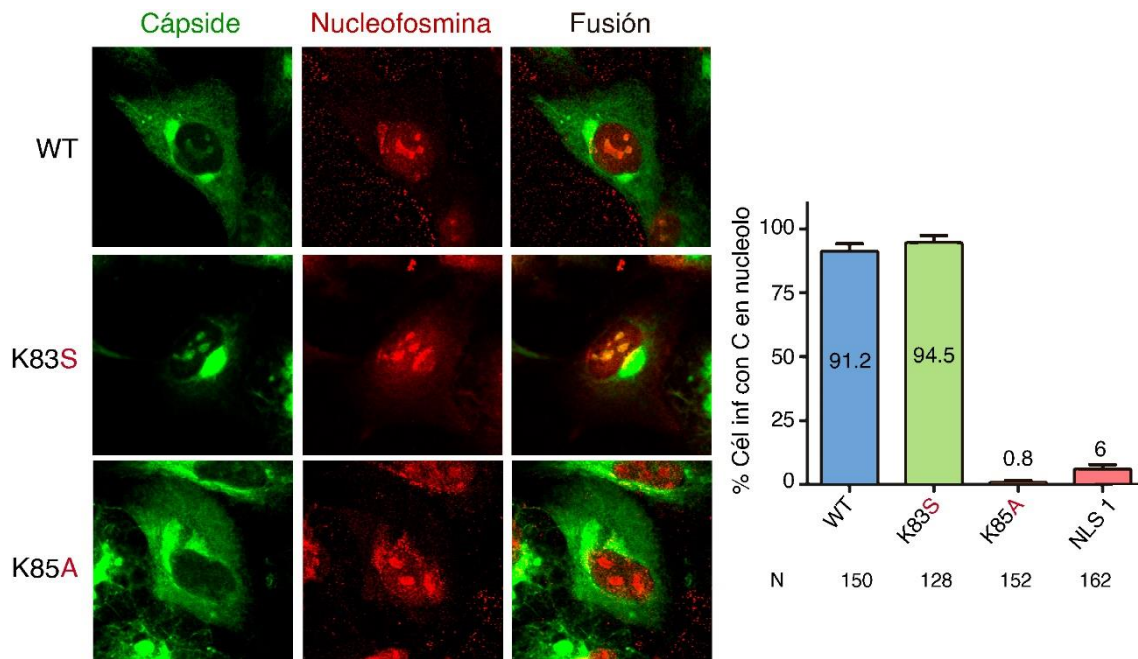


Figura 37. Inmunofluorescencia de células A549 infectadas con virus WT o mutantes. Se marcó en verde a la proteína de cápside y en rojo al marcador de nucleolo nucleofosmina. Objetivo: 63X. A la derecha se encuentra la cuantificación del porcentaje de células infectadas con localización nuclear de cápside. Las barras corresponden a los desvíos estándar. N: número total de células infectadas analizadas. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

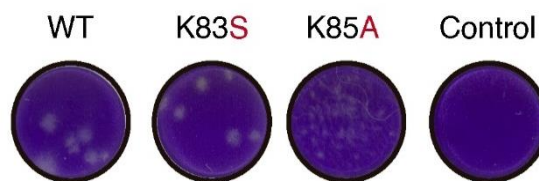


Figura 38. Imágenes representativas de un ensayo de placas de lisis para las mutantes individuales de la NLS 1 y el virus WT. El virus K83S genera placas de lisis de tamaño similar al virus WT, mientras que el virus K85A genera placas de lisis más pequeñas. El control corresponde a un pocillo sin infectar.

En base a estos interesantes resultados y con el fin de caracterizar en profundidad al virus K85A, se realizaron curvas de replicación en células humanas (Figura 39). La evaluación de la acumulación del genoma viral durante la infección adentro de la célula indicó que tanto el virus K85A como el K83S amplifican al ARN viral en forma similar a lo observado con el virus WT (Figura 39, paneles de la izquierda). Sin embargo, al cuantificar la liberación de partículas infectivas al sobrenadante, determinamos que, si bien la producción del virus mutante K83S fue similar a la del virus WT, la mutante K85A muestra una importante reducción en la liberación de partículas infectivas. De este modo, el cambio del residuo en la posición 85 de la proteína de cápside de ZIKV es el que explicaría el fenotipo observado en la mutante NLS 1.

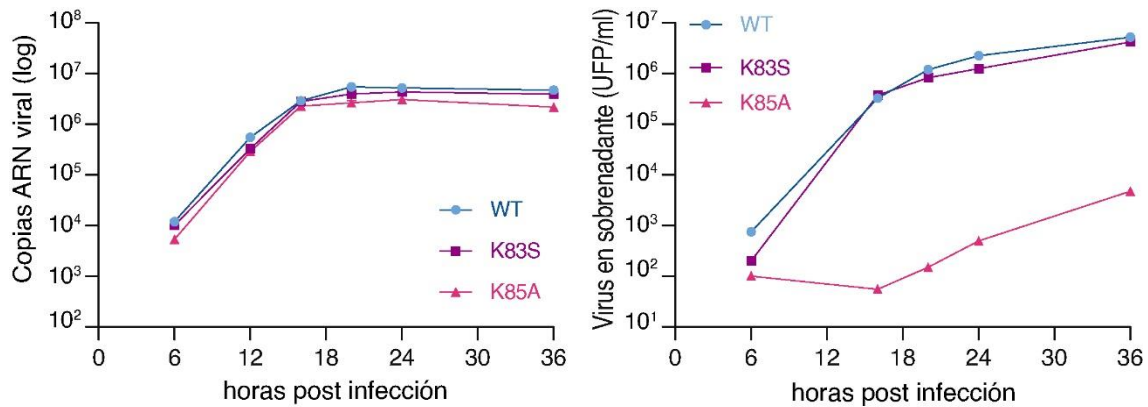


Figura 39. Cinética de replicación del virus WT y mutantes de NLS en células A549 con MOI=0.2. A la izquierda se grafican las copias de ARN viral cuantificadas por qPCR, y a la derecha las partículas infectivas en sobrenadante cuantificadas por placas de lisis. Los desvíos estándar se encuentran representados en el gráfico de la izquierda, aunque al ser en su mayoría inferiores al 10% del valor medio de cada punto no es posible observarlos en el gráfico, que se encuentra en escala logarítmica. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con estos estudios concluimos que los residuos predichos mediante análisis bioinformático son funcionales y mutaciones de cada una de las tres regiones es suficiente para disminuir la localización nuclear de cápside en células infectadas. Además, estudiando en detalle una de estas regiones observamos que la mutación NLS 1 que afecta la localización nuclear muestra defectos en la liberación de partículas infectivas. Con el fin de seguir profundizando en la posible función de cápside en el núcleo sobre procesos virales que permiten una eficiente liberación de partículas, nos encontramos actualmente evaluando el impacto de las mutaciones descritas en sistemas relevantes en cuanto a la infección y a la respuesta inmune innata de la célula.

Discusión Capítulo 2

Las proteínas de cápside de los Flavivirus presentan una distribución subcelular característica en la célula infectada. Sus funciones en los distintos compartimentos y los determinantes moleculares asociados a su distribución aún no se han determinado con claridad. En este capítulo evaluamos la distribución subcelular de cápside de ZIKV en células infectadas, y determinamos que durante la infección se distribuye entre nucleolos, RE y LDs, de forma similar a lo descrito anteriormente para el virus de DENV (Bulich and Aaskov 1992; Samsa et al. 2009; Wang et al. 2002). Sin embargo, encontramos diferencias notables en la cinética de acumulación de las proteínas en los distintos compartimentos, y en el efecto generado por la infección viral en la integridad celular. Aquí, logramos detectar la entrada de cápside al nucleolo en etapas tempranas de la infección con el virus del DENV (16 hpi), lo cual está en acuerdo con estudios previamente reportados (Sangiambut et al. 2008). En contraste con esto, si bien ZIKV infecta más rápido y genera efecto citopático a tiempos más cortos que en las infecciones por DENV, la proteína de cápside de ZIKV se detecta en los nucleolos solo después de las 16 hpi. Esto indicaría que, si bien la cápside de estos dos virus se encuentra en los mismos compartimentos, la dinámica de la distribución de la proteína durante la infección es marcadamente diferente y puede ser que la función de la misma varíe en distintas etapas del ciclo de cada uno de estos virus. Por otro lado, observamos que el efecto citopático generado por la infección con ZIKV es más pronunciado que en las infecciones con DENV. Con respecto a la remodelación del RE en las células infectadas por ZIKV, estudios realizados por Monel y colaboradores demostraron que la replicación de ZIKV induce la formación de vacuolas en el citoplasma (Monel et al. 2017,

2019). Las células infectadas son capaces de tolerar estas estructuras inducidas por la infección por unas horas hasta que ocurre un colapso del citoplasma seguido de muerte celular. Este tipo de estructuras también fueron reportadas en infecciones por otros virus relacionados como WNV y CHIKV (Chu and Ng 2003; Hussain et al. 2016). Estudios de microscopía electrónica de transmisión sugieren que las vacuolas inducidas por ZIKV podrían generarse en parte a partir de la membrana nuclear (Monel et al. 2017). Además, las proteínas modeladoras del RE como las Atlastinas (en particular ATL3) estarían involucradas en su formación, ya que su silenciamiento reduce la aparición de vacuolas en células infectadas con ZIKV (Monel et al. 2019). Dado el papel fundamental de las membranas derivadas del RE para la síntesis de la poliproteína viral, es posible que estas estructuras sean promotoras de la infección viral. Las estructuras generadas son altamente similares a las generadas cuando ocurre paraptosis, un tipo de muerte celular no apoptótica, que en el caso de ZIKV es dependiente de la señalización de las quinasas PI3K/Akt (Monel et al. 2017). La infección con DENV no es capaz de gatillar este tipo de efecto citopático, por lo que es posible que represente una cualidad característica de la infección por ZIKV. En relación a esto, una observación relevante a partir de las inmunofluorescencias de las células infectadas, fue la aparente desorganización de la estructura nucleolar. Esto es coincidente con trabajos de microscopía en células neuronales que relacionan la infección con ZIKV con la inducción del estrés ribosomal y la apoptosis mediada por p53 (Slomnicki et al. 2017). La sobreexpresión de la proteína de cápside en células neuronales estimuló la transcripción dependiente del supresor de tumores p53, demostrado mediante el uso de una construcción reportera. Este proceso sería desencadenado por la disrupción del componente granular del nucleolo gatillado por la presencia de la proteína de cápside.

La localización de cápside de ZIKV en LDs se observó desde tiempos muy tempranos en la infección, previo a su acumulación en los nucleolos. Esta observación brinda mayor relevancia al posible rol de los LDs en la infección por ZIKV. Distintos trabajos han descrito la relación funcional entre el metabolismo de LDs y la replicación de virus como DENV o HCV. La alteración con fármacos del metabolismo de LDs (mediante el uso de C75, un inhibidor de la enzima ácido graso sintasa) generó un fuerte defecto en la producción de partículas virales (Samsa et al. 2009). En el caso de HCV, se observó que la proteína C es capaz de reclutar proteínas no estructurales y complejos de replicación a membranas asociadas a los LDs, y que este proceso es fundamental para la producción de partículas (Miyanari et al. 2007). Se ha reportado que mutaciones en el dominio D2 de la proteína C de HCV impidieron su unión a LDs y la formación de partículas virales (Boulant, Targett-Adams, and McLauchlan 2007). En el caso de DENV, se determinó que los aminoácidos hidrofóbicos en la hélice $\alpha 2$ de cápside funcionarían como el dominio D2 de C de HCV, dado que mutaciones puntuales de los residuos L50 o L54 fueron suficientes para impedir su asociación a LDs y la formación de partículas. En el caso de ZIKV, se ha propuesto que residuos hidrofóbicos o cargados presentes en su pre- $\alpha 1$ *loop* podrían participar en su asociación a LDs. Mutaciones de los residuos F27, K31 y R32 introducidas en un plásmido de expresión de cápside lograron impedir la localización en LDs (Shang et al. 2018), lo que sugiere que la hidrofobicidad de la región del pre- $\alpha 1$ *loop* representaría una nueva forma de asociación de esta proteína a membranas. En estudios futuros, será de interés combinar las metodologías aplicadas en el Capítulo 1 para el estudio de la interacción con membranas con estudios funcionales de asociación a LDs enfocados en esta región de la proteína.

La búsqueda de determinantes de la localización subcelular en la proteína de cápside de ZIKV resultó en la predicción de al menos dos candidatos a NLS: una señal bipartita que abarcaría los aminoácidos 82-99 y otra señal que incluiría los aminoácidos 101-104

de la proteína de cápside. Empleando una estrategia de genética reversa, se generaron tres mutantes (NLS 1-3) en un clon infeccioso de ZIKV y se evaluó su funcionalidad como señal de localización nuclear en células humanas. El diseño de mutantes se realizó teniendo en cuenta la exposición de los residuos al solvente y la información de NLS presentes en otras proteínas del virus. Los virus mutantes generados permitieron analizar la localización subcelular de cápside durante la infección y su capacidad de replicación en células humanas. El análisis de los virus mutantes NLS 1, 2 y 3 evidenció una fuerte disminución en la localización nuclear de cápside (Figura 33), lo que sugiere que las tres regiones analizadas serían importantes para la localización nuclear de cápside de ZIKV. Si bien se han publicado trabajos que responsabilizan a la región 100-104 de cápside de ZIKV como señal de localización nuclear a través de la sobreexpresión de la proteína en células (Hou et al. 2017; Slomnicki et al. 2017), esta es la primera vez que se observa este fenómeno en el contexto de una infección viral, empleando un clon infeccioso de este virus. El análisis en profundidad de la mutante NLS 1 permitió determinar que adicionalmente al fenotipo en la localización de cápside, presentó un defecto en la producción de partículas virales y un menor tamaño de placas de lisis (Figura 35 y Figura 34, respectivamente), mientras que no afectó la localización en LDs ni la síntesis del ARN viral (Figura 36 y Figura 35, respectivamente). El desdoblamiento de las mutaciones presentes en NLS 1, por medio de la generación de mutantes puntuales, reveló que la sustitución en el residuo K85 fue el responsable del fenotipo observado. (Figura 37). La mutante K85A comparte el defecto en liberación de partículas y en propagación observado con la mutante NLS 1 (Figura 38 y Figura 39). Estos resultados sugieren que la localización nuclear de cápside podría tener un rol en la propagación viral, aunque no se puede descartar que los residuos básicos mutados tengan otra función adicional.

Al respecto, las señales de localización nuclear están compuestas en su mayoría por series de aminoácidos básicos (Kosugi et al. 2009), y en este trabajo evaluamos la funcionalidad de residuos de este tipo presentes en la hélice $\alpha 4$ de cápside que se encuentran expuestos al solvente. Sin embargo, dado que los residuos cargados positivamente en esta hélice se han propuesto como importantes para la interacción con ácidos nucleicos para la encapsidación del genoma viral, con el fin de asignar roles específicos a dichos residuos es necesario buscar estrategias para desacoplar estas dos funciones. En este sentido, sería interesante en un futuro evaluar el reemplazo de los residuos analizados por aminoácidos cargados positivamente (K o R, según corresponda) con el fin de disociar los efectos de interacción con el ARN viral de las posibles funciones de cápside en el nucleolo. Incluso estos estudios pueden no arrojar resultados certeros ya que ambas funciones podrían ser suplidas por residuos que mantengan la carga positiva.

Distintos estudios han demostrado que las proteínas de cápside de diversos Flavivirus son capaces de localizar en el nucleolo y se han podido identificar algunas NLS en su secuencia (Bulich and Aaskov 1992; Mori et al. 2005; Sangiambut et al. 2008; Wang et al. 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual dichas proteínas ingresan al núcleo aún es desconocido. A pesar de que el peso molecular de la proteína de cápside es relativamente bajo, compatible con un ingreso pasivo, los resultados obtenidos en este trabajo (ver Capítulo 3) y otros sugieren que estaría siendo transportada de forma activa al núcleo y no por difusión pasiva. Estudios realizados en WNV han sugerido que el transporte sería mediado por interacción de cápside con el complejo importina- α/β mediante la señal bipartita 85-101 y los aminoácidos 42/43 (Bhuvanankantham et al. 2009). También es posible que cápside sea capaz de interactuar con otras proteínas celulares que son a su vez transportadas activamente al núcleo. Es necesario abordar

estudios adicionales para determinar el rol de las proteínas de importación y exportación nuclear en el transporte de cápside de ZIKV al núcleo. En el Capítulo 3 se detallará una estrategia para el estudio del tránsito núcleo-citoplasmático de las proteínas de cápside en una infección viral.

Las funciones de la localización de la proteína de cápside en el núcleo aún no han sido determinadas. Es posible que, dada la abundancia de cápside en la célula, la distribución en los distintos compartimentos sea un mecanismo para evitar su interacción prematura con el ARN viral y la posible interferencia con las funciones de ARN en los sitios de traducción y replicación. Sin embargo, es posible que ejerza algún rol adicional en el nucleolo mediante su interacción con proteínas nucleares o reguladores transcripcionales para establecer un ambiente favorable para la replicación viral. Por ejemplo, se ha observado en distintos Flavivirus la interacción de cápside con componentes del nucleolo como histonas (Colpitts et al. 2011), la proteína B23 (Tsuda et al. 2006) o la helicasa DDX56 (Xu et al. 2011), y que todas estas interacciones podrían tener una función proviral. En este sentido, la construcción de virus con alteración de la localización subcelular de la proteína de cápside pueden funcionar como estrategia para la atenuación viral.

La compleja distribución subcelular de cápside y las funciones asociadas a ella la convierten en un posible blanco de estrategias antivirales (Klumpp and Crépin 2014; Sotcheff and Routh 2020). En virus con genoma de ARN, la aparición de variantes resistentes a compuestos antivirales es frecuente debido a las altas tasas de mutación de las polimerasas virales, lo presenta una dificultad para el desarrollo de compuestos inhibidores de la infección. Esto se debe a que los genomas con variantes resistentes suelen ser dominantes y son seleccionadas por sobre los genomas susceptibles. En este sentido, se ha propuesto la elección de blancos virales que actúen como dominantes, es decir, que los genomas susceptibles sean dominantes por sobre los resistentes (Mateo et al. 2015). Este fenómeno puede ocurrir cuando el blanco viral está constituido por una proteína capaz de formar oligómeros. La hipótesis de dominancia genética de subunidades defectivas propone a cápside como un blanco atractivo para el diseño de antivirales. Su capacidad de oligomerizar provocaría que en las células infectadas existan complejos con coexistencia de proteínas resistentes y susceptibles, un factor que presenta un obstáculo a la emergencia de virus resistentes (Mateo et al. 2015). Como se mencionó previamente, el uso de inhibidores de la acumulación de cápside en LDs representa una prueba de concepto de que es posible inhibir la replicación viral con este tipo de estrategia (Martins et al. 2012; Samsa et al. 2009). Es necesario comprender los mecanismos involucrados en la distribución subcelular de cápside con el objetivo de diseñar estrategias novedosas que resulten en el control de la infección viral. Las funciones de cápside en los distintos compartimentos continuarán siendo foco de estudios futuros.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo nos permitieron determinar la localización de cápside de ZIKV durante la infección viral y los efectos producidos por la infección en células en cultivo. Además, pudimos identificar residuos específicos en la proteína de cápside que son cruciales para la localización en nucleolos. La evidencia disponible hasta el momento señala que la localización de cápside puede ser un blanco susceptible de ser perturbado en estrategias de control viral.

Capítulo 3: Estudio de la dinámica de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas.

Introducción

El estudio de la dinámica de biomoléculas en el interior celular representa un desafío para las técnicas de microscopía debido a la complejidad del sistema y a la necesidad de contar con alta resolución espacial en una escala temporal apropiada. El micro ambiente celular está compuesto por flujos moleculares altamente regulados generados por interacciones de los distintos componentes. Las técnicas de correlación de fluorescencia son una familia de métodos que proveen información sobre la dinámica de proteínas fluorescentes teniendo en cuenta las fluctuaciones en la señal que emiten. Las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en un punto pueden generarse por procesos biológicos como la difusión de moléculas, cambios conformacionales, transporte molecular, entre otros (Macháñ et al. 2014; Magde, Elson, and Webb 1972).

La mayoría de los métodos existentes para medir la difusión de partículas en células se basan en la espectroscopía de correlación de fluorescencia (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) que proveen información local del movimiento de las moléculas en el volumen de observación. A partir de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia es posible calcular una función de auto correlación (*autocorrelation function*, ACF) en el tiempo del experimento y ajustarla a modelos de difusión característicos de procesos biológicos (Bacia, Haustein, and Schwille 2014; Fitzpatrick and Lillemeier 2011) (Figura 40). Para extender el experimento a una célula entera, es posible escanear el volumen de observación y calcular la ACF en una imagen (Digman et al. 2005; Hebert, Costantino, and Wiseman 2005; Petersen et al. 1993). En este sentido, la metodología de correlación espacio temporal en imágenes de barrido (*Raster Image Correlation Spectroscopy*, RICS) permite determinar las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia dada por la dinámica y el transporte de moléculas en una región o compartimento de la célula.

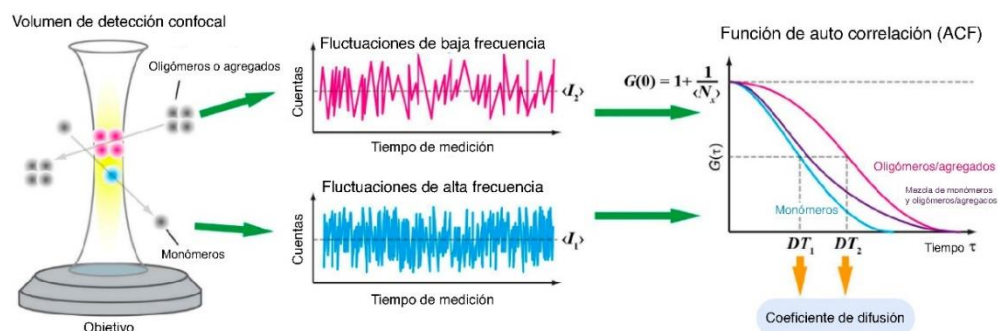


Figura 40. Fundamento de la técnica de FCS. Se representa un lente objetivo y, por encima de él, la fracción de la muestra que es iluminada en un microscopio. Este volumen de detección es atravesado por partículas fluorescentes que difunden y pueden encontrarse en distintos estados de oligomerización. En el centro, se ejemplifican gráficos de medición de intensidad de fluorescencia en función del tiempo, es decir, muestran las fluctuaciones que son analizadas por la técnica de FCS. $\langle I_1 \rangle$ e $\langle I_2 \rangle$ representan la intensidad de fluorescencia media de monómeros y oligómeros/agregados, respectivamente. A partir de las fluctuaciones de intensidad se calcula la función de auto correlación (ACF, derecha). Los tiempos de difusión DT_1 y DT_2 (a partir de los cuales se calculan coeficientes de difusión) y el número de moléculas N_x se obtienen de la ACF de las fluctuaciones. Modificado de Kitamura et al. 2018.

Con el objetivo de profundizar el análisis y visualizar el recorrido de las moléculas en la célula, Malacrida y colaboradores desarrollaron una serie de algoritmos basados en la correlación de pares que permiten obtener mapas de conectividad en 2 dimensiones del interior de la célula (Malacrida et al. 2018). A partir de la correlación de la señal en todos los pares de píxeles de una imagen, la función de correlación en dos dimensiones (*two-dimensional pair Correlation Function*, 2D-pCF) determina el tiempo demorado por una partícula en moverse de un lugar a otro y permite crear un mapa visual de las trayectorias promedio de las partículas. Este análisis incorpora una variante temporal y permite detectar barreras para la difusión de las moléculas ya que, si existe un obstáculo entre dos puntos dados, el tiempo para atravesarlo será mayor. En resumen, esta técnica altamente sensible y no invasiva permite realizar el seguimiento de una molécula en un área de la célula y generar un mapa de difusión. Además, no requiere moléculas aisladas ya que un gran número de ellas puede estar marcada con el mismo fluoróforo en el mismo volumen de excitación.

Las proteínas de cápside de DENV y ZIKV, como se mencionó anteriormente, presentan una distribución subcelular particular en la célula infectada. Hasta el momento, no existen estudios que describan el modo en que estas proteínas se desplazan y acumulan dentro de las células infectadas, ni se conocen los mecanismos involucrados en esa dinámica. En este capítulo se presentan las estrategias utilizadas para generar virus modificados con fluoróforos fusionados a la proteína de cápside, con el objetivo de observar la movilidad de la proteína de cápside de estos virus en células vivas. Estas herramientas fueron combinadas con las técnicas de RICS y el análisis de 2D-pCF para obtener información específica acerca de la movilidad y para obtener mapas de difusión de la proteína de cápside en alta resolución en células vivas infectadas.

Resultados

Construcción de herramientas genéticas para estudiar la distribución de la proteína de cápside en células infectadas vivas

Con el objetivo de estudiar detalladamente la dinámica de la proteína de cápside en células infectadas, diseñamos virus recombinantes con una copia de cápside fusionada a una proteína fluorescente. Para ello, a partir de clones infecciosos generados en nuestro laboratorio (ver Materiales y métodos), se llevó a cabo el diseño y la construcción de los virus de DENV2 o ZIKV con dos copias de la proteína de cápside, una de las cuales se fusionó a la secuencia codificante de mCherry o de GFP seguido de una secuencia de autoclivaje (secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa, FMDV) (Figura 41). La secuencia 2A permite la liberación de cápside fusionada a la proteína fluorescente y la correcta traducción en el RE del marco abierto de lectura completo del virus.

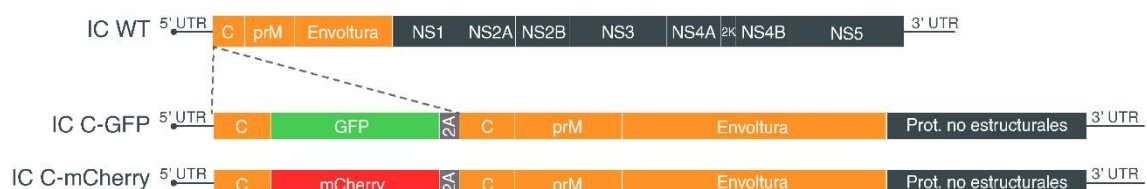


Figura 41. Representación de las construcciones generadas con cápside fusionada a proteínas fluorescentes. En la parte superior se representa el genoma del virus WT, y en la parte inferior las construcciones de cápside fusionada a GFP/mCherry. La secuencia 2A corresponde al sitio de autoclivaje del virus FMDV. En cuadros naranjas se encuentran las proteínas estructurales y en cuadros grises las proteínas no estructurales. IC=clon infeccioso.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las construcciones generadas, el ARN viral sintetizado por transcripción *in vitro* de cada una de las construcciones se transfectó en

células BHK, y se evaluó la aparición y dispersión de fluorescencia de la proteína mCherry o GFP. En paralelo, se transfectó el ARN proveniente del clon *wild type* y a las 24 horas post transfección se realizaron inmunofluorescencias para detectar la proteína de cápside, con el objetivo de verificar la distribución subcelular de cápside en las construcciones que incluyen las fusiones y compararlas con la distribución en el virus WT.

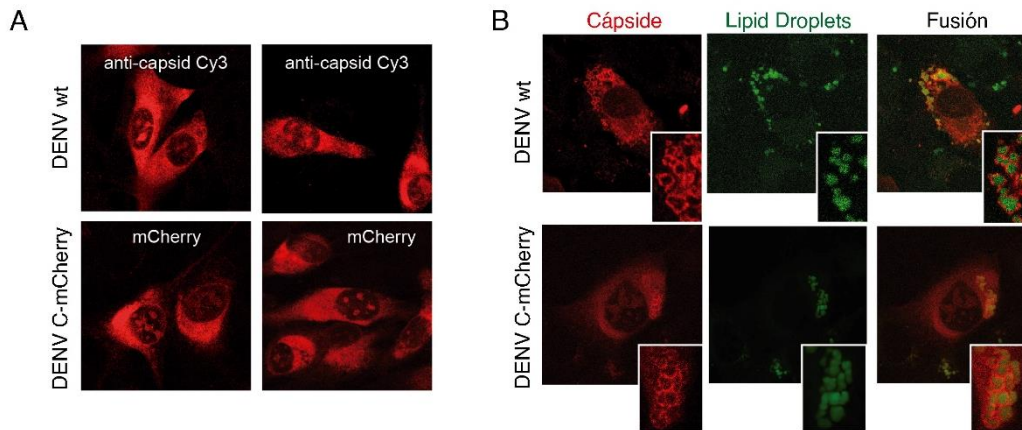


Figura 42. A: Imágenes de inmunofluorescencia contra cápside (marcada en rojo, DENV WT) y de fluorescencia de mCherry (DENV C-mCherry) de células BHK transfectadas a 24 hpt. En ambos casos se observa la presencia de proteína de cápside en los nucleolos. B: Imágenes de las mismas características que en A, marcadas adicionalmente con el compuesto BODIPY para la tinción de *lipid droplets* en verde. En ambos casos se observa la presencia de proteína de cápside en los LDs en forma de anillos.

En las imágenes de inmunofluorescencia de células BHK transfectadas con el ARN correspondiente al virus WT, la proteína de cápside se observó en citoplasma, nucleolos (Figura 42 A) y LDs (Figura 42 B), de forma similar a lo observado en células humanas (Capítulo 2). Al observar la fluorescencia de mCherry en las células transfectadas con el ARN correspondiente a DENV C-mCherry, se determinó que la distribución subcelular de la proteína de cápside fusionada a mCherry fue indistinguible de la detectada en la transfección con el ARN del virus WT. Dado que la localización de cápside fusionada a mCherry/GFP fue similar a lo observado con cápside WT, y que los ARN virales generados fueron capaces de replicar en células BHK, consideramos que la herramienta generada sería de utilidad para el estudio de la movilidad de la proteína de cápside *in vivo* en el contexto de una célula infectada.

Con el fin de observar la progresión temporal de una infección en células vivas, se transfectó nuevamente el ARN infeccioso de los virus generados en células BHK y en este caso, se observaron de forma directa en un microscopio confocal invertido LSM 880 (Zeiss) que cuenta con incubadora a 37°C y 5% CO₂. En estas condiciones es posible observar las células transfectadas desde el momento de la transfección en adelante de forma ininterrumpida, dado que su integridad se encuentra resguardada por la incubadora. De este modo, se monitoreó la progresión de la transfección durante 6 horas, tomando imágenes en intervalos regulares (cada 30 minutos). En la Figura 43 se muestran a modo de ejemplo imágenes tomadas a lo largo del tiempo de las transfecciones de los virus ZIKV C-GFP y DENV C-mCherry. La señal fluorescente de mCherry o GFP se detectó tan temprano como a la hora post transfección, indicando que el ARN ingresó a la célula y comenzó a traducirse (Figura 43). De forma similar a lo observado previamente, se pudo visualizar en tiempo real que la fusión de proteína de cápside a la proteína fluorescente se localizó en citoplasma y nucleolos en estas células.

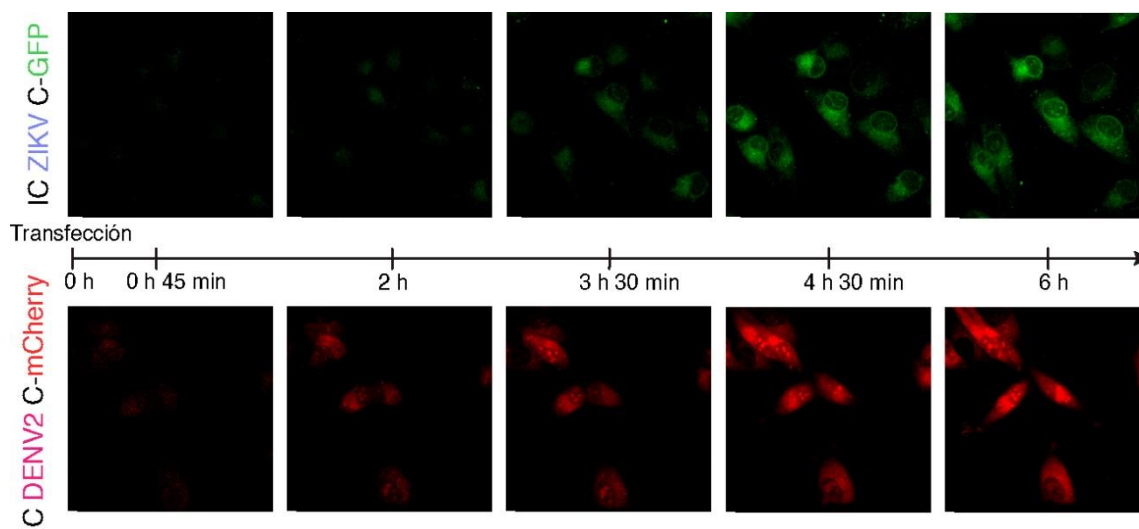


Figura 43. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células BHK transfectadas con el ARN infeccioso de ZIKV o DENV con fusiones de cápside a las proteínas fluorescentes indicadas. Se tomaron imágenes desde el inicio de la transfección cada 30 minutos hasta las 6 hpt. Se muestran imágenes representativas de la secuencia, en las que se observa la aparición de fluorescencia en las células y la acumulación en citoplasma y núcleo.

En base a estos resultados, corroboramos que contamos con un sistema robusto y estable para la observación *in vivo* de células infectadas. La misma metodología es la que será aplicada en los estudios de FCS y 2D-pCF de las siguientes secciones.

Estudio de la dinámica de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas

Con el fin de estudiar la dinámica de la distribución subcelular de la proteína de cápside durante la infección, establecimos una colaboración con el equipo de la Dra. Laura Estrada (Departamento de Física, FCEyN UBA), quien se dedica a desarrollar métodos avanzados de microscopía. Así, abordamos en forma conjunta el estudio de la movilidad de las proteínas de cápside en forma interdisciplinaria.

Para estos estudios primero se seleccionó un intervalo de tiempo adecuado para realizar las mediciones de fluctuaciones de intensidad de fluorescencia a partir de los experimentos mostrados en la Figura 43. Este intervalo temporal comprende un mínimo de fluorescencia detectable por la técnica (desde 1,5 hpt en adelante) y un máximo en el cual se observa saturación en la detección de fluorescencia debido a la presencia de un gran número de moléculas fluorescentes (hasta 6 hpt). Las mediciones fueron realizadas en el microscopio confocal invertido LSM Zeiss 880 presente en el Instituto Leloir que cuenta con un filtro espectral y un detector con capacidad de conteo de fotones, necesarios para la aplicación de la técnica (ver Materiales y métodos).

Con el fin de evaluar la cinética de acumulación de cápside en los compartimentos celulares, se transfectó el ARN infeccioso de DENV C-mCherry en células BHK y se analizó la localización espacio temporal de la fluorescencia de C-mCherry. Con el objetivo de generar una representación de la distribución intracelular de la proteína, se calculó la intensidad de fluorescencia de forma integrada a partir de distintas regiones de interés en la célula (*region of interest*, ROI) a distintos tiempos post transfección. De este modo, se graficó la intensidad de fluorescencia media normalizada en función del tiempo para ROIs tomadas en distintas localizaciones en la célula (núcleo o citoplasma) (Figura 44).

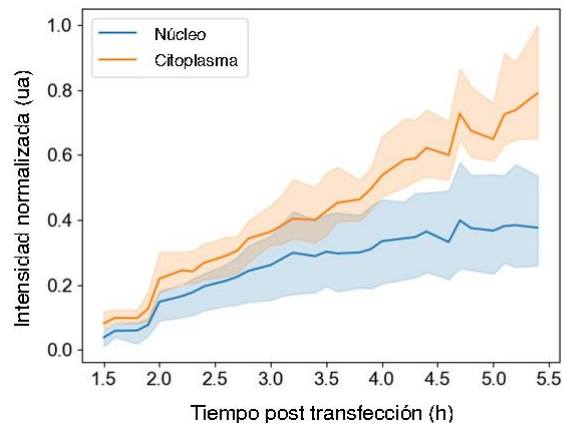


Figura 44. Intensidad de fluorescencia normalizada en el citoplasma o núcleo de las células transfectadas con C-mCherry desde 1.5 a 5 horas post transfección. Se grafican la fluorescencia media (línea continua) y desvío estándar (zona sombreada). Se observa la cinética de acumulación de C-mCherry en citoplasma y núcleo.

La proteína fue detectada en la célula a partir de 1.5 hpt y se observó una rápida acumulación en el núcleo desde las 2 hpt (Figura 44). Esta observación se debe a la rápida producción de proteína a partir de la traducción del ARN entrante en el RE y su consecuente migración al núcleo celular. Esto indica que la distribución de cápside hacia los nucleolos ocurre de forma casi inmediata luego de su síntesis.

A continuación, con el fin de analizar la dinámica de la proteína de cápside en las células, caracterizamos su movilidad en los distintos compartimentos subcelulares durante la infección. La técnica de RICS permite analizar fluctuaciones de fluorescencia en el tiempo y así obtener información de la dinámica proteica con alta resolución temporal y resolución espacial de unos pocos μm . En este sentido, el enfoque de RICS compara las fluctuaciones de intensidad de distintos píxeles en una imagen de la región a estudiar. Dado que las imágenes son obtenidas por microscopía de barrido con láser, se debe tomar en cuenta el tiempo que demora el escaneo entre un píxel y su vecino en las direcciones horizontal y vertical. Este tiempo es conocido y es posible definirlo en la configuración del equipo. De este modo, si las moléculas que se encontraban en el primer píxel se desplazan al píxel vecino en ese tiempo, habrá una correlación positiva en las fluctuaciones de fluorescencia de estos dos píxeles. Esta correlación dependerá del mecanismo causante de las fluctuaciones de la señal medida. Mediante la comparación de las fluctuaciones de distintos píxeles en la imagen (puntos con distinta demora) es posible inferir el mecanismo responsable de la movilidad de las moléculas.

Con el propósito de aplicar esta técnica para estudiar la movilidad de la proteína de cápside, se transfectaron células BHK con el ARN viral de DENV C-mCherry y se observaron en el microscopio confocal. Como control de los experimentos mostrados a continuación, se realizaron transfecciones en paralelo con un plásmido que expresa la proteína mCherry sola (pmCherry-C1). Al encontrar una célula positiva para mCherry, se hizo zoom en la célula y se seleccionaron ROIs para realizar las mediciones de RICS (como se indica con recuadros en la Figura 45 A). En estas regiones se tomó una progresión (o *stack*) de 100 imágenes consecutivas y se calculó la ACF para cada una de ellas (Figura 45 B y C). Los datos de tiempos inferiores a 3 hpt fueron descartados debido a que la intensidad de fluorescencia no fue suficiente para obtener una buena relación señal/ruido. Para comparar la movilidad de cápside en distintos compartimentos, las ACF calculadas de datos de núcleo o citoplasma fueron ajustadas a un modelo de difusión simple, un modelo usualmente aplicado para proteínas desplazándose en un medio intracelular. Este ajuste permitió calcular un coeficiente de difusión de C-mCherry para los distintos tiempos post transfección. A modo de control, se analizaron células sin transfectar en la que se observó mínima señal de autofluorescencia y no se detectó correlación. Los resultados del ajuste al modelo

arrojaron coeficientes de difusión de alrededor de $1\text{--}4\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ en el núcleo, y $1\text{--}17\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ en el citoplasma (Figura 45 D). Los resultados indican que C-mCherry, en promedio, se mueve más rápido en el citoplasma que en el núcleo. Los distintos coeficientes de difusión en el tiempo pueden deberse a las interacciones diferenciales de la proteína C-mCherry con los componentes moleculares de cada compartimento debidos a la progresión de la replicación viral, dado que el coeficiente de difusión de la transfección control con la proteína mCherry sola no se modificó en función del tiempo (entre $1\text{--}20\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ consistente con coeficientes de proteínas fluorescentes ya reportados (Kitamura and Kinjo 2018; Wu, Chen, and Müller 2009). Sin embargo, no es posible descartar que algunos factores de estrés celular, ausentes en el control, puedan afectar el comportamiento de la proteína en la célula infectada.

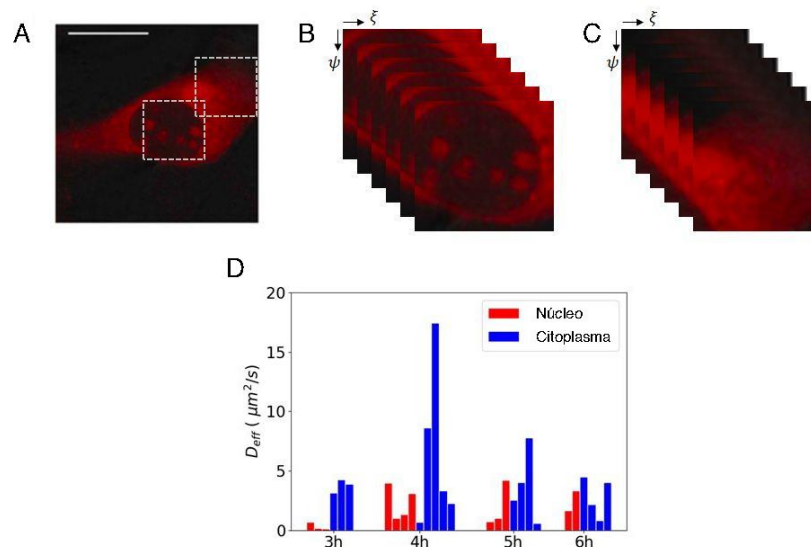


Figura 45. Medición de la difusión de C-mCherry mediante RICS. A: Imagen de microscopía confocal representativa de una célula BHK transfectada con DENV C-mCherry (4 hpt). Se seleccionó una ROI de 256×256 píxeles para el análisis de RICS en el núcleo y el citoplasma (recuadros en línea punteada). B y C: Representación de la secuencia de imágenes para el análisis de RICS en núcleo y citoplasma respectivamente. D: Coeficientes de difusión efectivos de la ACF de C-mCherry desde 3 a 6 hpt en núcleo o citoplasma. En promedio, C-mCherry se mueve más rápido en el citoplasma que en el núcleo. Cada barra representa la medición en una única célula. Se muestran 40 mediciones de 5 experimentos independientes.

Una vez caracterizada la cinética de acumulación y dinámica de C-mCherry en citoplasma y nucleolos de células infectadas, se evaluó la interacción de la proteína con el medio intracelular. Con este objetivo, se utilizó la técnica de 2D-pCF que, como se mencionó en la introducción, es una metodología de molécula única capaz de generar un mapa de la trayectoria de las proteínas en el medio intracelular. El método de correlación de pares (pCF) cuantifica la correlación entre dos puntos lejanos en una muestra. En la versión en 2D de esta técnica (2D-pCF), la función de correlación es calculada entre dos puntos en distintos cuadros de una progresión temporal de imágenes. A partir de la toma de un gran número de imágenes sucesivas de una región de la célula determinada (entre 5000 y 50000, Figura 46 A), esta técnica permite calcular la probabilidad de que una molécula fluorescente se desplace de un punto a otro en el tiempo transcurrido entre imágenes (Figura 46 B). En cada punto de la imagen se calcula la pCF en todas las direcciones (en todos los ángulos) y se obtiene una distribución de pCF angular. La distribución resultante de correlación espacial y temporal brinda información de la trayectoria y movilidad de las moléculas (Figura 46 C). La correlación positiva (curva por encima de cero, Figura 46 C), indica que una misma molécula se desplazó de un lugar a otro en la región analizada, y el tiempo de correlación (eje horizontal) brinda información de la velocidad a la que ocurrió ese desplazamiento. De

este modo, se obtiene el camino promedio que recorren las moléculas en cada punto de la imagen. Este método provee mapas de conectividad en alta resolución de la célula y detecta barreras para el movimiento de la proteína fluorescente analizada. Los resultados de estos análisis se utilizan para generar mapas de conectividad, donde se representan con líneas las direcciones preferenciales de movimiento de las partículas analizadas.

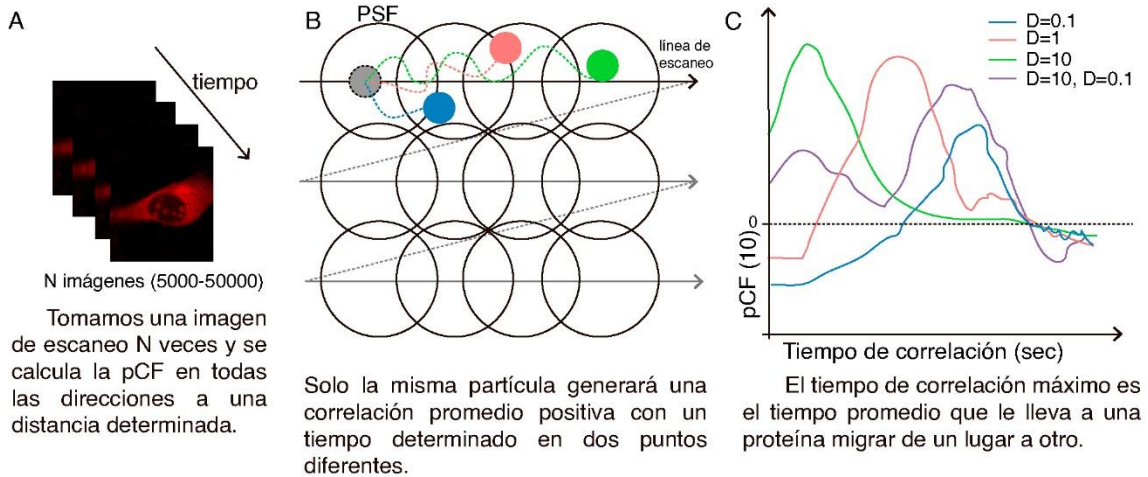


Figura 46. Fundamento de la técnica de correlación de pares en dos dimensiones (2D-pCF). A: se toma una gran cantidad de imágenes a gran velocidad con microscopio confocal, y se calcula un conjunto de funciones de correlación. B: los círculos representan la función de dispersión de punto (*point spread function*, PSF), es decir el mínimo punto resuelto por un microscopio óptico, y las líneas son la dirección de escaneo del microscopio. Los puntos de colores representan partículas fluorescentes que pueden moverse en todas las direcciones. La pCF calcula la probabilidad de que cada una de ellas termine en los distintos puntos del espacio en un período de tiempo dado. C: Si la correlación es positiva, podremos estar seguros de que se trata de la misma partícula que se desplazó de un punto a otro, y el valor máximo de la función es el tiempo que le tomó el desplazamiento.

La metodología 2D-pCF fue utilizada con el fin de estudiar la dinámica de la proteína de cápside de DENV y ZIKV fusionadas a mCherry dentro de los distintos compartimentos celulares durante la infección. Este análisis se realizó en comparación con la proteína mCherry sola, empleada como control. En estos experimentos se transfectaron células BHK, como se detalló anteriormente y, entre 5 y 6 hpt, se tomaron secuencias de imágenes de células con fluorescencia roja. En la Figura 47 se muestran imágenes representativas de células transfectadas con cada construcción, y se remarcan las regiones de la célula elegidas para realizar mediciones. La región elegida corresponde a una parte del núcleo celular, y fue seleccionada a partir de la visualización del canal de luz transmitida del microscopio (no mostrado). En el panel b de la misma figura se muestran imágenes que representan la intensidad de fluorescencia promedio de la secuencia de 8192 imágenes tomadas de la región de la célula en análisis. Las imágenes de este panel evidencian que las proteínas C-mCherry de DENV y ZIKV se acumulan principalmente en el nucleolo de la célula y en el citoplasma. En contraste con esto, la proteína mCherry sola se distribuye de forma homogénea en toda la célula. A partir de estas imágenes, se calculan las funciones de correlación cuyos resultados se encuentran representados en los paneles c y d de la Figura 47. El mapa de anisotropía (Figura 47, panel c) representa la probabilidad de que las moléculas se hayan movido en cierta dirección (en comparación con un control de movimiento isotrópico, es decir, al azar). Si se dibujan líneas en cada píxel de la imagen en donde la dirección de anisotropía es máxima, se obtiene un mapa que describe los caminos más probables tomados por las moléculas en cada posición, lo que indica un flujo molecular (Figura 47, panel d). Por medio del análisis de los resultados obtenidos por 2D-pCF pudimos observar un comportamiento diferencial para las proteínas de cápside de los virus de

DENV y ZIKV. La proteína C-mCherry de DENV presenta una circulación altamente organizada en las interfaces núcleo-citoplasma y núcleo-nucleolo. Esto no se evidencia para la C-mCherry de ZIKV (Figura 47). La diferencia entre estas dos proteínas se puede observar con claridad en los mapas de conectividad, donde las líneas representan una direccionalidad en el movimiento de cápside de DENV alrededor del nucleolo y de la membrana nuclear. En cambio, la proteína de cápside de ZIKV, si bien se acumula en los nucleolos (se observa una gran intensidad en el panel b de la Figura 47), no presenta direccionalidad preferencial en su movimiento dentro de la región analizada (ver paneles b y c). En el experimento control, donde se visualizó a la proteína mCherry sola, se observó una distribución homogénea en toda la célula (Figura 47, panel a) y, a partir del mapa de conectividad (Figura 47 panel d), se observó que esta proteína posee un movimiento isotrópico (no se mueve en ninguna dirección en particular), mostrando una evidente diferencia en distribución y movilidad en comparación con las proteínas fusionadas a la proteína de cápside de ambos virus.

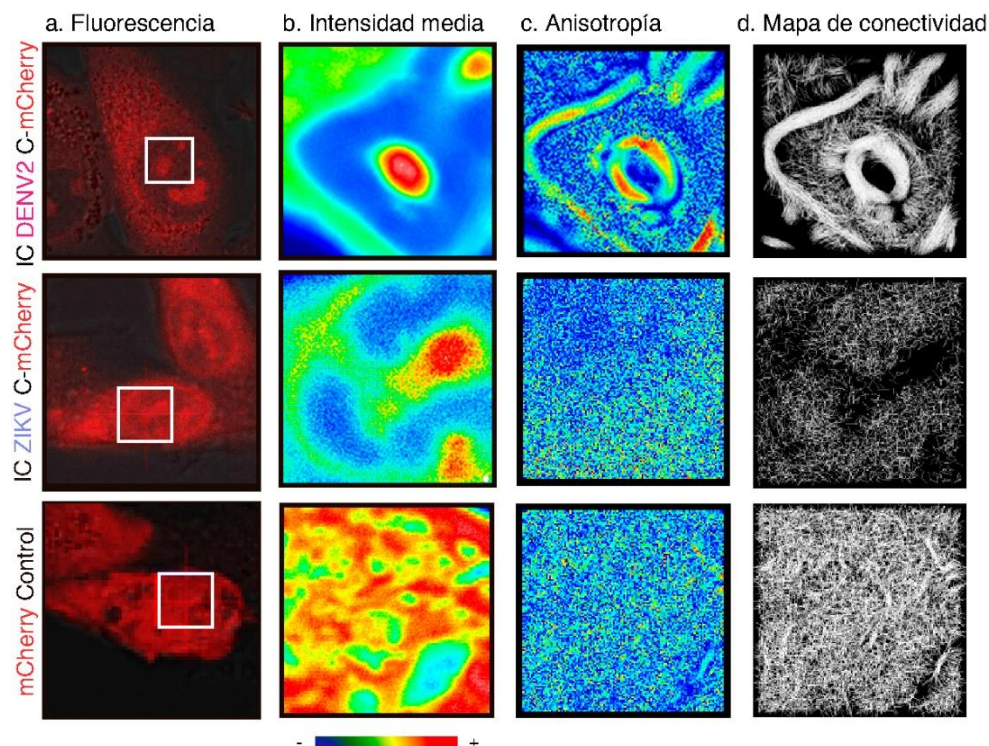


Figura 47. a. Imagen confocal de células transfectadas. Los recuadros blancos señalan la región seleccionada para el análisis, que corresponde al núcleo. b. Intensidad promedio para la serie temporal de la región indicada en a. Colores más cálidos indican mayor intensidad. c. Mapa de anisotropía obtenido mediante el análisis de 2D-pCF. Colores más cálidos indican mayor anisotropía. d. Mapa de conectividad que representa con líneas el ángulo de mayor anisotropía de movimiento. Las líneas representadas corresponden a un valor de anisotropía por encima de un umbral mínimo definido previamente. La ausencia de línea en una región indica movimiento isotrópico. Se observa un movimiento organizado para DENV C-mCherry, que no se observa en ZIKV C-mCherry ni en el control.

Con el fin de profundizar los estudios, evaluamos la movilidad de C-mCherry de DENV en distintas etapas de la infección. Para esto realizamos un análisis a distintos tiempos post transfección. La intensidad de fluorescencia media de células representativas evidencia la acumulación de C-mCherry en los nucleolos, identificados como las zonas de mayor intensidad (Figura 48). En base al análisis de 2D-pCF de estas muestras tomadas a los tiempos indicados fue posible observar que la movilidad de la proteína se vuelve cada vez más organizada a medida que avanza el tiempo de la infección (Figura 48). Esto es indicativo de que, si bien existe síntesis y acumulación de proteína durante

toda la infección viral, los caminos preferenciales recorridos por C-mCherry se conservan.

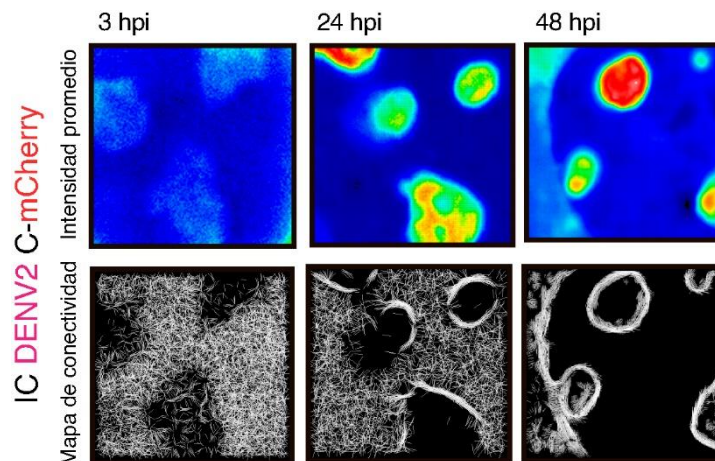


Figura 48. Imágenes de intensidad promedio (arriba) y conectividad (abajo) de células transfectadas con el ARN de DENV C-mCherry en función del tiempo post transfección. Se observa que movilidad de la proteína es más organizada a medida que progresa la infección.

Los resultados obtenidos en los mapas de conectividad demuestran que la proteína de cápside de DENV posee un comportamiento particular en la cercanía de la membrana nuclear y en la interfase núcleo-nucleolo. Además, la movilidad molecular en estas interfaces indica que la proteína encuentra obstáculos para la difusión. Estos obstáculos (como puede ser una membrana) fuerzan a la proteína a rodearlos dando como resultados las imágenes observadas de alta organización. Es posible que, una vez dentro del nucleolo, la movilidad de cápside se encuentre restringida por interacciones con componentes nucleolares como ácidos nucleicos y proteínas, de esta forma la proteína se acumularía dentro del nucleolo, pero con baja movilidad. Con el fin de abordar el estudio de la capacidad de cápside de atravesar las barreras encontradas y los procesos de entrada y salida de cápside de cada compartimento, llevamos a cabo los estudios específicos que se detallan a continuación.

Análisis del transporte de la proteína de cápside entre núcleo y citoplasma y la movilidad intracompartimento

En base a los resultados presentados en la sección anterior y a partir de la puesta a punto de las herramientas y técnicas de correlación, planteamos el objetivo de evaluar la movilidad de DENV C-mCherry en las interfaces entre compartimentos. Una pregunta biológica relevante es poder definir si la proteína de cápside que se encuentra en el núcleo tiene la capacidad de salir para producir partículas virales o se quedaría retenida en el núcleo durante la infección. Con este fin, utilizamos la técnica de pCF en una dimensión, aplicada a líneas de escaneo y no a imágenes como en la Figura 46. De forma similar a lo detallado anteriormente, se realizaron transfecciones en células BHK con el virus DENV C-mCherry y, en células positivas para fluorescencia roja, se trazaron líneas de escaneo perpendiculares a la membrana nuclear (Figura 49 A), para estudiar un trayecto definido. Cada experimento consiste en la toma de una secuencia de 200000 líneas de 64 píxeles (alrededor de 100 s) a partir de las cuales se realiza el análisis de correlación de pares. Se evalúa la presencia de la proteína a un lado y otro de esa potencial barrera. A partir de la toma de estas líneas, es posible ubicarlas de forma secuencial una encima de la otra, formando columna en función del tiempo. De este modo, se obtiene un mapa de intensidad de fluorescencia en el cual el eje horizontal son píxeles (los 64 píxeles de largo de la línea) y el eje vertical es tiempo (Figura 49 B). Los gráficos que representan distintas posiciones en función del tiempo se denominan kimogramas. De forma similar a lo realizado con imágenes en el apartado anterior, se calcula la función de correlación en las líneas registradas. El valor de la función de

correlación se grafica de forma similar al mapa de intensidad, en forma de kimograma (Figura 49 C), en el cual se representa con escala de colores la amplitud de la función. Este análisis reveló la presencia de un arco (marcado en blanco en el kimograma en la Figura 49 C) que indica el retraso en el transporte de C-mCherry a través de la membrana nuclear. En otras palabras, el arco representa la falta de correlación de la función, lo que indica una falta de conectividad entre las moléculas a un lado y a otro de la barrera.

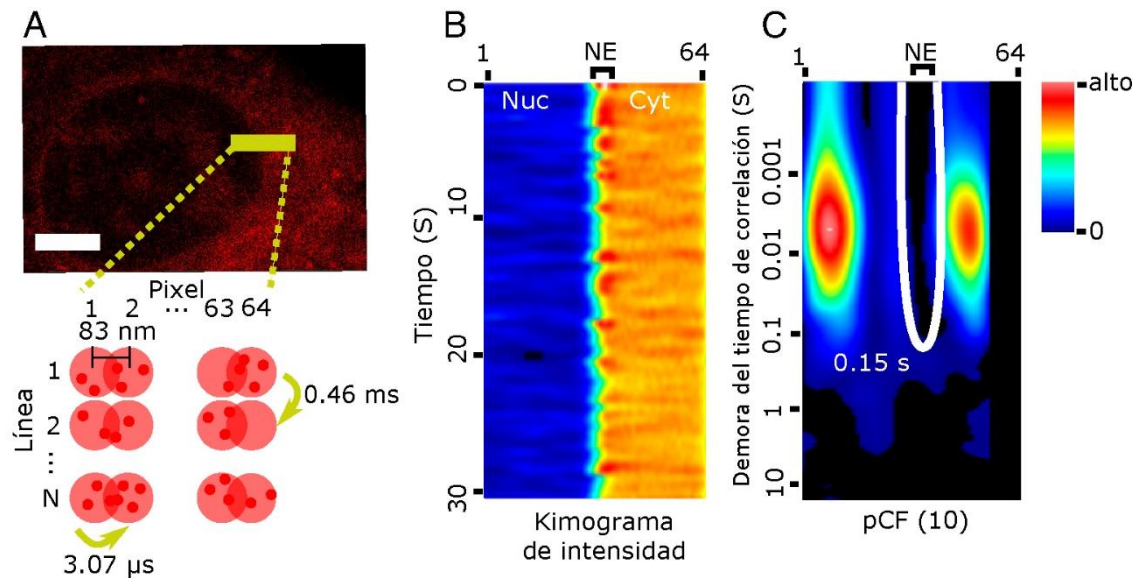


Figura 49. Representación esquemática del análisis de pCF en una dimensión. A: Imagen de microscopía confocal de una célula transfectada. Barra de escala: 5 μ m. Una línea de 64 píxeles de largo se escanea de forma repetida de izquierda a derecha (tiempo de escaneo 0.46 s, 3.07 μ s por píxel, tamaño de píxel 83 nm). B: La intensidad de fluorescencia a lo largo de las líneas se representa como un kimograma, en donde los píxeles a lo largo de la línea corresponden al eje horizontal y el tiempo corresponde al eje vertical. NE: envoltura nuclear. C: La función de correlación se calcula píxel por píxel y se representa por posición de píxel en el eje horizontal y tiempo en escala logarítmica en el eje vertical. El arco blanco indica un alargamiento en el transporte a través de la envoltura nuclear.

Con el objetivo de analizar la movilidad de cápside dentro de cada compartimento, se repitió el experimento de pCF en líneas en las proximidades de la envoltura nuclear. Se graficaron las pCF correspondientes a la movilidad intra núcleo (Figura 50, curva roja) e intra citoplasmática (Figura 50, curva azul) a 3 horas post transfección. El análisis de la movilidad intra compartimento, demostró que tanto en núcleo como en citoplasma, existen dos poblaciones de partículas de cápside de movilidad diferencial, dados por dos tiempos de correlación distintos en cada compartimento (dos máximos en la función de correlación, marcados con flechas en la Figura 50).

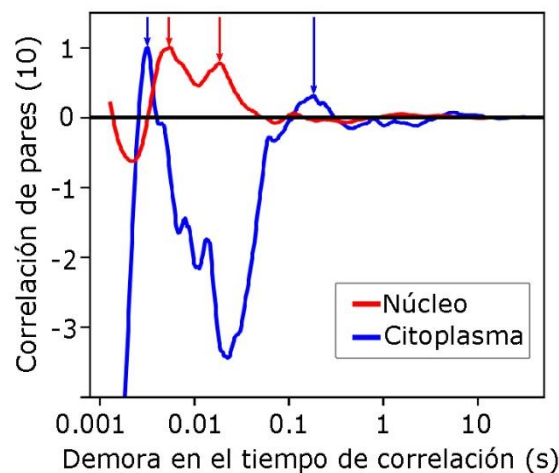


Figura 50. El análisis por pCF de la movilidad citoplasma-citoplasma (azul) y núcleo-núcleo (rojo) de C-mCherry muestra dos picos en la función de pCF, lo que sugiere la presencia de dos poblaciones de proteínas con distinta movilidad. Se muestran curvas de pCF promediadas y normalizadas evidencian que C-mCherry se mueve más rápido en el citoplasma ($D=40 \mu\text{m}^2/\text{s}$) que en el núcleo ($D=20 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Ambos compartimentos presentan dos picos en la función de correlación lo que sugiere la presencia de dos poblaciones con movilidad diferente.

La población de movilidad rápida se mueve en el citoplasma con un coeficiente de difusión aparente de $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (tiempo de correlación ~ 3 ms), y en el núcleo con un coeficiente de difusión aparente de $20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (tiempo de correlación ~ 6 ms) (Figura 50).

Con el fin de caracterizar el origen del segundo tiempo de correlación, se analizaron 17 mediciones de al menos 5 experimentos independientes. En todos los casos analizados, encontramos dos poblaciones de C-mCherry caracterizadas por un tiempo de correlación rápido (en el orden de los mseg) y lento (en el orden de los cientos de mseg). Los resultados fueron graficados en *violin plots* (Figura 51) en los que se observa que la distribución de los tiempos de correlación de los componentes rápidos y lentos son muy diferentes. El componente de alta movilidad (tiempos de correlación cortos) presenta una distribución angosta mientras que el grupo de baja movilidad (tiempos de correlación largos) posee una distribución más ancha. Estos resultados sugieren dinámicas de difusión diferentes a lo largo de las distintas regiones subcelulares generadas por la presencia de obstáculos o interacciones entre cápside y componentes celulares. Estos resultados demuestran, adicionalmente, que el mecanismo principal en la dinámica de la proteína de cápside tanto en núcleo como en citoplasma es la difusión simple, que corresponde al componente movilidad más rápida. La tendencia observada está de acuerdo con los experimentos de RICS realizados previamente (Figura 45). El componente de movilidad lenta corresponde a una población de proteínas que podría estar interactuando localmente con componentes celulares, que presentan coeficientes de difusión aparentes de $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para núcleo y citoplasma respectivamente.

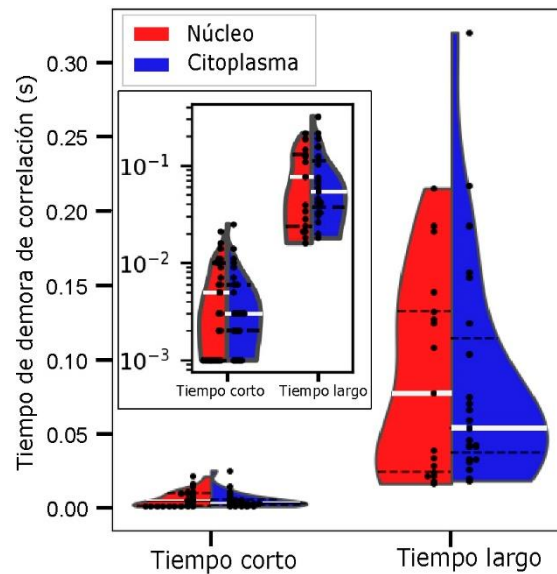


Figura 51. *Violin plots* de la distribución de los tiempos de correlación para las poblaciones de rápida y lenta movilidad en núcleo (rojo) o citoplasma (azul) de células transfectadas con el ARN de DENV C-mCherry. Se observa una diferencia en la distribución de los tiempos de correlación entre los componentes rápidos y lentos. Los puntos negros son tiempos medidos, las líneas blancas son la media y las líneas negras punteadas son los percentiles 25% y 75%. *Inset:* mismos datos mostrados en escala logarítmica.

Con el fin de abordar el estudio del transporte núcleo-citoplasmático de la proteína de cápside en células infectadas, empleamos la técnica pCF enfocándonos en líneas que cruzan la membrana nuclear. El transporte de proteínas celulares a través de la envoltura nuclear ocurre a través del complejo del poro nuclear (*nuclear pore complex*, NPC), que representa el sitio de intercambio de moléculas entre el compartimento citoplasmático y nuclear. Proteínas pequeñas de entre 10-15 kDa son capaces de atravesar el poro por difusión, mientras que proteínas de 40-60 kDa en adelante normalmente utilizan algún mecanismo de translocación activa que involucra el reconocimiento de sus NLS por componentes del NPC. La relevancia de las NLS en el transporte de cápside al núcleo durante la infección ha sido discutidas en el Capítulo 2. Sin embargo, una de las preguntas que se encuentra aún abierta es la posibilidad de que cápside, una vez en el núcleo, conserve la capacidad de salir. Con el objetivo de analizar si la proteína de cápside se mueve únicamente de citoplasma a núcleo o es capaz de moverse de forma bidireccional, aplicamos la técnica de pCF en líneas de escaneo que cruzan la envoltura nuclear en las dos direcciones. Si la proteína de cápside es capaz de cruzar la envoltura en cualquier dirección, esperamos ver un retraso del movimiento debido a la presencia de una barrera. Si, por lo contrario, la proteína es incapaz de cruzar, se evidenciará una falta de correlación. Se realizaron transfecciones en células BHK con el virus DENV C-mCherry y se trazaron líneas de escaneo perpendiculares a la membrana nuclear en las células con fluorescencia roja. A partir de estos datos, se calculó la pCF en la dirección de entrada o salida del núcleo (Figura 52 A y B, respectivamente), y se observó en ambos casos un retraso en el tiempo de correlación (señalado como un arco blanco, Figura 52 A y B). Este análisis bidireccional demostró que existe una barrera y un tiempo de correlación característico no solo en la dirección citoplasma-núcleo, sino también en la dirección inversa, mostrando por primera vez que existe un transporte bidireccional (Figura 52). Además, el tiempo de transporte a través de la barrera resultó ser similar en promedio en ambas direcciones (de 2 a 11 ms para la entrada y de entre 8 y 19 ms para la salida), lo que sugiere que el mecanismo de translocación debería ser similar para la entrada y la salida. Los tiempos obtenidos coinciden con tiempos de translocación compatibles con

un mecanismo activo, similar a lo reportado para otras proteínas (Dange et al. 2008; Kubitschek et al. 2005; Sun et al. 2008; Yang, Gelles, and Musser 2004).

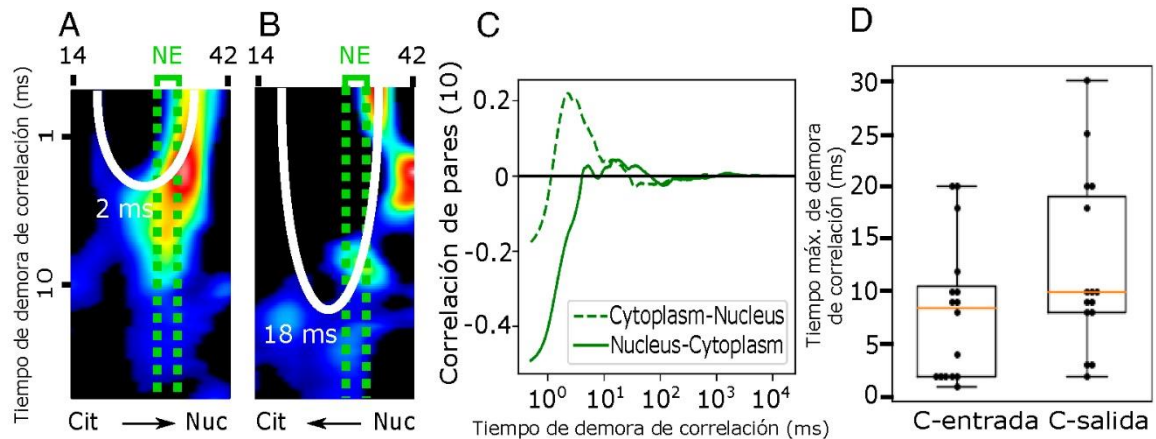


Figura 52. El análisis por pCF revela que cápside se importa y exporta. A y B: kimogramas de pCF analizados en la dirección citoplasma-núcleo (A) y en la dirección núcleo-citoplasma (B). La envoltura nuclear está marcada con una línea verde. La línea blanca indica el retraso en el movimiento de la proteína dado por la presencia de una barrera. NE: envoltura nuclear C: Función de correlación promedio de las líneas analizadas en ambas direcciones calculadas a partir de los kimogramas. El transporte de citoplasma a núcleo está favorecido comparado con cápside difundiéndose en la dirección opuesta, indicado por la amplitud de los picos. D: diagramas de caja para cada dirección. La entrada de C al núcleo es en un rango intercuartil de 2 a 11ms y la salida es en un rango de 8 a 19ms.

En base a los resultados obtenidos, la fracción de proteína que entra al núcleo es aproximadamente 5 veces mayor que la proteína que difunde en la dirección opuesta, lo que sugiere que la importación de C-mCherry es más eficiente que la salida, dadas las amplitudes de los picos de la función de correlación. Además, observamos que el tiempo que le lleva a la proteína cruzar la envoltura nuclear también depende de la dirección de transporte (Figura 52 D). En conclusión, estos experimentos permitieron demostrar por primera vez que la proteína de cápside puede entrar y salir del núcleo durante una infección, y que la importación al núcleo se encuentra favorecida por sobre la exportación. En este sentido, es necesario abordar nuevos experimentos en el futuro para comprender la relevancia funcional de este comportamiento bidireccional de cápside durante la replicación viral.

Los resultados presentados en este capítulo describen la aplicación de una técnica no invasiva y útil para el estudio de moléculas únicas en el microambiente celular. Mediante el uso de clones infecciosos con fusiones de la proteína viral de interés a marcadores fluorescentes, fue posible estudiar el flujo molecular de cápside en una célula infectada y evidenciar las barreras que afectan su movilidad. La proteína de cápside de DENV presentó un comportamiento particular en las cercanías de la envoltura nuclear y en la superficie de los nucleolos, que no se observó en los experimentos con el virus de ZIKV. El análisis de la capacidad de atravesar barreras de DENV C-mCherry demostró que cápside, luego de ingresar al núcleo, no permanece retenida, sino que una parte de la población es exportada. En experimentos futuros que exceden este trabajo de tesis se estudiará el comportamiento de la proteína de cápside de ZIKV en forma comparada con la de DENV. Esto permitirá determinar si la movilidad diferencial se debe a la presencia de barreras específicas para la proteína de cada virus y si esto tiene una relevancia funcional durante la infección.

Discusión Capítulo 3

Las proteínas de cápside de DENV y ZIKV ejercen múltiples funciones y se asocian con componentes celulares en los distintos compartimentos de la célula infectada. Sin

embargo, la relevancia de estas interacciones y las funciones de su localización subcelular aún son desconocidas. En este capítulo, estudiamos a esta proteína a partir de herramientas generadas en el laboratorio combinadas con técnicas avanzadas de correlación de fluorescencia. Las técnicas de correlación de fluorescencia aplicadas no son invasivas, y permiten alcanzar una resolución de molécula única en experimentos con gran cantidad de moléculas. Con estos estudios encontramos que la proteína de cápside de DENV posee una movilidad espacial heterogénea en los distintos compartimentos celulares durante el ciclo de replicación. Esta movilidad característica no fue detectada para la proteína de ZIKV, destacando un comportamiento diferencial de estas proteínas.

Los clones infecciosos con fusiones fluorescentes constituyen una herramienta potente para el seguimiento de la proteína de cápside en células infectadas. Los resultados presentados demuestran que la fusión de cápside a proteínas fluorescentes no interfirió con la localización normal de la proteína durante la infección, que se acumuló en citoplasma, LDs y nucleolos (Figura 42). Esta observación se encuentra en concordancia con lo reportado previamente por Wang y colaboradores, quienes evaluaron la localización nuclear de cápside de DENV fusionada a múltiples copias de GFP (Wang et al. 2002). Cabe destacar que, si bien la incorporación de mCherry/GFP al genoma permitió que el virus realice un ciclo completo de replicación, la incorporación de la fusión de C-mCherry/GFP a la partícula viral no fue eficientemente detectada. Esto quiere decir que frente a la presencia de cápside sola y C-mCherry/GFP, la proteína nativa fue positivamente seleccionada. Si bien esta es una limitación en caso de querer estudiar el proceso de encapsidación o desnudamiento con proteínas marcadas, la herramienta desarrollada fue de gran utilidad para estudios intracelulares que ocurren durante la replicación. Empleando el modelo descrito, utilizamos la técnica de RICS para estimar la movilidad espacial de cápside en los distintos compartimentos subcelulares durante la replicación viral. En este sentido, observamos que, en cada compartimento, la proteína posee un coeficiente de difusión macroscópico diferente, evidenciando que cápside difunde de forma más rápida en el citoplasma que en el núcleo (Figura 45).

Por otro lado, mediante la técnica de correlación de pares en dos dimensiones, generamos mapas de conectividad que nos permitieron visualizar el camino recorrido en promedio por las proteínas de cápside en las células infectadas. Estos análisis revelaron un comportamiento particular de la proteína de cápside de DENV en la proximidad de la membrana nuclear y del nucleolo, que no se observó con la proteína de cápside de ZIKV ni con el control de mCherry sola (Figura 47). El movimiento ordenado de cápside en la interfase núcleo-citoplasma evidencia la presencia de una barrera física constituida por la membrana nuclear. Por otro lado, en la interfase nucleoplasma-nucleolo se observa que cápside encuentra un obstáculo para la difusión, lo que obliga a la molécula a rodear esta estructura. A pesar de esto, la proteína es capaz de ingresar al nucleolo y acumularse en altas concentraciones. Los nucleolos, como se mencionó en el Capítulo 1, son organelas sin membrana y se encuentran organizadas por una separación de fase líquido-líquido. A pesar de ser organelas dinámicas, poseen una estructura empaquetada muy densamente. En los experimentos de 2D-pCF observamos que la movilidad de DENV C-mCherry cambia de forma abrupta cuando se encuentra dentro del nucleolo. En este sentido, es posible que la movilidad de cápside se encuentre restringida por interacciones con componentes del nucleolo como ácidos nucleicos y proteínas, o incluso en estados de agregación. Sin embargo, como fue discutido en el Capítulo 2 las funciones de cápside en el nucleolo aún se desconocen.

Las diferencias de movilidad encontradas entre la proteína de cápside de DENV y la de ZIKV indican que pueden existir determinantes específicos en las regiones variables entre ambas proteínas que le confieran propiedades diferentes en relación a su

interacción con componentes celulares. Se encuentra descrito que la proteína de cápside de ZIKV presenta una estructura más compacta que la de DENV y que su región pre- $\alpha 1$ *loop* con contenido de aminoácidos hidrofóbicos puede afectar el modo en que la proteína interacciona con membranas (Shang et al. 2018). Además de la diferencia estructural, puede existir un factor temporal relacionado con la cinética de infección de ambos virus. Como se detalló en el Capítulo 2, se observaron diferencias en la acumulación de cápside en los compartimentos subcelulares en cada etapa de la infección, motivo por el cual no es posible descartar que en tiempos más tardíos la proteína de cápside de ZIKV adopte un comportamiento similar al observado en DENV. Estos resultados abren nuevos interrogantes sobre la temporalidad del comportamiento de cápside, que serán abordados en el futuro.

Con respecto a la organizada movilidad de cápside de DENV en la cercanía de la membrana nuclear, una posible hipótesis es que pueda cumplir una función en el NPC. En relación a esto, se ha reportado previamente en estudios empleando al virus de la Encefalitis Equina de Venezuela (VEEV), un virus de ARN de polaridad positiva, que su proteína de cápside se acumula en el núcleo celular y en los NPCs, siendo esta distribución altamente citotóxica para la célula (Atasheva et al. 2008; Garmashova et al. 2007). Estos estudios demostraron que cápside es un inhibidor del tráfico núcleo-citoplasmático y que es capaz de bloquear la entrada al núcleo de una serie de proteínas con NLS. El mecanismo responsable de esta inhibición sería la interacción de cápside con importinas α/β y con la exportina CRM1, formando un compuesto tetramérico que bloquea el NPC (Atasheva et al. 2010). Estas funciones podrían ser las responsables de una fuerte inhibición de la transcripción celular observada en infecciones con VEEV. Por otro lado, se observó que la proteína NS3 de ZIKV se localiza en la región perinuclear (Hou et al. 2017), y que NS3 tanto de ZIKV como de DENV alteran el funcionamiento del NPC mediante el clivaje de nucleoporinas, sus principales componentes (de Jesús-González et al. 2020). En este sentido es de nuestro interés evaluar en estudios futuros si la proteína de cápside de DENV puede ejercer algún rol en la regulación del tráfico núcleo-citoplasmático durante la infección.

En este capítulo, a partir de los estudios de correlación de fluorescencia en distintos compartimentos, se determinó que la proteína de cápside de DENV es capaz de transportarse entre el núcleo y el citoplasma de forma bidireccional. La evidencia previa y los experimentos detallados en el Capítulo 2 sugieren que la entrada de cápside al núcleo sería por medio de un mecanismo activo. Si bien existen estudios que caracterizan la entrada de proteínas virales al núcleo por interacción con importinas α/β , como es el caso de la proteína de cápside de WNV (Bhuvanankantham et al. 2010, 2009), la proteína de cápside de VEEV (Atasheva et al. 2010) o la proteína NS5 de DENV (Brooks et al. 2002) hasta el momento no se ha caracterizado la salida del núcleo de dichas proteínas virales. Se ha descrito que la proteína NS5 de DENV contiene una señal de exportación nuclear (NES) muy conservada, que es reconocida por la exportina CRM1 (Rawlinson et al. 2009). La inhibición de la exportación de NS5 al citoplasma resultó en una alteración de la cinética de producción viral, lo cual se usó como evidencia de una función moduladora sobre la replicación. Sin embargo, el efecto pleiotrópico del inhibidor sobre la célula resta valor a dichas observaciones. En un trabajo reciente, se determinó que la proteína NS3 de ZIKV puede ser detectada en el núcleo en tiempos tempranos de la infección, y que es exportada mediante el reconocimiento de una NES por parte de CRM1 (De Jesús-González et al. 2022). En ambos casos, se hipotetizó que la exportación de las proteínas virales al citoplasma debe estar regulado, posiblemente por fosforilación y consecuente exposición de sus NES, con el fin de ser transportados en etapas tardías de la infección. Hasta el momento, no se han descrito NES en las proteínas de cápside de Flavivirus. Se requieren estudios adicionales para determinar las posibles implicancias de la salida de cápside del núcleo hacia el citoplasma y el mecanismo responsable de este transporte. Por otro lado, aquí presentamos resultados sobre la dinámica de cápside tanto en el citoplasma como en el núcleo de una célula

infectada. Los resultados indican que cápside muestra un comportamiento de dos poblaciones: uno de movilidad lenta y otro de movilidad rápida. La forma dominante de movimiento de cápside sería la rápida, por un mecanismo de difusión simple, mientras que la minoritaria tendría baja movilidad por la interacción con componentes celulares. El hallazgo de poblaciones de movilidad rápida y lenta son evidencia de la potencia y sensibilidad de la metodología utilizada, ya que es capaz de discernir el coeficiente de difusión aparente de partículas que se encuentran libres y se desplazan rápidamente de partículas que se encuentran formando complejos.

Los resultados obtenidos hasta este momento evidencian un comportamiento complejo de las proteínas de cápside en su tránsito en las células infectadas. Sería muy interesante aprovechar las herramientas generadas para evaluar la movilidad de las mutantes de NLS estudiadas en el Capítulo 2 y buscar evidencias acerca del mecanismo de entrada y salida involucrado. Estos interrogantes serán abordados en nuestro laboratorio en el futuro.

Los resultados presentados en este capítulo son parte de los trabajos “*Dengue Virus Capsid Protein Dynamics Reveals Spatially Heterogeneous Motion in Live-Infected-Cells*” y “*In vivo pair correlation microscopy reveals dengue virus capsid protein nucleocytoplasmic bidirectional movement in mammalian infected cells*” publicados en la revista Scientific Reports en 2020 y 2021, respectivamente.

Capítulo 4: Estudio de elementos de ARN en la región codificante de cápside de ZIKV necesarios para la replicación viral.

Introducción

El genoma de Flavivirus como DENV y ZIKV consiste de una molécula de ARN que codifica un único marco abierto de lectura y contiene elementos regulatorios de ARN tanto en la región codificante como en las regiones 5' y 3' UTR. Estos elementos están compuestos por estructuras secundarias de ARN que incluyen interacciones locales y de larga distancia (Gebhard et al. 2011; Nicholson and White 2015). El genoma viral se comporta como una estructura dinámica, que adquiere distintas conformaciones durante el ciclo viral influenciadas por los procesos de traducción y replicación, y por componentes celulares. Estudios realizados en nuestro laboratorio han descrito que es necesario un equilibrio entre conformaciones lineales y circulares del genoma para la síntesis del ARN (Filomatori et al. 2006; Villordo et al. 2010) (Figura 53). Ambas conformaciones involucran secuencias que se pliegan en estructuras que son mutuamente excluyentes pero esenciales para la replicación. Esto indicaría que existe una flexibilidad de plegamiento de los genomas en la célula infectada y que el genoma adoptaría distintas conformaciones durante el ciclo de replicación (de Borba et al. 2019; Villordo et al. 2010).

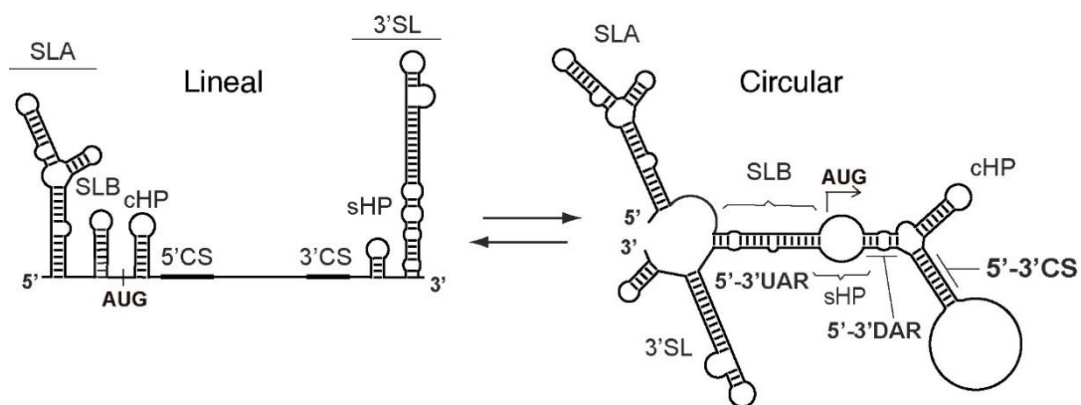


Figura 53. Representación esquemática de los cambios conformacionales en la transición entre la conformación lineal o circular del genoma de DENV. En la conformación lineal se representan estructuras secundarias locales. En la conformación circular algunas estructuras locales se desorganizan para interactuar con regiones a larga distancia en el genoma. Las interacciones a larga distancia conservadas se encuentran indicadas (UAR, DAR, CS). Se indica en ambos casos la posición del codón de inicio de la traducción. Modificado de Gebhard et al. 2011.

Estudios recientes han realizado aportes sobre el plegamiento de los genomas de ARN a partir de mapeo global de interacciones ARN-ARN (Dethoff et al. 2018; Huber et al. 2019; Li et al. 2018; Ziv et al. 2018). Sin embargo, es necesario asignar funciones a los elementos de ARN identificados con el objetivo de definir sus roles en la infección viral. Se han identificado una serie de estructuras de ARN conservadas presentes en las regiones codificantes y no codificantes del genoma que son moduladoras de la síntesis de ARN viral (Akiyama et al. 2021; de Borba et al. 2019; Clyde et al. 2008; Friebe and Harris 2010; Liu et al. 2013; Villordo and Gamarnik 2009). Además, existen interacciones de larga distancia que median la circularización del genoma y el acercamiento entre el sitio de unión de la polimerasa viral en el extremo 5' con el sitio de inicio de la síntesis de ARN en el extremo 3' (Figura 53). Las interacciones a larga distancia están mediadas por secuencias complementarias conservadas que incluyen la secuencia conservada (*conserved sequence*, CS) (Khromykh et al. 2001), la secuencia río arriba del AUG

(*upstream AUG region*, UAR) (Alvarez, Lodeiro, et al. 2005) y la región río abajo del AUG (*downstream AUG region*, DAR) (Friebe, Shi, and Harris 2011). Existen adicionalmente interacciones de larga distancia en la secuencia codificante de cápside de DENV que estimulan la circularización del genoma y la replicación viral (de Borba et al. 2015). Por otro lado, un elemento conservado en la secuencia codificante de cápside llamado *capsid-coding region hairpin* (cHP) se ha propuesto que modula la iniciación de la traducción (Clyde and Harris 2006) y es requerido para la replicación del ARN de DENV y WNV (Clyde et al. 2008). Además, se ha reportado que algunas estructuras en los genomas de Flavivirus tienen múltiples funciones: por un lado, se pliegan localmente y por otro, están involucradas en interacciones a larga distancia. Un ejemplo de superposición funcional lo constituye el sHP presente en el 3'UTR de DENV en la forma lineal (Figura 53). La misma secuencia participa en interacciones de larga distancia en la forma circular del genoma. Se ha demostrado que mutaciones que estabilizan el sHP o la complementariedad a larga distancia, cambiando el equilibrio hacia la conformación lineal o circular respectivamente, no son viables. Al respecto, se seleccionaron virus que revierten espontáneamente para recomponer la estabilidad relativa de las dos estructuras en competencia (Villordo et al. 2010).

Los Flavivirus alternan en la naturaleza entre mosquitos y humanos y, por lo tanto, deben replicar de forma eficiente en ambos hospedadores. Existen estructuras de ARN presentes en los genomas virales que son esenciales para la infección en ambos hospedadores, mientras que existen otros elementos de ARN que poseen roles específicos de hospedador (Filomatori et al. 2017; Pallarés et al. 2020; Villordo et al. 2016; Villordo and Gamarnik 2013). En nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios en los cuales la restricción de la replicación de DENV a un solo hospedador resulta en un proceso de adaptación del virus en el que se seleccionan mutaciones que ofrecen ventajas para la replicación en ese hospedador. Por ejemplo, la adaptación del DENV a mosquito resulta en la acumulación de mutaciones en una región definida del 3'UTR, lo que aumenta la replicación viral en mosquito, pero reduce la infección en células humanas (de Borba et al. 2019; Villordo et al. 2015). Esto quiere decir que hay elementos del genoma que cumplen funciones diferentes en los dos hospedadores.

Una de las herramientas más útiles para estudiar la función de elementos de ARN del genoma, sus regiones codificantes y las proteínas virales son los clones infecciosos. Dichos clones consisten en una copia de ADN del genoma viral en un plásmido bacteriano, y su uso ha permitido el estudio del efecto de mutaciones en el contexto de genomas virales completos. El ARN viral generado a partir de la transcripción *in vitro* utilizando el plásmido como templado es infeccioso y su transfección en células resulta en un ciclo completo de replicación. La manipulación genética de clones infecciosos ha permitido definir funciones tanto de proteínas virales como de estructuras de ARN. Además, la introducción de genes reporteros como luciferasa o GFP (de Borba et al. 2015; Mondotte et al. 2007; Samsa et al. 2009; Schoggins et al. 2012) ha permitido evaluar las funciones de elementos virales en cada etapa del ciclo de replicación. A partir de la medición de la actividad del gen reportero en función del tiempo post transfección o infección, es posible evaluar la traducción del ARN viral, su posterior amplificación y encapsidación. Asimismo, dada la alta tasa de error de la polimerasa viral, es posible seleccionar mutaciones espontáneas en cultivo que revierten un fenotipo introducido por una mutación, y así obtener información de las funciones de los distintos elementos del genoma. Como fue mencionado anteriormente, existen señales en el genoma de Flavivirus que se encuentran presentes en la región codificante de cápside y, por lo tanto, existe una superposición de funciones a nivel del ARN: por un lado, se encuentran señales en estructuras de ARN y por otro lado se encuentra la secuencia que codifica a la proteína. En el laboratorio diseñamos clones infecciosos con genes reporteros que nos permiten disociar las señales en el ARN que actúan en *cis* de

las funciones de la proteína de cápside. Este diseño incluye la duplicación de la secuencia codificante para la proteína de cápside de tal forma que una copia queda posicionada en el lugar previo a la secuencia del gen reportero, actuando como señales en *cis* y la segunda copia codifica a la proteína. Esto nos permite introducir mutaciones o deleciones en las secuencias con posibles funciones en *cis*, conservando una copia de cápside intacta.

En este capítulo, mediante el uso de clones infecciosos y virus reporteros de ZIKV, identificamos estructuras de ARN que se encuentran en la región codificante que son necesarias para la infección viral. Empleando una batería de mutaciones en la región codificante para la proteína de cápside, identificamos una estructura que cumple un rol esencial para la síntesis de ARN viral en células de mosquito, pero solo tiene una función estimuladora en células de mamífero. Por medio de un estudio detallado de la estructura de ARN identificada pudimos proponer un mecanismo de acción.

Resultados

En los capítulos anteriores, se abordó el estudio de la proteína de cápside desde un enfoque bioquímico y funcional. En esta última sección, abordamos el estudio de su secuencia codificante y la presencia de posibles señales presentes en estructuras de ARN. Trabajos previamente publicados en DENV y ZIKV indican que dentro de los primeros 80 nucleótidos de la región codificante de cápside existen elementos de circularización necesarios para la síntesis de ARN (5'DAR, cHP, 5'CS, Figura 54) (de Borba et al. 2015; Friebe et al. 2011; Gebhard et al. 2011; Khromykh et al. 2001; Liu et al. 2017). Si bien se han predicho estructuras río abajo de estas secuencias (estructuras G, K, L, Figura 54), no se han asignado funciones a estos elementos. Bajo la hipótesis de que la proteína de cápside no es necesaria para la síntesis del genoma viral, pero sí para etapas posteriores como encapsidación y liberación de partículas, generamos un virus mutante con una deleción casi completa de la secuencia de cápside. El objetivo de esta deleción fue generar un virus capaz de replicar, pero incapaz de formar partículas virales. Para ello, diseñamos una deleción en el clon infeccioso de ZIKV (Pallarés et al. 2020) que abarca una porción mayoritaria de cápside, solo conservando los elementos 5'DAR, cHP y 5'CS, altamente conservados en los Flavivirus y descritos como esenciales para la replicación de este grupo de virus (Figura 54).

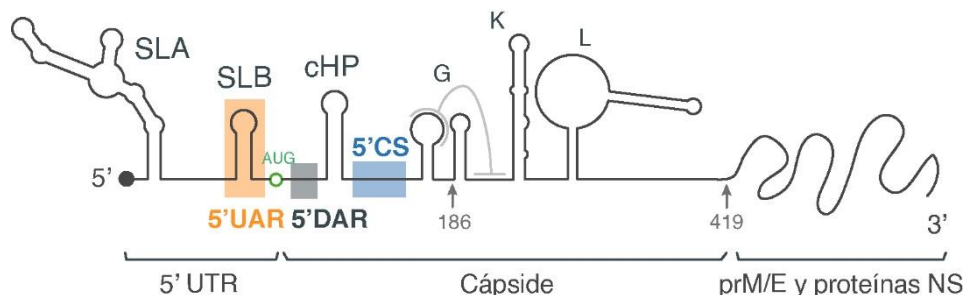


Figura 54. Elementos de ARN presentes en el 5'UTR y secuencia de cápside de ZIKV conservados en los Flavivirus: Se representan las estructuras en el 5'UTR (SLA y SLB) y los elementos predichos en la región codificante de cápside (cHP, G, K, L), incluyendo los primeros 420 nucleótidos del genoma viral. Se indica con flechas la posición de los nucleótidos 186 y 419. En colores se encuentran sombreadas las regiones que participan de interacciones a larga distancia: en naranja UAR, en gris DAR y en celeste CS.

El virus mutante $\Delta C_{186-419}$ constituye la deleción de los nucleótidos 186 hasta 419 del virus (indicado con flechas en la Figura 54), y es la máxima deleción posible de la secuencia de cápside sin afectar los elementos de ARN previamente descritos (Figura 55 A). Se generaron por transcripción *in vitro* los ARN infecciosos del virus WT y el mutante, y se transfectaron en células de mosquito C6/36 y de mamífero BHK. Se

tomaron vidrios a distintos tiempos post transfección y se realizaron inmunofluorescencias contra el antígeno NS3 de ZIKV (Figura 55 B y C). Para el ARN correspondiente al virus WT, se observó acumulación de la proteína viral entre los 1 y 3 días y efecto citopático (CPE) a 6 y 8 días post transfección, en células de mamífero y de mosquito respectivamente (Figura 55 B y C). En el caso del ARN correspondiente al mutante, en células BHK se observó acumulación de proteínas virales (células positivas para inmunofluorescencia) a 2 y 3 días post transfección, mientras que en células C6/36 no se observó señal a ningún tiempo. Esta primera observación sugiere un defecto del virus mutante en células de mosquito correspondiente a etapas tempranas de la replicación.

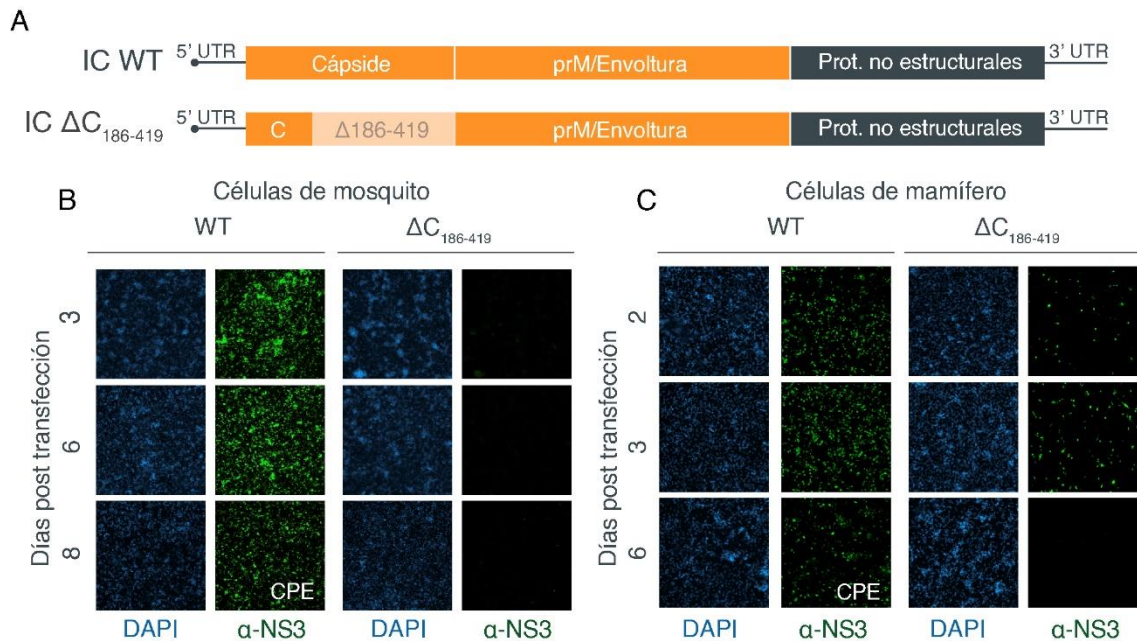


Figura 55. A: Esquema de los clones infecciosos (IC) de ZIKV WT y la deleción de la secuencia de cápside. Los ARN infecciosos se transfectaron en células de mosquito (B) o de mamífero (C) y se realizaron inmunofluorescencias en función del tiempo contra la proteína NS3 (verde). También se incluyen imágenes de DAPI para observar la integridad de la monocapa celular en cada tiempo evaluado. Se observa un retraso en la infección del virus mutante con respecto al virus WT en células de mamífero, mientras que en células de mosquito no se observan señal positiva. Objetivo: 10X

En base a estos resultados y con el fin de determinar las funciones del ARN en *cis* para la etapa de la replicación del genoma viral y las funciones de la proteína de cápside en encapsidación viral, introdujimos la deleción mencionada en un clon infeccioso que permite dissociar dichas funciones. El clon infeccioso reportero consiste en una modificación del clon infeccioso original con una inserción del gen que codifica para la luciferasa de Renilla (IC e IC Rep, respectivamente, Figura 56). Este clon infeccioso contiene la duplicación de la secuencia codificante completa de cápside, mencionada en la introducción. Esto nos permite realizar mutaciones en la copia de la secuencia de cápside cercana al 5'UTR con posibles funciones en *cis*, dejando una copia sin afectar la secuencia aminoacídica de la proteína. El gen de luciferasa permite evaluar las distintas etapas de la infección viral. El ARN infeccioso es transfectado en células y funciona como un ARNm que inicialmente es traducido. La medición de cuentas de luciferasa a tiempos cortos post transfección (<12 hpt) indica la traducción del ARN entrante (Figura 56). Posteriormente, el ARN sufre degradación por las ARNasas celulares por lo que se observa una disminución en las cuentas de luciferasa. Por último, dado que el clon infeccioso cuenta con la totalidad de las proteínas virales, es capaz de replicar el genoma de ARN generando nuevas copias, lo que se traduce en un aumento de actividad de la luciferasa (Figura 56). En la Figura 56 se representa a modo de

ejemplo lo esperado para un virus WT y un virus control no replicativo (con una mutación en la polimerasa viral NS5), en el cual se observa un aumento de actividad de luciferasa a tiempos cortos debido a la traducción del ARN entrante pero luego se observa la caída, mostrando una amplia diferencia con el WT ya que este ARN no puede ser amplificado. El virus reportero es capaz de replicar y propagar de forma eficiente tanto en células de mosquito como de mamífero (Pallarés et al. 2020).

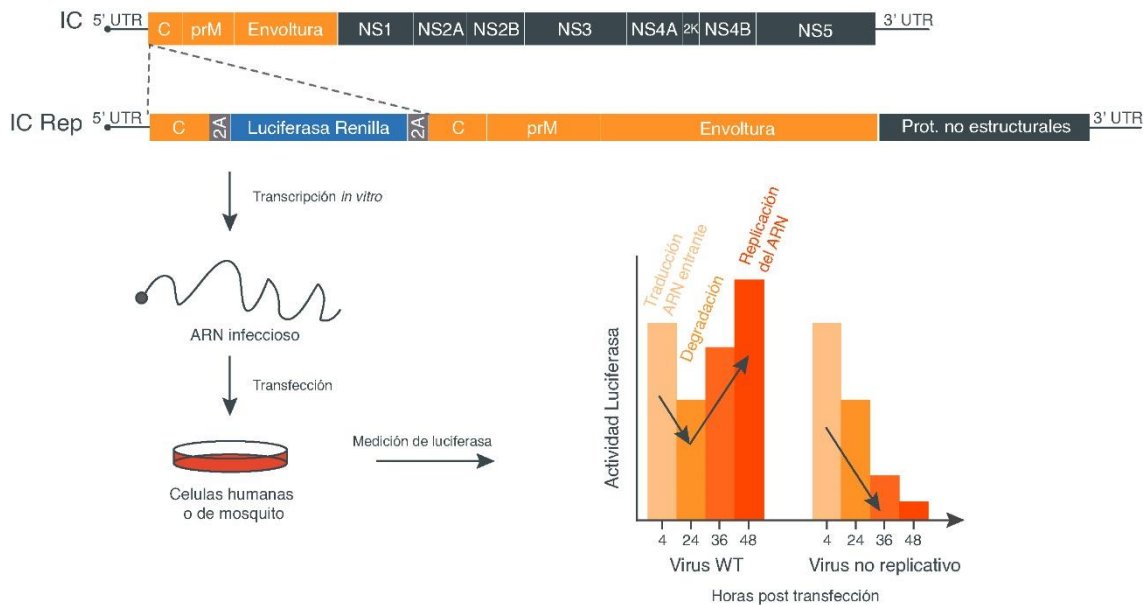


Figura 56. Representación esquemática de la construcción del clon infeccioso reportero (IC Rep) y el procedimiento de transcripción *in vitro* seguido de transfección. El clon infeccioso reportero incorpora una segunda copia de cápside y un gen de luciferasa flanqueado por secuencias de autoclivaje 2A. En el gráfico se muestra un ejemplo de la medición de la actividad luciferasa en función del tiempo post transfección para un virus *wild type* y un virus no replicativo en células de mosquito. Por encima del gráfico se indican las etapas de la infección viral.

En este contexto, mediante genética reversa, generamos el virus recombinante IC Rep $\Delta C_{186-419}$ (que contiene la delección únicamente en la primera copia de cápside, Figura 57 A), a partir del cual se sintetizó *in vitro* el ARN infeccioso. El ARN del virus WT y mutante $\Delta C_{186-419}$ se transfectó en células C6/36 de mosquito o BHK de mamífero junto con el control no replicativo (NS5 Mut). Se evaluó la actividad luciferasa en función del tiempo post transfección. Mientras que en células de mosquito la amplificación del genoma se evidencia a las 24 hpt (Figura 57 B), en el caso de células de mamífero a las 12 hpt ya se observa amplificación del ARN si se compara con el control no replicativo (Figura 57 C). Los niveles de luciferasa suben en ambas líneas celulares en función del tiempo, mientras que para el control no replicativo decae a partir de 12 y 24 hpt en células de mamífero o mosquito, respectivamente. El virus mutante IC Rep $\Delta C_{186-419}$ muestra un retraso en la replicación en células de mamífero, mientras que en células de mosquito es incapaz de replicar, ya que presenta niveles de actividad luciferasa similares al virus NS5 Mut en estas células (Figura 57 B y C). Estos resultados indican que existen determinantes en la secuencia codificante de cápside que actúan como estimuladores de la replicación viral en células de mamífero, y son esenciales para la replicación en células de mosquito, evidenciando un fenotipo específico de hospedador.

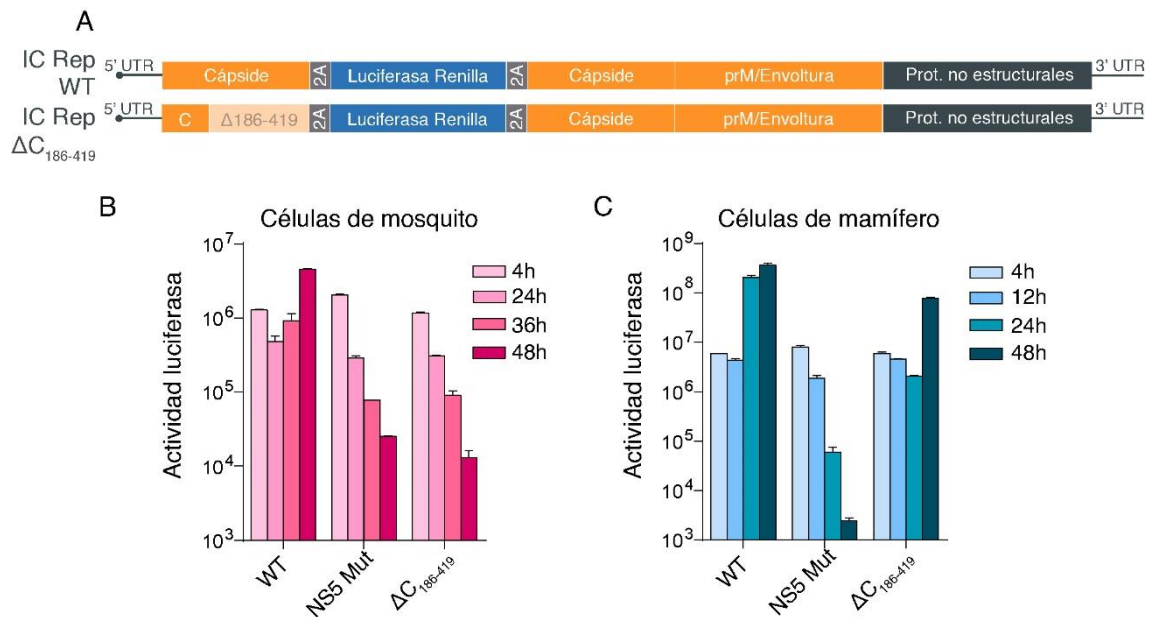


Figura 57. A: Representación esquemática de los clones infecciosos reporteros (IC Rep) de ZIKV WT y la delección de cápside. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. NS5 Mut corresponde a un virus reportero con una mutación en el sitio catalítico de la polimerasa viral NS5, y constituye un control no replicativo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de analizar cuál/cuáles de los elementos de ARN deletados son los responsables del fenotipo observado, diseñamos una serie de mutantes por medio de la delección de cada una de las estructuras propuestas en esta región (estructura G, K y L) y la región no estructurada (M) en el contexto del virus reportero (Figura 58 A). Las mutaciones fueron introducidas mediante PCR por solapamiento y clonado por restricción en el clon infeccioso reportero (ver Materiales y métodos), y los clones positivos fueron verificados por secuenciación. Se generaron *in vitro* los ARN de ΔG , ΔK , ΔL y ΔM , y se transfectaron en células junto con el virus WT y el virus mutante $\Delta C_{186-419}$ como referencia. Los resultados indican que las delecciones de las estructuras K y L, y la región M resultaron en virus con niveles de replicación similares al virus WT. Sin embargo, la delección de la estructura G reprodujo un fenotipo similar al observado para la mutante $\Delta C_{186-419}$ (Figura 58 B y C). La mutante ΔG mostró un retraso en la replicación en células de mamífero, mientras que fue incapaz de replicar en células de mosquito, evidenciando nuevamente una función dependiente del hospedador. Además, los resultados obtenidos sugieren que no existen elementos adicionales río abajo de la estructura G que modulen la replicación del ARN viral, ya que la delección de cada uno de los otros elementos mostraron un fenotipo similar al WT.

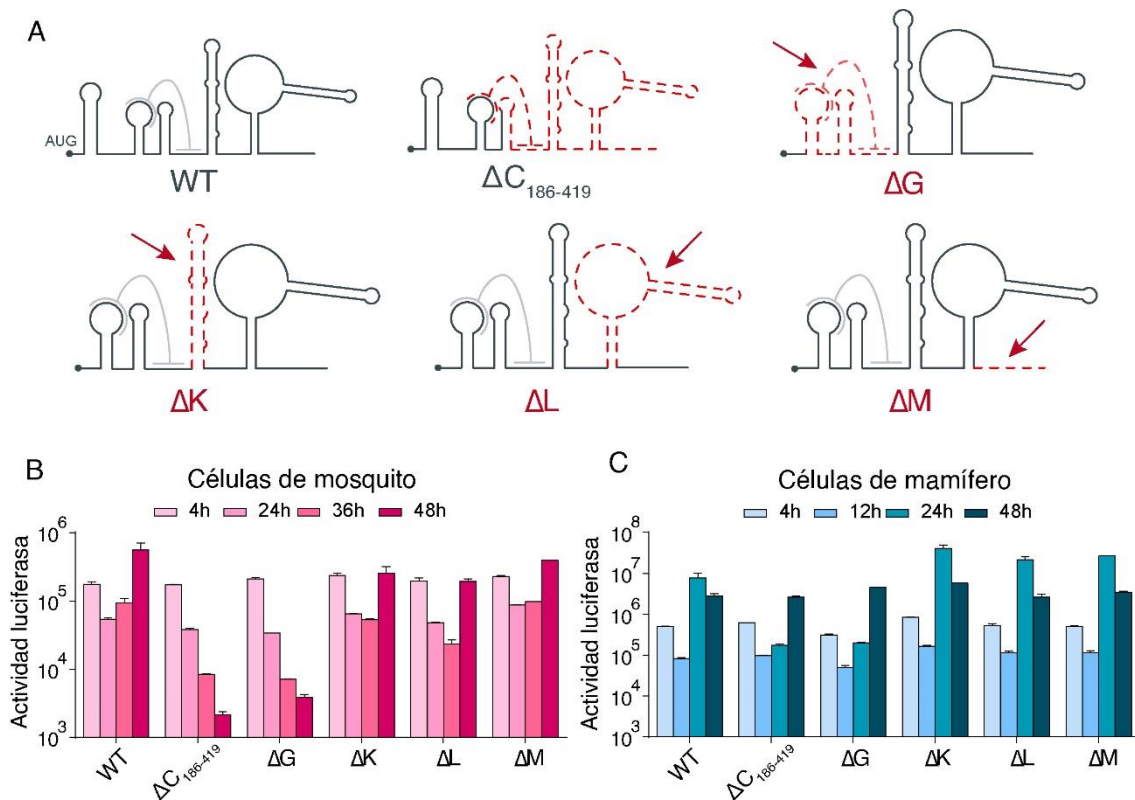


Figura 58. A: Representación esquemática de las deleciones introducidas en el clon infeccioso reportero de ZIKV. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. A modo de comparación, se incluye en el experimento la mutante $\Delta C_{186-419}$. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, definimos que el elemento identificado en la secuencia codificante para cápside es esencial para la replicación viral en células de mosquito y actúa como *enhancer* en células de mamífero. La región identificada se encuentra conservada en otros Flavivirus y fue evaluada previamente en el contexto del DENV4 y WNV en células de mamífero (Liu et al. 2013). En base a estudios recientes en los que se determina experimentalmente la estructura secundaria y global del genoma de ARN de ZIKV (Huber et al. 2019; Li et al. 2018; Ziv et al. 2018), y teniendo en cuenta el estudio en DENV4 y WNV, comparamos los plegamientos posibles del elemento G en el contexto de ZIKV. Este análisis indica que la interpretación de los datos experimentales pueden acomodar dos estructuras equivalentes para la secuencia del elemento G (Figura 59). Estos estudios además predicen una interacción a larga distancia con la región 3'UTR que podría funcionar como una extensión de la secuencia conservada CS (en verde en la Figura 59) (Ziv et al. 2018). Teniendo en cuenta toda la información disponible hasta el momento, planteamos como hipótesis de trabajo que la estructura A de la Figura 59, se formaría predominantemente en la forma lineal del genoma, debido a que las bases involucradas en la interacción con el 3'UTR se encontrarían formando parte de un *stem* a nivel local. Por otro lado, la estructura B se formaría predominante en la forma circular del genoma, en la cual habría nucleótidos del elemento G que estarían directamente involucrados en la interacción a larga distancia con secuencias del 3'UTR. De este modo, existiría un equilibrio dinámico entre las estructuras A y B, lo que explicaría la reactividad de estos nucleótidos en los experimentos de plegamiento (Ziv et al. 2018).

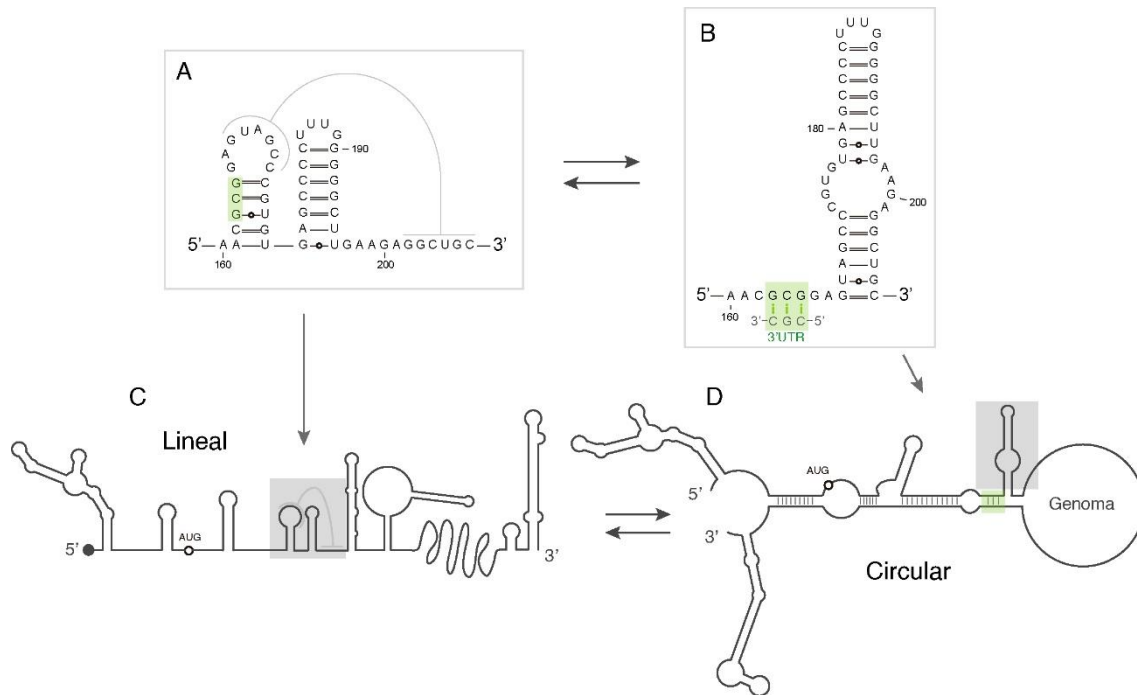


Figura 59. Representación de las posibles estructuras del elemento G del genoma de ZIKV. La estructura A fue predicha en Huber et al. 2019 y Ziv et al. 2018 (Huber et al. 2019; Ziv et al. 2018), y la estructura B fue publicada en Li et al. 2018 (Li et al. 2018). C y D corresponden a las conformaciones lineales y circulares del genoma de ZIKV y se indican en gris las dos representaciones de la estructura G. En verde se señalan las bases involucradas en la interacción a larga distancia predicha entre la secuencia de G y la secuencia presente en el 3'UTR.

Para facilitar el análisis, tomaremos el plegamiento A como modelo. En base a este modelo, nos propusimos estudiar cada uno de los elementos estructurales que componen la estructura de G. En principio, definimos cuatro unidades de estudio o subelementos de G. La estructura A cuenta con dos *stem loops* (*Stem 1* y *2*, marcados en naranja y rojo, respectivamente en la Figura 60) y una estructura de *pseudoknot*, que involucra la interacción del *loop* del *Stem 1* con una secuencia río abajo del *Stem 2* (marcado en azul en la Figura 60). Adicionalmente, como se señaló previamente, existe una interacción a larga distancia predicha con una secuencia del 3' UTR, que competiría con la formación del *Stem 1* (en verde en la Figura 60). Esta hibridización está compuesta por tres nucleótidos que podrían interaccionar tanto con los nucleótidos del *Stem 1* como con tres nucleótidos presentes en el 3'UTR de ZIKV (Figura 59). En este sentido, en base a los cuatro elementos identificados en la estructura G (señalados en colores en la Figura 60), diseñamos una serie de mutantes que alteran cada elemento de forma individual con el objetivo de descomponer las distintas funciones importantes para la replicación viral.

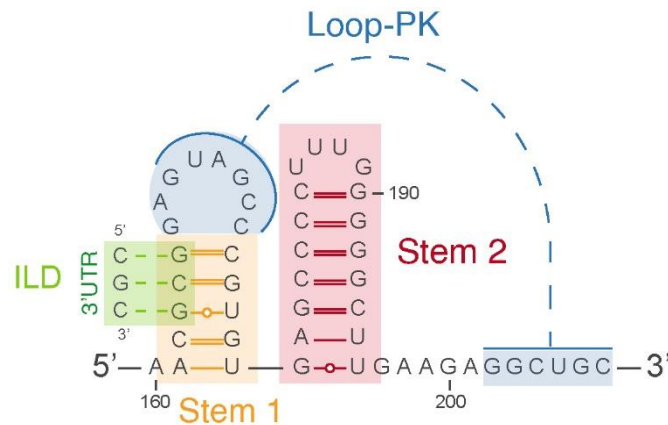


Figura 60. Estructuras del elemento G. Se encuentran en colores los cuatro subelementos estructurales definidos como modelo de estudio: *Stem 1*, *Stem 2*, *Loop-PK* y la interacción de larga distancia (ILD).

Primero, analizamos los requerimientos presentes en el *Stem 1*. Para ello, diseñamos una batería de virus mutantes que alteran los apareamientos que lo conforman. Las mutaciones diseñadas incluyen cambios de a dos apareamientos (*Stem 1*: M1 y M2) o mutaciones de a un apareamiento (*Stem 1*: M3 y M4) del *Stem 1* (Figura 61 A). Las mutantes M1, M3 y M4 a su vez, no alteran las bases potencialmente involucradas en la interacción a larga distancia. Las mutantes M2 y M4 constituyen mutaciones sinónimas, es decir, que no alteran el aminoácido codificado en esa región de cápside. Por último, generamos un virus adicional que reconstituye el apareamiento de bases introducido en la mutante M3, que denominaremos M3R (Figura 61 A). Todas las mutaciones fueron introducidas mediante PCR por solapamiento y clonado por restricción en el plásmido del clon infeccioso reportero (ver Materiales y métodos), y los clones positivos fueron verificados por secuenciación. Los ARN correspondientes al virus WT, al control no replicativo, y cada una de las mutantes descritas (M1, M2, M3, M4 y M3R) se transfectaron en células de mamífero y de mosquito. Todas las mutaciones que alteraron el apareamiento del *Stem 1* (M1, M2, M3, M4) mostraron niveles de actividad luciferasa en función del tiempo similares al control no replicativo en células de mosquito, indicando que fueron incapaces de replicar en estas células (Figura 61 B). El virus mutante M3R, que recompone la formación del *Stem 1* con una secuencia diferente, es capaz de revertir el fenotipo de replicación en células de mosquito, aunque con un importante retraso. La actividad luciferasa para M3R aumenta 5 veces de 36 a 48 hpt, mientras que en el caso de la mutante M3 (que contiene un menor número de cambios que la M3R, pero que rompen el *Stem 1*) se observa una disminución de 36 a 48 hpt. Esto indica que mantener la estructura del *Stem 1* es necesario, pero la secuencia nucleotídica específica de esa región también cumple una función. Es de destacar que las mutantes puntuales M3 y M4 contienen un único cambio en todo el genoma de ZIKV y que este es suficiente para impedir la replicación del virus en células de mosquito, lo que indica la relevancia de este elemento. Las transfecciones de los mismos ARNs virales en células de mamífero mostraron niveles de luciferasa compatibles con replicación viral al compararlas con el control no replicativo (Figura 61 C). Sin embargo, todas mostraron un retraso en la replicación en relación al ARN WT. Cabe señalar que la mutante M1 fue la de mayor retraso, seguida de la M2, pero ninguna de ellas perdió la capacidad de amplificar el ARN, lo que contrasta con lo observado en células de mosquito. Los resultados indican que la integridad del *Stem 1* es importante para la replicación en ambos hospedadores, y que mutaciones puntuales que alteran su formación impiden la replicación en células de mosquito.

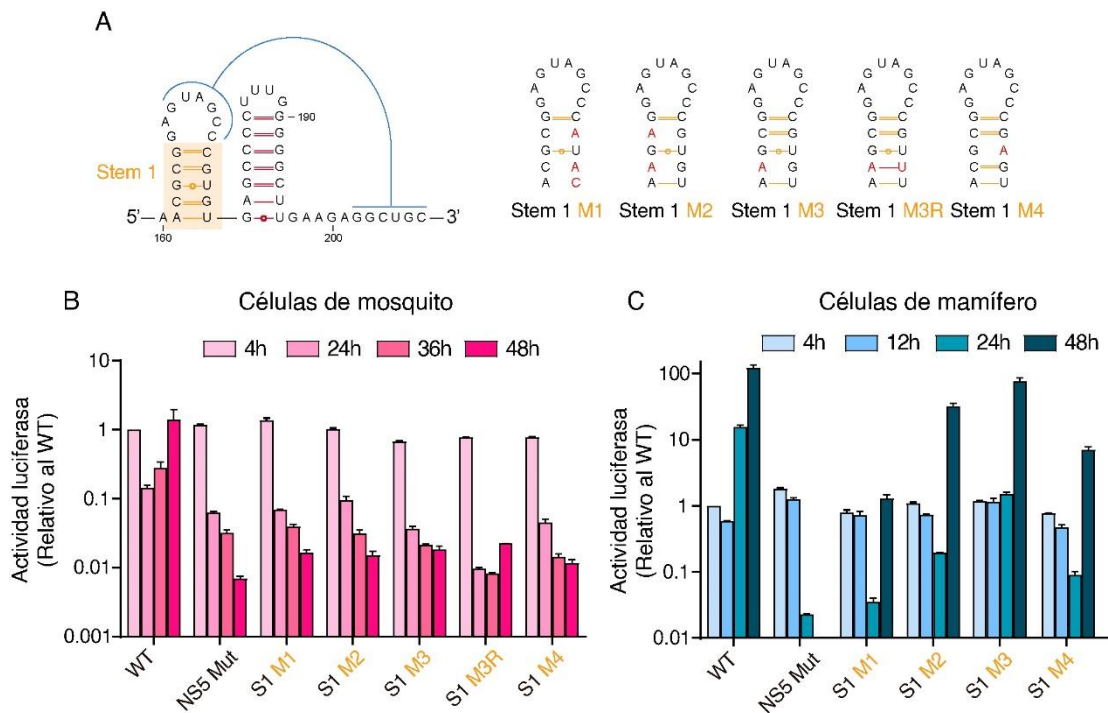


Figura 61. A: Representación esquemática del *Stem 1* de la estructura G WT y las mutaciones realizadas. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del *Stem 2* en el elemento G, diseñamos tres mutantes en el clon infeccioso reportero de ZIKV: una mutante que altera dos apareamientos del *Stem 2* y por lo tanto lo desarma (*Stem 2 M1*), una mutante que recompone la estructura (*Stem 2 M2*) y una delección completa del *stem loop* correspondiente a esta región (Δ *Stem 2*) (Figura 62 A). Los tres ARN virales mutados se transflectaron en células de mosquito y de mamífero, junto con el virus WT y el control no replicativo. La medición de actividad luciferasa demostró que las tres mutantes fueron capaces de replicar tanto en células de mosquito como de mamífero en niveles similares al virus WT (Figura 62 B y C, respectivamente). Estos resultados indican que tanto el desarmado del *Stem 2* como la delección completa del *stem loop* que lo contiene no alteraron significativamente la replicación viral tanto en mosquito como en mamífero en las condiciones ensayadas.

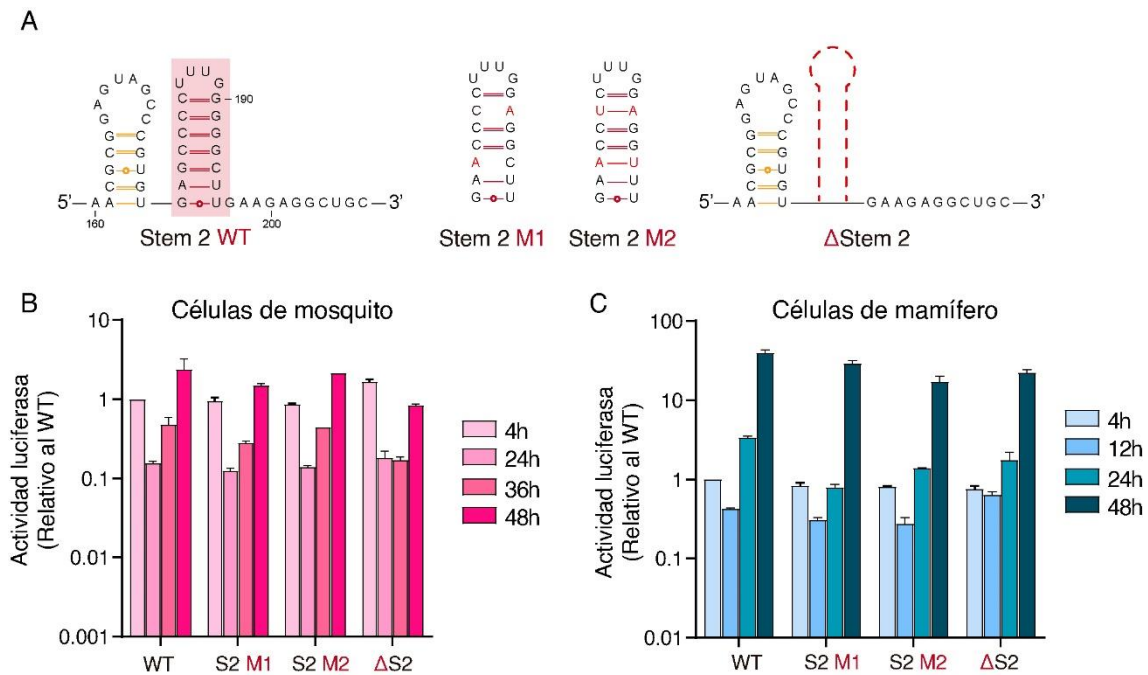


Figura 62. A: Representación esquemática del *Stem 2* de la estructura G WT y las mutaciones realizadas. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el fin de estudiar la funcionalidad de la estructura que comprende la interacción del PK entre el *loop* del *Stem 1* y la secuencia río abajo del elemento G, diseñamos una nueva serie de mutantes. Para facilitar la visualización de la complementariedad de bases, en la Figura 63 A se representa la interacción de PK en forma de *stem*. En este caso, diseñamos un mutante que altera la interacción de PK (PK M1) y, de forma similar a lo realizado previamente, una mutante que reconstituye el apareamiento de bases (PK M2). Además, con el objetivo de determinar la función de las bases del *loop* no involucradas en el PK, se generó la mutante *Loop M1*, donde se cambiaron dos nucleótidos del *loop* que no participan del PK (Figura 63 A). Los ARN virales de las construcciones mencionadas fueron transfectadas junto al WT y el control no replicativo en células de mamífero y de mosquito. En cada caso se evaluó la actividad luciferasa en función del tiempo. Los niveles de actividad luciferasa señalaron que los virus mutantes evaluados fueron capaces de replicar en niveles similares al virus WT tanto en células de mosquito como en células de mamífero (Figura 63 B y C). En el caso del virus mutante *Loop M1*, se observó un leve retraso en células de mosquito a 36 hpt (Figura 63 B) que no fue evidente en células de mamífero (Figura 63 C). Los resultados sugieren que la interacción que forma el PK no sería requerida para la función de la estructura G, y la secuencia del *loop* podría ejercer un rol estimulador durante la replicación viral en células de mosquito.

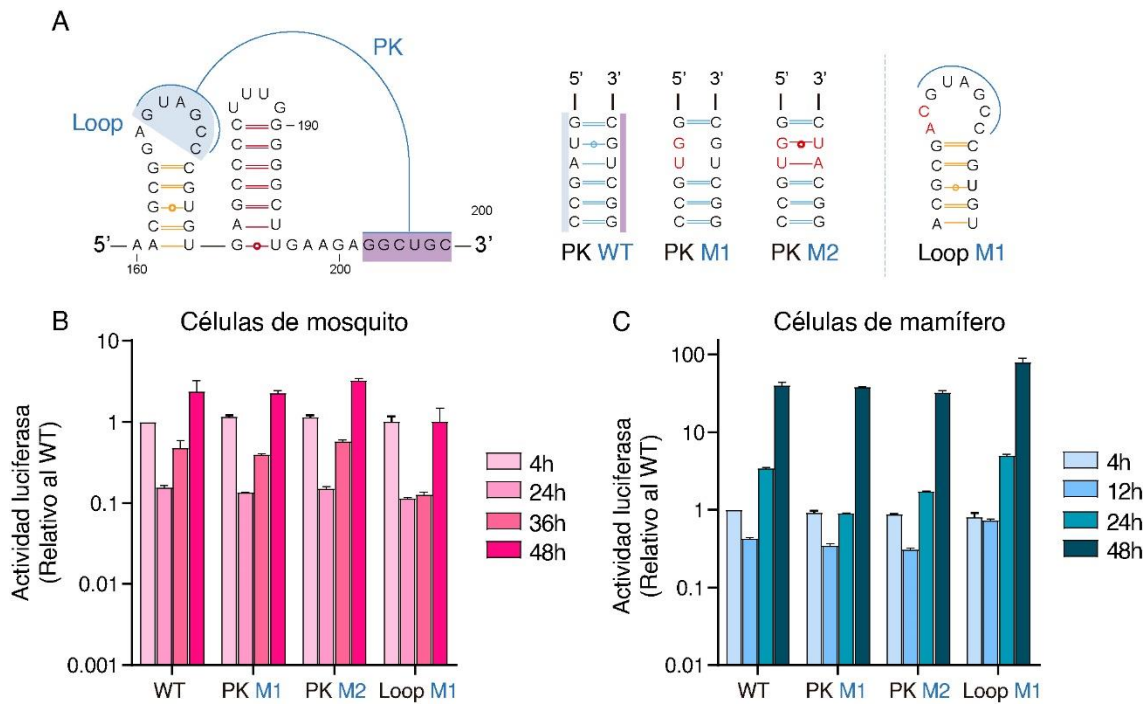


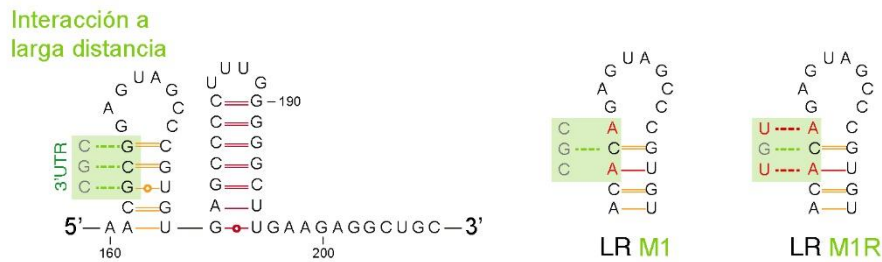
Figura 63. Representación esquemática del PK y el *loop* de la estructura G WT y las mutaciones realizadas. El PK WT se representa en forma de *stem*, cuyas hebras complementarias se encuentran sombreadas en celeste y en violeta. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el fin de evaluar la interacción potencial de larga distancia con secuencias del 3'UTR, diseñamos una serie de mutantes en la región del *Stem 1* que participarían en el apareamiento de larga distancia. Debido a las características de la interacción en estudio, el número de mutaciones que alteren la complementariedad a larga distancia sin alterar la integridad del *Stem 1* son limitadas. Tomando esto en consideración, se diseñaron virus mutantes tanto en la secuencia codificante de cápside como en el extremo 3'UTR del virus. La mutación LR M1 altera dos apareamientos de bases de la interacción de larga distancia, aunque también debilita al *Stem 1* (Figura 64 A). La mutación LR M1R reconstituye la complementariedad de la interacción a larga distancia alterada en LR M1 mediante modificaciones en el extremo 3'UTR del virus (Figura 64 A). En otras palabras, el virus LR M1R contiene mutaciones tanto en la secuencia de cápside como en el 3'UTR de forma simultánea en un mismo ARN. Se generó por transcripción *in vitro* el ARN de las mutantes descritas, junto con el virus WT y el virus no replicativo, y se transfectaron en células de mamífero y de mosquito. Los resultados de medición de la actividad de luciferasa muestran que el virus LR M1 fue incapaz de replicar en células de mosquito (similar al virus NS5 Mut) mientras que la reconstitución recuperó la capacidad de replicar a pesar de conservar un debilitamiento del *Stem 1* (LR M1 vs LR M1R, Figura 64 B). Esto indica que, si bien la alteración en simultáneo del *Stem 1* y la interacción a larga distancia es letal para el virus en células de mosquito, la reconstitución de la complementariedad con el extremo 3'UTR fue suficiente para rescatar el fenotipo. En células de mamífero, ambas mutantes, LR M1 y M1R, fueron capaces de amplificar al ARN, aunque retrasadas en relación al WT. Asimismo, se observó un leve aumento de la replicación a 24 hpt al comparar LR M1 con LR M1R, sugiriendo un posible rol de la interacción de larga distancia como estimulante de la replicación en células de mamífero (Figura 64 C).

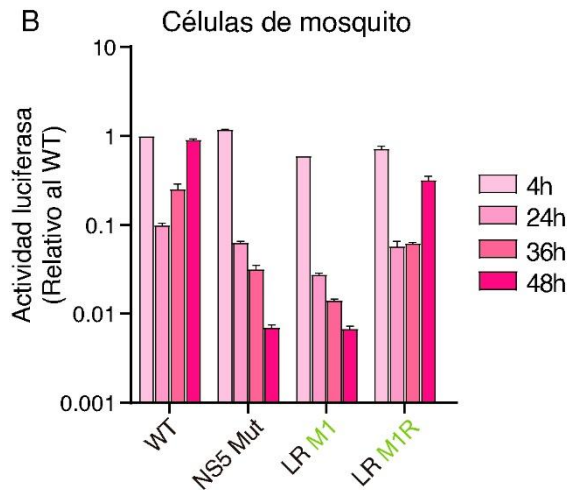
En conjunto, estos resultados sugieren que, si bien la integridad del *Stem 1* es importante para la replicación viral en ambos hospedadores, alterar la interacción de

larga distancia que competiría con el *Stem 1* también es requerido para la replicación en mosquito y modulador en mamífero. Es importante resaltar que la reconstitución de la interacción 5'-3' logra recuperar un fenotipo que muestra un moderado retraso respecto al WT, tanto en células de mosquito como de mamífero. Es posible que ambas estructuras se encuentren en un equilibrio en conformaciones lineales y circulares (Figura 59), y por lo tanto ejerzan roles distintos durante la infección viral. En este sentido, la interacción a larga distancia podría por un lado tener un efecto estimulador de la circularización del genoma y por otro un rol en la modulación de la función de la estructura G en la replicación.

A



B



C

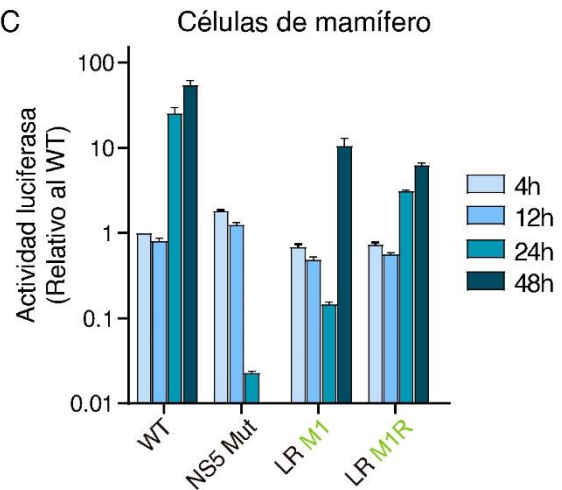


Figura 64. Representación esquemática de la estructura G WT, la interacción a larga distancia y las mutaciones realizadas. Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito (B) o mamífero (C) en función del tiempo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el fin de confirmar el requerimiento de los subelementos de la estructura G en la replicación de ZIKV, incorporamos mutaciones que interfieren con el *Stem 1* o la interacción a larga distancia en el clon infeccioso de ZIKV (presentado en este capítulo en la Figura 55). Se seleccionaron mutaciones que impidieron la replicación viral en el contexto del virus reportero. Las mutaciones fueron introducidas mediante PCR por solapamiento y clonado por restricción, de forma similar a lo detallado previamente, y los clones positivos fueron verificados por secuenciación. Así, se generaron los ARN virales correspondientes a los virus mutantes *Stem 1* M1, *Stem 1* M3, *Stem 1* M4 y LR M1 y se transfectaron células de mamífero y de mosquito junto con el ARN del virus WT. Se realizaron inmunofluorescencias en función del tiempo post transfección contra la proteína NS3 con el objetivo de evaluar la replicación y propagación viral. Ninguna de las mutantes evaluadas fue capaz de propagar en células de mosquito, dado que no se observaron células positivas hasta los 8 dpt (Figura 65). Estos resultados confirman lo observado en los experimentos con los virus reporteros. En cambio, las transfecciones de los ARN virales en células de mamífero dieron lugar a infecciones productivas. Todas

las mutantes ensayadas mostraron propagación viral, aunque con un retraso con respecto al virus WT (Figura 65). Los virus obtenidos en células BHK fueron empleados para obtener *stocks*. Al respecto, fue posible evidenciar diferencias en fenotipos de placa de lisis en comparación con las producidas por el virus WT (Figura 65). Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos con el virus reportero en las Figura 61 y Figura 64. Es importante aclarar que la mutante *Stem 1 M4* fue diseñada como una mutación sinónima, que conserva la codificación de una arginina, el mismo residuo presente en el virus WT. Esta mutación descarta cualquier efecto generado *en trans* por un cambio de aminoácido en la proteína de cápside, y es un cambio único en el genoma de ZIKV que, al igual que las otras, impide la replicación viral en células de mosquito.

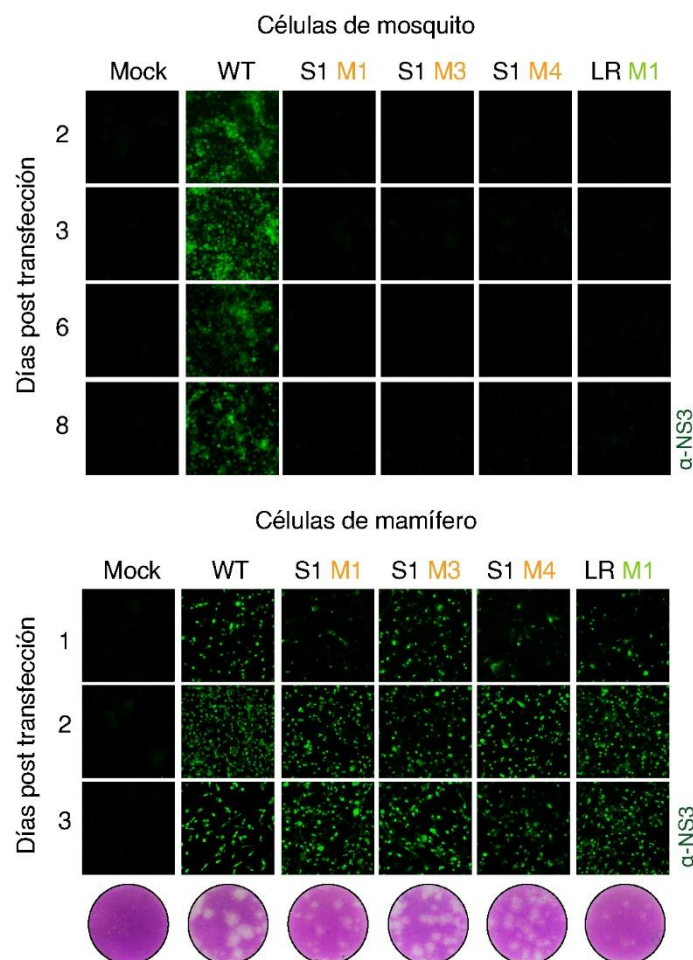


Figura 65. Inmunofluorescencias contra el antígeno NS3 (en verde) de células transfectadas con el virus de ZIKV WT y virus mutantes, en células de mosquito (paneles superiores) y células de mamífero (paneles inferiores). *Mock* corresponde a un control sin transfectar. En células de mosquito no fue posible observar señal positiva para los virus mutantes. En células de mamífero se evidenció un retraso en la progresión de la infección de los virus mutantes con respecto al virus WT. Objetivo: 40X para células de mosquito y 20X para células de mamífero.

Con el fin de evaluar si los *stocks* virales obtenidos en células BHK para cada mutante podrían ser infectivos en células de mosquito, utilizamos dichos virus para infecciones en estas células de mosquito. Estas infecciones no evidenciaron replicación viral. Por este motivo y con el fin de buscar selecciones, mutaciones compensatorias o reversiones, realizamos pasajes sucesivos de los sobrenadantes de células de mosquito infectadas cada 7 días. Los sobrenadantes fueron empleados para infectar monocapas nuevas de células de mosquito (P1-P3) (Figura 66 A). En cada caso, se evaluó la replicación y propagación viral por inmunofluorescencia (Figura 66 B). Dos de los virus mutantes, *Stem 1 M3* y *Stem 1 M4*, adquirieron la capacidad de propagar en células de

mosquito. En el pasaje 3, ambos mutantes fueron capaces de infectar la monocapa completa de forma similar al virus WT (Figura 66 B). Con el fin de identificar reversiones o mutaciones, los sobrenadantes de infección del pasaje 3 fueron cosechados y utilizados para la extracción de ARN viral seguido de RT-PCR para su secuenciación. Los productos de amplificación de la región correspondiente a la estructura G fueron clonados y se seleccionaron 20 clones de cada mutante para su secuenciación. El mutante *Stem 1* M3 revirtió a la secuencia WT, ya que la mutación inicial fue 162A, y el 100% de los clones revirtió a 162C, recomponiendo el fenotipo (Figura 66 C). Por otro lado, para el mutante *Stem 1* M4, la mayoría de los clones secuenciados (75%) contenía una pseudo-reversión que recompone el apareamiento de bases del *Stem 1* con una secuencia diferente. Mientras que la mutación original contenía el reemplazo 176A, se seleccionó un virus con 176C, que generó un nuevo apareamiento de base GC. El resto de los clones (25%) contenía la reversión a la secuencia WT (176U) con un apareamiento de base UG. La selección de un virus que recupera la estructura del *Stem 1* con una secuencia diferente al WT es una fuerte evidencia del requerimiento de esta estructura de ARN para la replicación de ZIKV en células de mosquito. Con el fin de confirmar que la mutación seleccionada es la responsable de la recuperación del fenotipo, la mutación pseudo revertante 176C fue introducida en un virus reportero. Su transfección en células de mosquito junto al WT y al control no replicativo, de forma similar a los experimentos realizados previamente, demostró que la mutante 176C es capaz de replicar en niveles similares al virus WT (Figura 66 D).

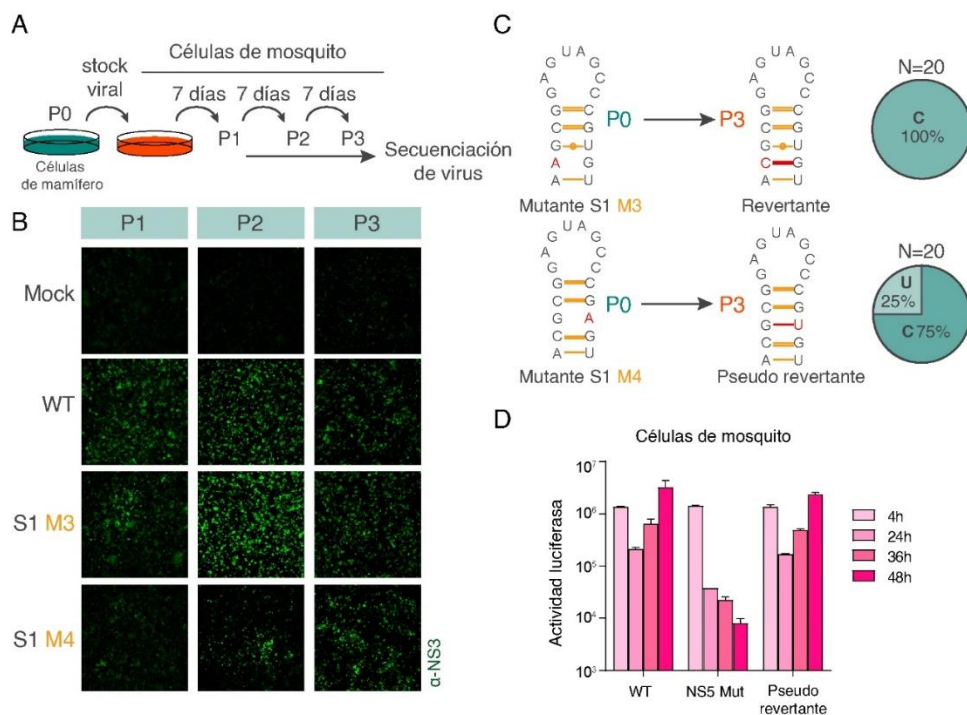


Figura 66. A: Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado para clonar y buscar virus replicativos. Los *stocks* producidos en células de mamífero (P0) fueron utilizados para infectar células de mosquito y el sobrenadante de infección fue utilizado para infectar nuevas monocapas. Se realizaron tres pasajes seriados en células de mosquito (P1, P2 y P3). El pasaje 3 fue cosechado para realizar RT-PCR y los productos de amplificación fueron clonados y secuenciados. B: Inmunofluorescencias contra el antígeno NS3 (en verde) de células de mosquito infectadas a 7dpi con los sobrenadantes de cada pasaje de virus ZIKV WT y virus mutantes. Objetivo: 10X. C: Representación esquemática de los virus mutantes S1 M3 y S1 M4 en el *stock* inicial (P0) y luego de tres pasajes seriados (P3), en donde se hallaron revertantes y pseudo revertantes que recompone el *Stem 1*. Los gráficos de torta de la derecha muestran la proporción de clones obtenidos de cada variante. D: Actividad luciferasa de los virus reporteros en células de mosquito en función del tiempo. Los valores de actividad luciferasa corresponden al promedio \pm desvío estándar.

Con estos estudios, concluimos que la estructura G presente en la región codificante de la proteína de cápside del ZIKV es un elemento de ARN fundamental para la replicación viral en células de mosquito. En particular, la integridad del *Stem 1* de la estructura G es esencial para la replicación en estas células, mientras que el mismo elemento en células de mamífero tendría un efecto estimulador de la replicación. La aparición de virus revertantes y pseudo revertantes que recomponen el *Stem 1* resaltan el rol esencial de esta estructura para la síntesis de ARN en la infección por ZIKV. Además, determinamos que es posible el establecimiento de una interacción a larga distancia con el 3'UTR viral, que se encuentra superpuesto con el *Stem 1* de G. Mediante el diseño de distintas mutaciones con el objetivo de disociar ambas funciones, pudimos determinar que la interacción constituye un elemento requerido en células de mosquito, con una función moduladora en células de mamífero. Los resultados presentados en este capítulo se encuentran es una etapa avanzada de escritura para su publicación.

Discusión Capítulo 4

Los genomas de los Flavivirus contienen estructuras secundarias y terciarias de ARN que interactúan con componentes virales y de la célula hospedadora y poseen importantes funciones en el ciclo de replicación. Además, estos genomas se caracterizan por la presencia de secuencias invertidas complementarias en los extremos del ARN. Estas secuencias permiten la asociación de los extremos del genoma mediante apareamiento de bases entre ARN-ARN y regulan la circularización del genoma viral para la replicación. En el proceso de generar herramientas basadas en clones infecciosos de ZIKV empleadas en esta tesis para estudiar a la proteína de cápside, identificamos una estructura de ARN presente en la secuencia codificante de esta proteína que mostró ser funcional para la replicación viral, con un rol específico de hospedador. Esta estructura resultó ser esencial para la replicación viral en células de mosquito, mientras que su mutación atenuó al virus para infectar células de mamífero.

Estos resultados muestran que existen elementos de ARN dentro de los primeros 100 nucleótidos de la secuencia codificante de cápside que actúan *en cis* para la replicación viral. Así, encontramos que la integridad del *Stem 1* de la estructura G es un requerimiento fundamental para la infección viral. Mutaciones puntuales que alteraron el apareamiento de bases del *Stem 1* (mutantes *Stem 1* M3 y M4, Figura 61) fueron suficientes para impedir la replicación en células de mosquito. En relación a estos resultados, experimentos de pasajes seriados demostraron que la mutante *Stem 1* M4 revirtió en cultivo tras pasajes sucesivos no solo a la secuencia WT, sino que también pseudo revirtió a una secuencia alternativa que reconstituyó la formación del *Stem 1*, con un apareamiento diferente al original (Figura 66), evidenciando la relevancia funcional de este elemento.

La región de ARN correspondiente a la secuencia que codifica a la proteína de cápside analizada en este capítulo, fue identificada a partir de un análisis de toda la región codificante de cápside y dentro de la cual logramos identificar un elemento que está conservado en otros Flavivirus. Al respecto hay dos trabajos que evalúan regiones análogas presentes en los virus de DENV2, DENV4 y WNV. Nuestro laboratorio reportó previamente el requerimiento de una región en la secuencia codificante de cápside de DENV2 que participa de una interacción de larga distancia con el 3'UTR del genoma viral, pero dichas secuencias se encuentran ausentes en el genoma de ZIKV. Si bien hay una analogía en cuanto a la localización de estos elementos y a la existencia de complementariedad con secuencias a larga distancia, tanto las secuencias como la localización de la región complementaria en el 3'UTR son diferentes entre los virus de DENV2 y ZIKV (Figura 68). Por otro lado, se ha reportado un trabajo que analiza la

región conservada en la secuencia codificante de la proteína de cápside del DENV4 que forma una estructura análoga al elemento G identificado en ZIKV (Liu et al. 2013). En dicho trabajo se le asigna un rol modulador a la estructura de ARN en la replicación viral en células de mamífero, pero no se estudia su posible función en células de mosquito.

Con el fin de evaluar funciones conservadas entre los Flavivirus, comparamos los hallazgos reportados para el DENV4 con nuestros estudios en ZIKV. Los datos obtenidos por Liu y colaboradores indican que la integridad de la interacción de PK cumple un rol en la replicación de DENV4 en células de mamífero. Sin embargo, nuestros resultados empleando ZIKV indican que el PK tolera mutaciones, y los virus con estas mutaciones son capaces de replicar con un retraso leve en ambos hospedadores, mosquito y mamífero. Por otro lado, el correcto plegamiento del *Stem 1* mostró ser funcional tanto para la replicación de DENV (Liu et al. 2013) como para ZIKV (Figura 61). Las mutaciones introducidas en esta estructura disminuyen considerablemente la replicación en células BHK en ambos virus, lo que sugiere que la función del *Stem 1* podría tratarse de una característica conservada. Además, ninguna de las modificaciones introducidas fue letal en células de mamífero, sino que se observa una disminución en la replicación, lo que es coincidente con nuestros resultados empleando al ZIKV. La mayor diferencia entre estos virus se encuentra en el requerimiento del *Stem 2*, dado que su delección en DENV4 disminuyó en gran medida la replicación del virus, mientras que en ZIKV parecería ser dispensable, ya que tanto la mutación que disrumpe el apareamiento como la delección de toda la estructura evidenciaron efectos menores en la replicación viral tanto en hospedador mosquito como en mamífero. En resumen, existen similitudes y diferencias en la función del elemento que aquí llamamos G en ZIKV y DENV4 en células de mamífero. Resta evaluar el requerimiento del elemento G durante la replicación de DENV en células de mosquito. En relación a esto, cabe mencionar que en el trabajo que emplea al DENV2 previamente realizado en nuestro laboratorio, se analizó una mutante que incluiría una delección que abarcaría todo el elemento G (la mutación llamada delta C1, (de Borba et al. 2015)) que no fue letal en células de mosquito. Esto indicaría que el rol esencial del elemento G en el genoma de ZIKV para infectar células de mosquito no sería equivalente a lo requerido en el genoma del DENV2.

Los estudios sobre DENV4 proponen que dada la cercanía del elemento de ARN análogo a G a secuencias de circularización (CS), la formación de la estructura *Stem 1*, PK y *Stem 2*, podrían ser estimuladoras de la conformación circular del genoma. Sin embargo, no se identificaron regiones de complementariedad que sustenten esta propuesta. Por otro lado los estudios con DENV2 identifican complementariedad de bases entre una región llamada C1 (en la secuencia codificante de cápside) con secuencias presentes en un elemento *Dumbbell* presente en el 3'UTR del genoma viral (Figura 67) (de Borba et al. 2015). En base a este análisis, se propone que secuencias presentes en la región codificante de DENV2 modularían la circularización del genoma viral.

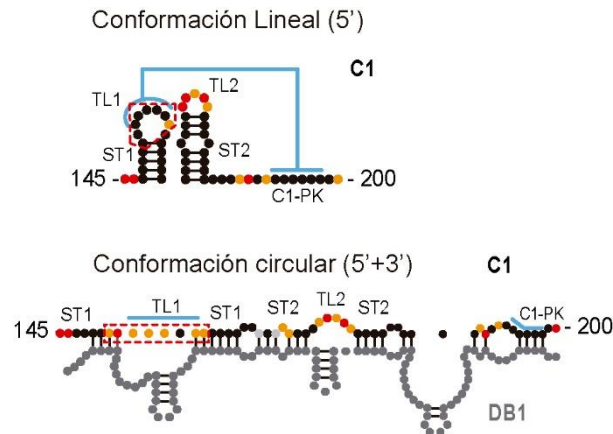


Figura 67. Estructura secundaria de la región de cápside de DENV2 analizada, en la conformación lineal y los apareamientos de base involucrados en la interacción con el 3'UTR en la conformación circular. Los colores de cada base indica la reactividad de NMIA. El color negro indica bases protegidas por interacción secundaria, mientras que los distintos tonos de naranja y rojo indican alta reactividad. Modificado de de Borba et al. 2015.

En el caso de DENV, la interacción a larga distancia ejerce un efecto estimulador de la infección en células de mosquito, mientras que en células de mamífero se evidenció un efecto de menor impacto en la replicación. En ZIKV, más allá de la interacción de tres bases presentes en el *Stem 1*, no encontramos predicciones de complementariedad a larga distancia en las regiones homólogas a las halladas en DENV. En la Figura 68, se encuentran representadas en forma comparativa las conformaciones circulares y lineales predichas de los genomas de DENV y ZIKV, con especial énfasis en la interacción predicha en la región de la estructura G. Los resultados obtenidos al alterar el *Stem 2* apoyan la idea de que no existiría una conservación de esta interacción en la región homóloga en ZIKV, debido a que la delección o disrupción del *Stem 2* no demostró efectos importantes sobre la replicación viral. Sin embargo, los datos presentados en este trabajo indican que la interacción a larga distancia conformada por 3 bases del *Stem 1* sería funcional, y contribuiría a la circularización del genoma, con un rol importante en la replicación en células de mosquito. En este sentido, tanto la estructura de ARN local como la interacción a larga distancia del genoma de ZIKV tendrían un rol relevante en la replicación viral en células de mosquito, a diferencia de lo observado en DENV. En el caso de DENV, la estructura presente en la región codificante de cápside reorganiza completamente su plegamiento en su compleja interacción con las secuencias presentes en el 3'UTR (Figura 67 y Figura 68), y los resultados indican que la función de la interacción a larga distancia sería predominante por sobre las funciones de la estructura a nivel local (de Borba et al. 2015).

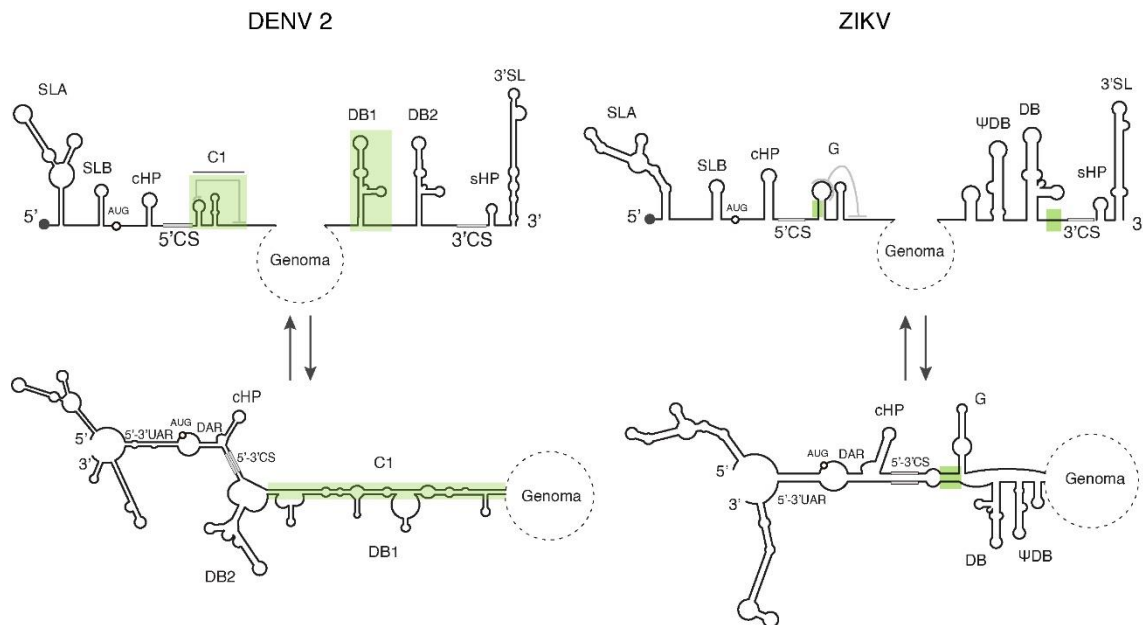


Figura 68. Representación esquemática de la conformación lineal (arriba) y circular (abajo) de los genomas de DENV 2 (de Borba et al. 2015) y ZIKV. En verde, se resaltan las regiones de complementariedad de bases entre 5' y 3' del genoma. El esquema de DENV se encuentra modificado de de Borba et al. 2015.

Los Flavivirus transmitidos por mosquitos deben alternar entre hospedadores mosquitos y vertebrados, y este proceso involucra su adaptación a maquinarias celulares diferentes para la replicación viral y la evasión de distintas respuestas antivirales. En este trabajo, estudiamos un elemento de ARN presente en la región codificante de cápside cuya integridad es fundamental para la replicación en mosquito, pero no es esencial para la replicación en mamífero. Se ha descrito previamente la presencia de elementos en el genoma de ARN que se encuentran involucrados en la adaptación y poseen funciones específicas de hospedador. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se reportó que mutaciones puntuales que alteran el sHP presente en el 3'UTR impidieron la replicación en células de mosquito sin afectar la infección de células de mamífero (Villordo and Gamarnik 2013). Es decir, esta estructura es requerida exclusivamente para la replicación en células de mosquito. Al respecto, existen estructuras conservadas en el 3'UTR que se encuentran duplicadas, y la restricción de la replicación a un único hospedador resulta en la selección de poblaciones con variaciones en estas regiones (de Borba et al. 2019; Villordo et al. 2015). En particular, en la región 3'UTR del genoma de DENV se encuentra una duplicación de las estructuras de *Dumbbell* (DB1 y DB2). En experimentos de adaptación a mosquitos se encontró que los virus acumularon variaciones en solo una de ellas: el DB2. Al analizar en profundidad las variaciones adquiridas, se observó que confirieron un gran aumento en la replicación viral en células de mosquito, y generaron un impacto leve en células de mamífero (de Borba et al. 2019). Además, al estudiar virus carentes de cada una de las estructuras de DB se observaron fenotipos opuestos. Mientras que la delección del DB1 redujo la replicación viral alrededor de 10 veces, virus carentes del DB2 demostraron un gran aumento de su *fitness* en mosquitos, lo que confirma una diversificación funcional de estos elementos de ARN tan similares. Esto indica que las estructuras se encuentran bajo diferentes presiones de selección en cada hospedador y que constituyen un requerimiento fundamental en los Flavivirus que deben ciclar entre dos hospedadores.

La proteína de cápside, como se mencionó previamente, es la proteína viral menos conservada y presenta una gran flexibilidad en su secuencia aminoacídica (Byk and Gamarnik 2016; Faustino et al. 2019). Estudios realizados en DENV indican que mutaciones en el extremo N-terminal de cápside que conserven el contenido de

aminoácidos básicos son tolerados siempre y cuando no alteren los elementos de ARN con funciones *en cis* (en este caso la secuencia CS) (Samsa et al. 2012). Por otro lado, se halló una gran flexibilidad en la proteína de cápside de TBEV, que toleró grandes deleciones, de entre 19 y 30 residuos (Kofler et al. 2002). El Flavivirus aviar relacionado TMUV constituye otro ejemplo, donde grandes deleciones de cápside que abarcaban casi toda la hélice C-terminal fueron toleradas, y se produjeron partículas infecciosas (He et al. 2021). Esta flexibilidad en la secuencia codificante podría estar asociada a la necesidad de adaptarse a los requisitos de estructura/secuencia de ARN *en cis*.

En resumen, en este capítulo se describió un elemento de ARN presente en la región codificante de cápside de ZIKV que posee una función específica de hospedador. Nuestros resultados indican que los primeros ~100 nucleótidos de la secuencia codificante de cápside funcionan como elementos de ARN *en cis* para la replicación. El estudio de señales de ARN involucradas en procesos básicos para la infección de los Flavivirus es fundamental para el desarrollo de herramientas moleculares que permitan estudiar la biología molecular de estos virus, como es la construcción de virus reporteros y de virus atenuados que podrían ser candidatos atractivos para la elaboración de nuevas vacunas.

Conclusiones generales

En este trabajo de tesis abordamos estudios moleculares con dos Flavivirus, ZIKV y DENV, que constituyen importantes patógenos humanos capaces de causar grandes epidemias. Estos virus ciclan entre hospedadores humanos y mosquitos, y constituyen un problema de salud pública global. En general, las infecciones por estos virus son asintomáticas o con síntomas leves inespecíficos, similares a una gripe, pero ambos pueden causar cuadros graves y la muerte. Cuando ZIKV infecta mujeres embarazadas, la infección puede llevar al nacimiento de niños con microcefalia. Se ha reportado un alto grado de mortalidad en recién nacidos con síndrome congénito de ZIKV. Además, este virus puede causar síndrome de Guillain-Barré en adultos (Goodfellow and Willison 2016; Rasmussen et al. 2016; Shragai et al. 2017). En relación al DENV, se calcula que desde el año 2000 han ocurrido más de 19.6 millones de infecciones (PAHO 2020), y estas pueden derivar en casos severos de DHF y DSS (Gould and Solomon 2008). En la actualidad, si bien existen vacunas para el virus de DENV en etapas avanzadas de ensayos clínicos y se ha licenciado una vacuna, aún no existen mecanismos terapéuticos ni vacunas efectivas para el control de estas infecciones.

Este trabajo de tesis se centró en el estudio de la proteína de cápside desde la bioquímica de sus interacciones con lípidos y ácidos nucleicos, su distribución y movilidad en la célula infectada hasta el rol de las señales de ARN en su secuencia codificante. Las funciones de la proteína de cápside involucran su interacción tanto con el ARN genómico como con membranas celulares. Los estudios realizados en este trabajo permitieron proponer un modelo de encapsidación en el cual la formación de partículas virales involucraría una transición de fase líquido-líquido. En relación a esto, la formación de la NC sería resultado de la emergencia de una nueva fase líquida que se asociaría con la membrana del RE para la formación de nuevas partículas (Ambroggio et al. 2021).

Por otro lado, en este trabajo estudiamos la distribución subcelular de la proteína de cápside de ZIKV y observamos el efecto de la infección viral sobre la integridad celular. Mediante estrategias de genética reversa, logramos identificar residuos en la proteína de cápside de ZIKV que son responsables de su localización nucleolar. Se logró obtener virus recombinantes con mutaciones puntuales en señales de localización nuclear que fueron suficientes para impedir la entrada de cápside al núcleo. Además, a partir de estudios *in vivo* combinados con técnicas avanzadas de microscopía, estudiamos las rutas preferenciales de movimiento de la proteína de cápside en la célula infectada. Determinamos, por primera vez, la bidireccionalidad del movimiento de la proteína de cápside de DENV para entrar y salir del núcleo, evidenciando el tráfico núcleo-citoplasmático de esta proteína. Nuestros estudios también sugieren que el impedimento de la localización de cápside en el núcleo puede alterar la eficiencia del proceso de infección y replicación. Por este motivo, es interesante continuar con estos estudios para determinar las posibles funciones de la proteína de cápside en el nucleolo y otros compartimentos celulares durante la infección, así como también las implicancias de su tráfico entre compartimentos. Estos estudios podrían arrojar información relevante para el diseño de estrategias antivirales novedosas.

En este trabajo de tesis se abordó también el estudio de la función de la secuencia codificante de cápside de ZIKV por la existencia de señales en estructuras de ARN que modulan los procesos virales. Al respecto, identificamos elementos importantes que se vieron conservados en otros Flavivirus. La estructura identificada, llamada G, demostró ser un elemento esencial para la replicación en células de mosquito, y la modificación

de su estructura secundaria impidió la síntesis de ARN en este hospedador. En células de mamífero, la estructura G demostró ejercer un efecto modulador sobre la replicación y su mutación dio lugar a virus atenuados en este hospedador. Estudios mecanísticos sobre su posible función indicaron que la estructura G se encuentra en superposición y competencia con una interacción de larga distancia que incluye una secuencia del extremo 3'UTR de genoma. En relación a esto, se determinó que, en el caso de ZIKV, la integridad de la estructura a nivel local es fundamental, y que la interacción con regiones distantes en el genoma es también importante. Por este motivo, planteamos la existencia de un equilibrio entre ambas conformaciones en la célula infectada. Debido a que el equilibrio entre la conformación lineal y circular del genoma es esencial para la síntesis de ARN, el efecto modulador identificado sería un mecanismo de regulación del establecimiento de estas conformaciones. Además, nuestros resultados sugieren que dicha regulación tendría un impacto diferente en cada hospedador. Disociar funciones del genoma como son las señales en el ARN y la codificación de proteínas es fundamental para comprender la biología molecular del virus y poder diseñar virus racionalmente atenuados para elaborar estrategias de control.

Como se mencionó a lo largo de este trabajo, la proteína de cápside constituye un atractivo blanco para estrategias antivirales. Esta proteína ejerce funciones diversas en la célula infectada, tanto en el núcleo como en el citoplasma, e interacciona con factores virales y celulares. Las complejas interacciones en las que se encuentra involucrada son las que permiten, en parte, la correcta coordinación temporal y espacial de la formación de la nucleocápside. En relación a esto, el desarrollo de compuestos que impiden la distribución normal de cápside en la célula, como su asociación a los LDs, podría funcionar como una posible estrategia antiviral (Martins et al. 2012; Samsa et al. 2009). Por otro lado, alterar de forma dirigida la interacción de cápside con ácidos nucleicos puede constituir un blanco clave para inhibir la encapsidación o el desnudamiento del genoma. En este sentido, un compuesto (ST-148) cuyo mecanismo de acción es incrementar la interacción de cápside consigo misma confiriendo una mayor rigidez estructural, logró inhibir la infección por DENV (Byrd et al. 2013; Scaturro et al. 2014). Esto puede deberse a que el cambio en la estabilidad de la interacción de los dímeros de cápside interfiere en su capacidad de acomplejarse o liberar el genoma en las distintas etapas de la infección. Uno de los problemas en el desarrollo de antivirales es la rápida capacidad de adaptación de los virus de ARN a nuevos ambientes y la consecuente aparición de virus resistentes. Un enfoque propuesto para reducir la aparición de variantes virales resistentes a fármacos es la selección de blancos dominantes (Mateo et al. 2015). Esta estrategia se basa en la búsqueda de blancos virales para los cuales inevitablemente surgirán mutaciones resistentes a los fármacos, pero que no se seleccionarán de las cuasiespecies presentes en la célula infectada (Kirkegaard, van Buuren, and Mateo 2016). Este es el caso de proteínas estructurales como la cápside de poliovirus o DENV, o la envoltura del virus de la estomatitis vesicular que, al ser capaces de oligomerizar, permiten la coexistencia de proteínas resistentes y susceptibles, generando complejos no funcionales, y causando una demora en la emergencia de virus resistentes. De hecho, ensayos realizados en células en cultivo y en ratones infectados demostraron que, a pesar de la presencia de variantes resistentes en la población, no fue posible aislar virus resistentes al compuesto ST-148 (Mateo et al. 2015). Por lo tanto, la elección de proteínas estructurales capaces de oligomerizar como cápside emerge como un objetivo atractivo para desarrollar antivirales innovadores para controlar la infección por Flavivirus.

Los resultados presentados en este trabajo constituyen un aporte de información nueva sobre las funciones de cápside de ZIKV y DENV en la célula infectada. Conocer los

procesos involucrados en la encapsidación y liberación del genoma, y las propiedades de la proteína de cápside en su interacción con factores virales y celulares es fundamental para diseñar estrategias de control. Las estrategias que se basan en el conocimiento nos permitirán encontrar nuevos caminos para el control de las enfermedades causadas por DENV, ZIKV y otros Flavivirus emergentes y reemergentes.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las células de riñón de hámster (BHK-21, clon 15) se cultivaron en medio mínimo esencial alfa (MEM α) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y 100 U/ml penicilina/estreptomicina, y se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% CO₂. La línea de carcinoma de pulmón humano (A549), se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle con alta glucosa (DMEM) suplementado con 10% FBS y 100 U/ml penicilina/estreptomicina, y se mantuvo en estufa a 37°C con 5% CO₂. La línea celular de mosquito *Aedes albopictus* de alta temperatura (C6/36 HT) se cultivó en medio Leibovitz L-15 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino FBS, 100 U/ml penicilina/estreptomicina, triptosa fosfato 0.3%, glutamina 0.02%, 100 μ M de aminoácidos no esenciales y 250ng/ml de fungizona (Gibco, Thermo Fisher Scientific), y se mantuvo en estufa a 33°C con 5% CO₂.

Virus y clones infecciosos

Los aislamientos de ZIKV utilizados para la infección de células y la amplificación de genes virales fueron el aislamiento adaptado a cultivo Senegal A1C1/V2 (GenBank KX198134) y un aislamiento argentino del año 2016 ARCB116141 (GenBank MK637519) obtenido en el instituto Maiztegui (INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina).

El clon infeccioso de ZIKV (IC ZIKV) fue generado en nuestro laboratorio (Pallarés et al. 2020) y contiene el cDNA del genoma completo de un clon del aislamiento argentino del virus (GenBank: MT636065.1) precedido por un promotor de T7, que permite generar el ARN infeccioso completo a partir de transcripción *in vitro* (Figura 69). A partir de este clon, se generó también un clon infeccioso reportero (IC ZIKV Rep) que contiene una duplicación de la secuencia codificante de la proteína de cápside (que aporta elementos *en cis* importantes para la replicación) y el gen de la luciferasa de *Renilla* flanqueado por sitios auto proteolíticos 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) que permiten su liberación (Figura 69).

El clon infeccioso del DENV (pD2 IC) fue cedido al laboratorio por el Dr. Richard Kinney (Kinney et al., 1997). Este plásmido contiene el cDNA del genoma completo de DENV2, cepa 16681 (GenBank U87411). El clon infeccioso reportero de DENV fue construido en nuestro laboratorio utilizando el plásmido pD2 IC (de Borba et al. 2015). Ambos vectores poseen características homólogas a las descritas para los clones infecciosos de ZIKV.

Construcción de virus mutantes

La construcción de virus mutantes en la proteína de cápside en el clon infeccioso de ZIKV se realizaron a partir del clonado de fragmentos generados por PCR por solapamiento (*overlapping* PCR). Para ello, las mutaciones fueron introducidas en oligonucleótidos (Tabla 3 del Anexo) y los productos de amplificación fueron generados utilizando como molde el clon infeccioso. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima AccuPrime Pfx (Thermo Fisher Scientific). Para el clonado, se eligieron los sitios de corte único más cercanos al sitio de mutación, que para todos los casos de mutaciones en la secuencia de cápside fueron MluI-AvrII (New England Biolabs) (Figura 69). Los oligonucleótidos externos de la PCR por solapamiento son complementarios a regiones por fuera de los sitios MluI-AvrII (AVG 2107-2039, Tabla 3 y

Tabla 4 del Anexo), por lo que se digiere tanto vector como inserto con estas enzimas. Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, con marcadores de peso molecular (1 Kb Plus, Thermo Fisher Scientific) para verificar las digestiones y cortar las bandas correspondientes a los productos deseados. Las bandas purificadas (Qiaquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) se ligaron con la enzima ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) en relación 3:1 de inserto:vector.

El producto de la ligación fue transformado en bacterias *E. coli* XL-1 Blue competentes por el método Inoue, mediante shock térmico. Luego de la recuperación las bacterias se plaquearon en LB-Agar con 100µg/ml de ampicilina (resistencia presente en el plásmido del clon infeccioso) y se incubaron toda la noche en estufa a 37°C. Al día siguiente, los clones obtenidos fueron crecidos en cultivos líquidos de LB-Ampicilina toda la noche a 37°C. Luego de purificar el ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN), se secuenciaron los clones con oligonucleótidos cercanos a los sitios de digestión para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas (Macrogen). Los clones positivos sin mutaciones adicionales fueron utilizados para transcripciones *in vitro*.

Las mutaciones en cápside en el clon infeccioso reportero de ZIKV se realizaron mediante el mismo procedimiento que para IC ZIKV, pero los sitios de clonado únicos utilizados, presentes en el IC ZIKV Rep (Figura 69) fueron MluI-XhoI (New England Biolabs) y los oligonucleótidos externos fueron AVG 2170-2416 (Tabla 3 y

Tabla 4 del Anexo).

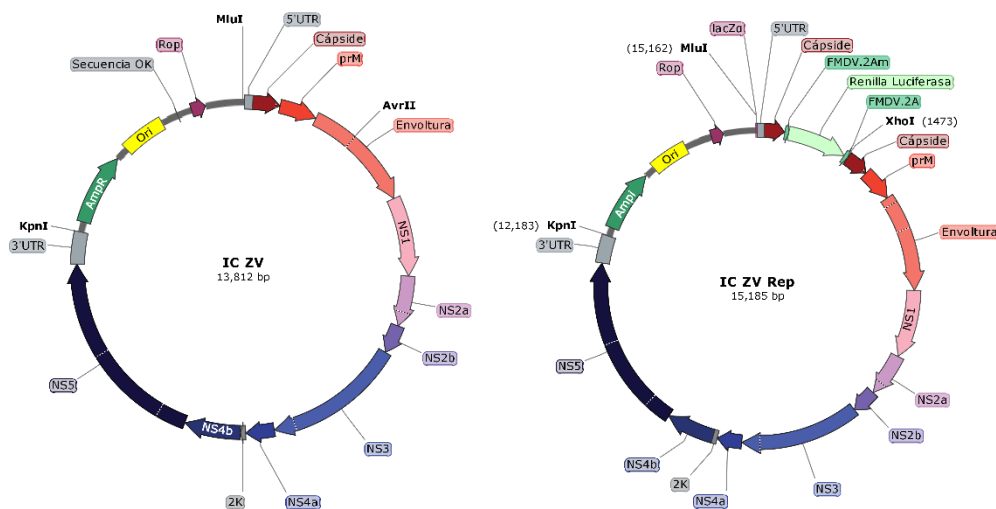


Figura 69. Mapa del clon infeccioso de ZIKV (IC ZV, izquierda) y del clon infeccioso reportero (IC ZV Rep, derecha). Se indican con líneas los sitios de corte de enzimas de restricción utilizadas para clonados y linealización del vector. Se indican en colores las proteínas virales y en gris los extremos 5' y 3' UTR. En IC ZV Rep, se encuentra el gen de la luciferasa (verde claro) flanqueado por secuencias de autoclivaje FMDV 2A.

Construcción de virus recombinantes con proteínas fluorescentes

La construcción de los virus ZIKV C-mCherry y ZIKV C-GFP se realizó a partir de la modificación del virus de ZIKV reportero con luciferasa. Para ello, se utilizó un vector intermedio de clonado que contiene una porción del plásmido completo (desde la resistencia a ampicilina hasta la proteína NS2A) en donde se reemplazó la región AfIII-XhoI con la secuencia de la proteína fluorescente para generar la fusión con la primera copia de cápside (oligonucleótidos AVG 2392 hasta 2397, Oligonucleótidos utilizados

para clonado de vectores y virus recombinantes, o *reacciones de RT-PCR*. del Anexo). Una vez obtenido este plásmido, se digirió con las enzimas ClaI-AvrII y se reemplazó la misma región en el clon infeccioso completo para generar el plásmido final (Figura 70).

Para la construcción de los virus DENV C-mCherry y DENV C-GFP, se modificó el virus reportero con luciferasa generado en el laboratorio (pD2 IC Rep), para generar la fusión de la primera copia de cápside completa con la secuencia codificante de mCherry o GFP. Para ello se reemplazó el fragmento por digestión con SacII-SphI (New England Biolabs) del reportero por un fragmento que contiene la secuencia de la proteína fluorescente fusionada a FMDV-2A, de forma de obtener la fusión con cápside que pueda ser liberada luego de ser traducida por el clivaje de la poliproteína. El fragmento utilizado para reemplazar la región SacII-SphI se generó por PCR por solapamiento (AVG 2389-2390-2391, Tabla 3 del Anexo). La nueva construcción fue ligada como se detalló previamente y los clones obtenidos fueron secuenciados y utilizados para transcripción *in vitro* (Figura 70). El ARN viral DENV C-mCherry y DENV C-GFP fue competente para traducción y replicación.

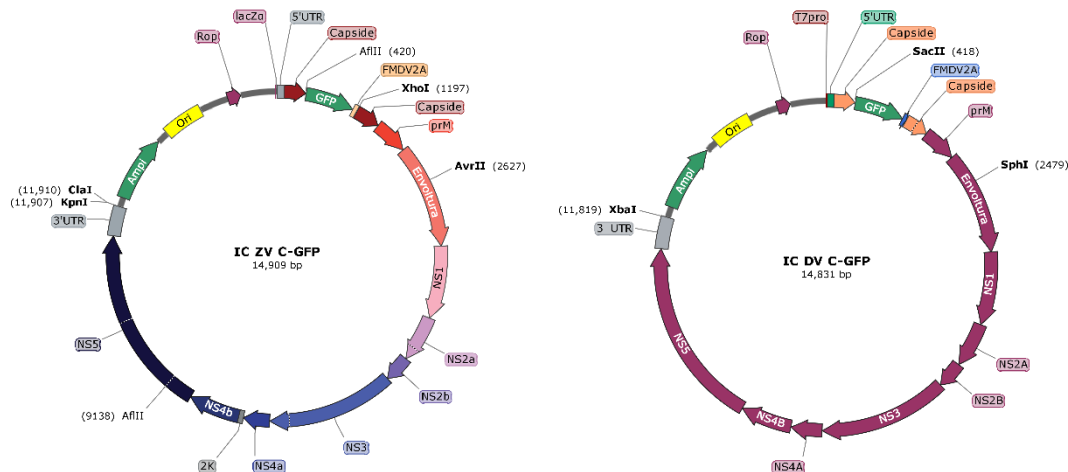


Figura 70. Plásmido completo del clon infeccioso de ZIKV C-GFP (izquierda) y DENV C-GFP (derecha). El plásmido ZIKV C-mCherry es igual, pero con el gen de mCherry en el lugar de GFP. Se indican con líneas negras los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para los clonados y la linealización de los vectores. Se indica la proteína GFP en verde, que se encuentra en marco de lectura con la proteína de cápside. Luego de estas dos proteínas se encuentra el sitio de autoclivaje FMDV-2A para la liberación de la proteína de fusión C-GFP.

Transcripción *in vitro*

Para obtener el ARN infeccioso del genoma completo del virus, los plásmidos de clones infecciosos de ZIKV fueron linealizados con la enzima KpnI o, en el caso de DENV, con XbaI, que cortan inmediatamente después del último nucleótido de la secuencia del virus (al finalizar la región 3'UTR), durante 2 horas a 37°C. Los productos lineales fueron utilizados como molde para la transcripción *in vitro* con la enzima T7 RNA Polymerase (Ambion, Thermo Fisher Scientific), en presencia de un análogo estructural de CAP m7GpppA (New England Biolabs). Se utilizaron 600ng de producto linealizado como molde, con 300U de T7 polimerasa por reacción, y se incubó la reacción por 2 horas a 37°C. La presencia e integridad del producto de transcripción fue verificado en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio y la concentración del ARN se determinó utilizando el kit Qubit RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific).

Transfección de ARN viral

Las transfecciones se realizaron, para todas las líneas celulares utilizadas, con 100-200ng de ARN cada 2.5×10^5 células, en confluencia de alrededor del 70-80%. El reactivo utilizado fue Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) según las indicaciones del fabricante, con medio Opti-MEM para las diluciones y la incubación (Gibco). Luego de incubar 2 horas a 33/37°C con el reactivo de transfección (según el tipo celular C6/36 o BHK, respectivamente), se retiró el medio y se agregó medio de cultivo suplementado con 5% FBS.

Ensayos de actividad luciferasa

Para realizar ensayos de actividad luciferasa, la transfección se realizó en formato de placa de 24 pocillos, y se utilizaron 100ng de ARN por well según lo indicado previamente. Transcurrido el tiempo determinado por cada experimento, se retiró el medio y se determinó la actividad luciferasa del extracto celular utilizando el kit Renilla luciferase assay system (Promega) según las instrucciones del fabricante. La medición de cuentas de luminiscencia se realizó con el lector de microplacas Glomax Navigator Microplate Luminometer (Promega).

Ensayos de inmunofluorescencia

Las células (BHK-21, A549 o C636 HT) se crecieron en un soporte adecuado para el ensayo (placa multiwell de 24 pocillos o placas p60), y se agregaron vidrios cubreobjetos redondos de 12mm sobre los cuales las células son capaces de crecer en monocapa. A los tiempos post transfección o infección correspondientes, se tomaron los vidrios y se fijaron con metanol por 15 minutos a -20°C o PFA/Sacarosa 4% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, según requerido por el experimento. Los vidrios fijados con PFA fueron permeabilizados durante 4 minutos con una solución 0.1% de Tritón X-100 en PBS. Los vidrios se bloquearon con gelatina 0.2% (Sigma) en PBS-Tween 0.1% y se incubaron en una gota de 40µl de la dilución de anticuerpo primario (Tabla 2 del Anexo) en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de realizar 3 lavados con PBS-Tween 0.1%, los vidrios se incubaron con la dilución del anticuerpo secundario fluorescente en las mismas condiciones. Adicionalmente en este punto se agregaron, de ser necesario, el colorante de núcleos DAPI o el colorante de *lipid droplets* BODIPY 493/503 en dilución 1/1000 o 1/500 respectivamente (Thermo Fisher Scientific). Luego de realizar 3 lavados, los vidrios fueron fijados en portaobjetos con una solución de Mowiol para su visualización en el microscopio. Los anticuerpos y diluciones utilizados se encuentran especificados en la Tabla 2 del Anexo.

Clonado y expresión de proteínas en bacterias

Las construcciones de las proteínas de cápside se realizaron a partir del clon infeccioso de DENV2 16681 y del aislamiento de ZIKV A1C1/V2 mencionados previamente. La secuencia codificante completa de cápside (aminoácidos 1-100 para DENV y 1-104 para ZIKV) se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos que contienen los sitios de corte de las enzimas NcoI y BamHI en sus extremos (ZIKV:AVG 2025-2026 DENV: AVG 2275-489, Tabla 3 del Anexo). El fragmento obtenido por la digestión directa del producto de PCR fue ligado en el vector pET-15b previamente digerido con las mismas enzimas para obtener los vectores pET-DENVC y pET-ZIKVC, que fueron verificados por secuenciación.

Para la expresión de proteínas, se transformaron bacterias *E. coli* BL21 Rosetta (DE3 pLys) con los plásmidos de expresión obtenidos. Las bacterias transformadas se

crecieron a 37°C en un medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) hasta una absorbancia de 0.6 ($\lambda=600$ nm) y luego se indujeron con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Las células inducidas fueron incubadas por 5 horas a 20°C y luego cosechadas por centrifugación a 4000rpm por 10 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en buffer de lisis (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 0.1 M, glicerol 20%, Triton X-100 1%, cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), y 2-mercaptoethanol 5 mM). La suspensión fue sonicada, clarificada por centrifugación y luego filtrada con filtros de jeringa de 0.45 µm. El extracto celular se inyectó en columnas de heparina HiTrap Heparin HP (Cytiva) equilibradas con un buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM con glicerol 2%, que fue lavada con el mismo buffer con concentraciones de NaCl 0.5M y 1M, y luego eluida con NaCl 1.5M Y 2M. Las fracciones correspondientes a la proteína de cápside fueron juntadas y concentradas por centrifugación utilizando filtros Amicon Ultra-15 centrifugal (Merck Millipore) en un buffer final de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM y NaCl 0.5 M. La proteína se conservó a -20°C.

La proteína mutante Cápside-CysDENV (N93C) se generó reemplazando la asparragina en la posición 93 por una cisteína. Para ello, se incorporó la mutación en un oligonucleótido reverse que se utilizó para amplificar mediante PCR la secuencia codificante de cápside de DENV (AVG 2275-2276, Tabla 3 del Anexo), de forma similar a lo detallado para el plásmido pET-DENV. La proteína mutante fue clonada, expresada y purificada como se describió previamente. La proteína de cápside mutante nos permitió realizar el marcado de la proteína con un marcador derivado de maleimida. En nuestro caso utilizamos Alexa488-maleimida para marcar Cápside-CysDENV y que de este modo sea posible detectarla por microscopía de fluorescencia de forma directa. La marcación se realizó incubando 20 µl de Alexa488-maleimida 0.1 mg/ml en dimetil sulfóxido en una alícuota de Cápside-cysDENV a una relación final de marcador/proteína de 5. La suspensión se incubó una hora y se eliminó todo el marcador libre por cromatografía de exclusión PD10 (GE Healthcare) equilibrada en buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM con glicerol 1%.

Infecciones, stocks y ensayos de placas de lisis

La infección de células se realizó en células sembradas desde el día anterior en el soporte adecuado, en confluencia de alrededor del 90%. Las células se incubaron con el *stock* viral durante una hora a 33/37°C, se removió el inóculo y se lavó con PBS. Luego, se agregó medio de cultivo suplementado con 5% FBS.

Para generar *stocks*, se infectaron monocapas celulares de C636 crecidas desde el día anterior en una confluencia de alrededor del 90% con una multiplicidad de infección de 0.1 con el procedimiento mencionado previamente. Luego de 3 días, se realizó un recambio de medio, descartando el de 72hpi. A los 7dpi se recolectó el medio de infección, se clarificó por centrifugación a 1000g por 10 minutos y se alicuotó y almacenó a -80°C.

Para los ensayos de placas de lisis, se sembraron células BHK en placas multiwell de 24 pocillos y se crecieron toda la noche, hasta llegar a confluencia cercana al 100%. Los *stocks* virales se diluyeron al décimo de forma seriada y se utilizaron 200 µl de inóculo para infectar las monocapas por 1 hora a 37°C. Luego, se agregó a cada pocillo 1 ml de medio *overlay* (MEMα-metilcelulosa 0,8% con 5% SFB) y se incubó la placa a 37°C por entre 6-7 días. Al cabo de ese tiempo, las células fueron fijadas con formaldehído 10% y teñidas con cristal violeta para la visualización de las placas de lisis.

Western Blot

Las muestras a analizar por *Western Blot* fueron tratadas con buffer de muestra (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol 20%, SDS 4%, EDTA 20Mm, DTT 50mM, DNAsal 0.8mg/ml) e incubadas por 10 minutos a 99°C. Posteriormente, las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10-15% en corridas de 120V durante 1h y media en buffer Tris-Glicina-SDS (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1%). Al finalizar la corrida, se realizó la transferencia a membranas de PVDF (GE Healthcare) en transferencia líquida (buffer Tris-Glicina-SDS con metanol 20%) durante 3 horas a 200mA. La membrana se bloqueó por 1 hora a temperatura ambiente con leche 5% en TBS-Tween 0.1%, y luego se incubó durante toda la noche a 4°C con la dilución del anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2 del Anexo) en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se incubó con la dilución de anticuerpo secundario correspondiente fusionado a HRP en solución de bloqueo (Tabla 2 del Anexo) durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó nuevamente 3 veces con TBS-Tween 0.1% y fue revelada con el reactivo ECL Prime (GE Healthcare) utilizando el equipo ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

Fraccionamiento subcelular

Las células en monocapa fueron infectadas o no, según lo requerido por el experimento, y al finalizar, fueron cosechadas por rastrillado con PBS frío. Se centrifugó la suspensión resultante a 1000g por 10 minutos a 4°C y el pellet celular fue procesado para fraccionamiento subcelular según las especificaciones del kit Qproteome Cell Compartment Kit (QIAGEN). Las fracciones resultantes fueron tratadas con buffer de muestra para su posterior sembrado en geles de poliacrilamida.

Ensayos de RT-PCR y PCR en tiempo real

Para la cuantificación de ARN viral por qRT-PCR, las muestras de células o sobrenadantes infectados fueron tratadas con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y el ARN se extrajo según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se trataron las muestras con DNAsal (Roche) y se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción con la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) según el protocolo del fabricante. La reacción se realizó con oligonucleótidos *random* (Thermo Fisher Scientific) o con un oligonucleótido específico (AVG 2171, Tabla 3 del Anexo) según el caso, y la reacción se incubó por 1 hora a 37°C. Para la reacción de qPCR se diluyeron las muestras de cDNA a una concentración de 10 ng/μl final y se emplearon 2 μl por reacción. La reacción se realizó utilizando la premezcla LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) y oligonucleótidos específicos de la reacción de qPCR (AVG 2098-2099, Tabla 3 del Anexo) en concentración 0.6 μM, en placas de 96 wells. Las muestras se analizaron por duplicado. Se utilizó el equipo Light Cyler 480 (Roche) y el ciclado fue el siguiente: 95° C por 10 minutos, 40 repeticiones de 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 40 segundos. La detección de fluorescencia fue adquirida durante la etapa de elongación en cada ciclo. Los resultados se analizaron utilizando el software del equipo.

Para amplificar el ARN viral para su secuenciación, se llevó a cabo el mismo procedimiento detallado previamente para qPCR, pero los cDNAs resultantes fueron amplificados por PCR a tiempo final con la enzima AccuPrime Pfx (Thermo Fisher Scientific) utilizando oligonucleótidos específicos (para la secuencia de cápside completa AVG 2267-2268/2137, Tabla 3 del Anexo). El ciclado empleado fue: 95° C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 68°C durante 1min/kb, y luego 5 minutos a 68°C. El equipo utilizado para PCR a tiempo final

fue Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa con bromuro de etidio y las bandas fueron cortadas y purificadas (Qiaquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) para su secuenciación directa.

Microscopía de fluorescencia y confocal

Los equipos utilizados para los estudios de microscopía de fluorescencia y confocal a lo largo del trabajo de tesis fueron:

Fluorescencia

- Microscopio de fluorescencia directo Zeiss Axio Imager A2. Objetivos: 10x N-Achroplan/0.25, 40x EC Plan-Neofluar/0.75.
- Microscopio de fluorescencia invertido Axio Observer 3 (Zeiss) con sistema de LEDs Colibrí. Objetivos: 5X LD A-Plan/0.15, 10x LD A-Plan/0.25, 20x LD A-Neofluar/0.40.

Ambos equipos fueron utilizados para observar los resultados de transfecciones/infecciones que no requirieron definir compartimentos subcelulares, sino el porcentaje de células infectadas en monocapas celulares.

Confocales

- Microscopio confocal Zeiss LSM 5 PASCAL: láseres diodo 488nm y He Ne 543nm. Objetivos: 40x C-Apochromat/1.2/Agua, 63x C-Apochromat/1.2/Agua.
- Microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta: láseres diodo 405nm, Argón 488nm, He Ne 543nm. Objetivos: 40x EC Plan-Neofluar/1.3/Aceite, 63x Plan-Apochromat/1.4/Aceite.
- Microscopio confocal Zeiss LSM 710: láseres Argón 488nm y He Ne 543nm. Objetivos 40x EC Plan-Neofluar/1.3/Aceite, 63x Plan-Apochromat/1.4/Aceite.
- Microscopio confocal invertido Zeiss LSM 880: láseres diodo 405nm, Argón 488nm, He Ne 543nm. Objetivo C-Apochromat 40x/1.2/Agua. Módulo Airyscan. Este microscopio cuenta adicionalmente con una incubadora de células (Pecon) y al ser invertido, se utilizó para los ensayos en células vivas. Sus detectores QUASAR (BiG 2) permitieron realizar los experimentos de 2D-pCF.

Softwares

Los análisis de imágenes y cuantificaciones se realizaron utilizando el *software* Fiji (Schindelin et al. 2012). La visualización de archivos PDB para el diseño de mutantes en la proteína de cápside se realizó utilizando el *software* VMD (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996). Los alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizaron con el *software* Geneious (<https://www.geneious.com>). El diseño de oligonucleótidos y estrategias de clonado se realizó empleando el *software* Snapgene (www.snapgene.com).

Técnicas de RICS y 2D-PCF

Para los ensayos de transfección de los virus C-mCherry, se plaquearon 5×10^4 células BHK en placas Nunc Lab-Tek chambered coverglass de 8 wells ($0.7 \text{ cm}^2/\text{well}$) y se crecieron toda la noche a 37°C . Al observar un 80% de confluencia, se transfectaron las células con 50 ng de ARN del virus C-mCherry, o 500 ng del plásmido control pmCherry-C1. Las placas multiwell fueron observadas en el microscopio invertido Zeiss LSM 880 con el objetivo de inmersión con agua C-Apochromat 40X/1.2. Todos los experimentos se realizaron con un tamaño de pinhole de 1 disco de Airy. Durante el experimento, las células se incubaron a 37°C y 5% CO_2 . La longitud de onda de excitación elegida fue

543 nm utilizando un láser de He-Ne (Lasos), y las intensidades fueron elegidas para alcanzar un alto conteo de fotones por molécula, de modo de maximizar la relación señal/ruido, evitando el fotoblanqueo. La emisión de fluorescencia fue colectada entre 550-650 nm utilizando un filtro espectral (detector Quasar) y la detección se realizó con el detector GaAsp (Hamamatsu) en modo conteo de fotones.

Para RICS, se tomaron secuencias de imágenes con un tamaño de pixel de 50 nm y un tiempo por pixel de 16 μ s. Las imágenes fueron de 256x256 píxeles (que corresponde a un área de 12.8 μ m²) y se tomaron 100 imágenes a una velocidad de 1.62 s por cuadro.

Para el análisis de 2D-pCF, se utilizó un tiempo de pixel de 0.98 μ s y un tamaño de pixel de 80 nm. Las imágenes tomadas fueron de 128x128 píxeles (que corresponde a un área de 10.2 μ m²) y se tomaron 8192 imágenes a una velocidad de 0.35 s por cuadro. La potencia del láser se mantuvo bajo a modo de evitar el fotoblanqueo.

El correspondiente análisis de los datos y las técnicas aplicadas se encuentran detalladas en profundidad en el capítulo “Dengue Virus Capsid Protein Dynamics in Live Infected Cells Studied by Pair Correlation Analysis” del libro *Dengue Virus, Methods and Protocols* editado por Ronaldo Mohana-Borges (Gabriel et al. 2022).

Liposomas

Las técnicas utilizadas para la generación de liposomas (LUVs, GUVs), mediciones de fluorescencia o anisotropía de fluorescencia, y los análisis de imágenes de microscopía confocal se encuentran detallados en la sección de métodos del trabajo “Dengue and Zika virus capsid proteins bind to membranes and self-assemble into liquid droplets with nucleic acids” publicado en la revista JBC en 2021 (Ambroggio et al. 2021).

Anexo

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia (IF) y *western blot* (WB).

	Marcador	Ensayo	Dilución
Anticuerpos Primarios	αCápside ZV Rabbit	WB - IF	1/500
	αCápside DV Rabbit	WB - IF	1/1000-1/500
	αNS3 ZV Rabbit	WB - IF	1/500
	αEnvoltura (E18) Mouse	IF	1/500
	αNucleophosmin (abcam ab10530)	IF	1/500
	αCanexina (CellSig 24335)	WB	1/2000
	αCalreticulina (Thermo Fisher PA3-900)	IF	1/500
	αHistona H3 (CellSig 4499)	WB	1/1000
	αGAPDH (abcam 8245)	WB	1/2000
Anticuerpos Secundarios	αADRP (Santa Cruz BT sc-377429)	IF	1/200
	αRabbit-HRP (Sigma 12348)	WB	1/5000
	αMouse-HRP (Sigma 12349)	WB	1/5000
	αRabbit-Alexa488 (Thermo Fisher A27034)	IF	1/500
	αMouse-Alexa488 (Thermo Fisher A28175)	IF	1/500
	αRabbit-Cy3 (sigma AP132C)	IF	1/500
Otros marcadores	αMouse-Cy3 (sigma AP124C)	IF	1/500
	DAPI (Thermo Fisher, D1306)	IF	1/1000
	BODIPY 493/503 (Thermo Fisher)	IF	1/500

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para clonado de vectores y virus recombinantes, o reacciones de RT-PCR. Fw: oligonucleótido sentido, Rev: oligonucleótido antisentido.

Código	Secuencia	Nombre
AVG2098	GCCGCCACCAAGATGAACTGATTG	Fw ZIKV qPCR
AVG2099	GCAGTCTCCCGGATGCTCCATC	RevZIKV qPCR
AVG2267	AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGACTG	Fw ZIKV 5'UTR
AVG2268	GGGCATTCATAGCTCATGGTGGC	Rev ZIKV prM
AVG2137	CCATGATCTGTATATAACACTTATTCATCCCCA	Rev ZIKV prM2
AVG2107	tcccACGCGTTTAATACGACTCACTATAagttggtgatctgtggaatcagactgcg	For ZIKV IC plásmido
AVG2170	caccctggccaggacc	For ZIKV IC plásmido 2
AVG2416	GTATCTGCGCCctogaGtggcccagggttgactcg	Rev dCapsid reportero
AVG2039	ttttATCGATGTTGTTCCAGTGTGGAGTTCC	Rev ZIKV IC plásmido
AVG2171	aggcgtatcacaggccc	Rev ZIKV IC plásmido 2
AVG2025	ATCTCTGCCATGGGTAACCCAAAGAAGAAATCCGG	For ZIKV C NcoI
AVG2026	TGCAGAGGATCCTCATTAAAGTCTCTTCTCTCTTTCC	Rev ZIKV C BamHI
AVG489	TGCAGAGGATCCTCATTATCTGCGTCTCCTATTCAAGATG	Cápside DV2 Rev BamHI
AVG2275	caCCATGGgtaataaccaacggaagggcgaagaaac	Cápside DV2 For NcoI
AVG2276	acGGATCCttatctgctctctattcaagatgcacagcatcctcc	Cápside DV2 N93C Rev BamHI
AVG2389	ctgaaCCGCGGAGCAAAGGTGAAGAACTATTTACGGGTGTA	sfGFP For SacII (para clonar GFP en el IC DV2)
AVG2390	ttgagaaggtcaaaattcaacagctgCTTGATACAGCTCGTCCATGCCGTGTGTGATGCCA	sfGFP2A Rev DV (con For SacII)
AVG2391	CACGGCATGGACGAGCTGTACAAGcagctgtgaatttgacctctcaagcttgcggga	sfGFP2A For DV (con AVG422)
AVG2392	catcaCTTAAGAGCAAAGGTGAAGAACTATTTACGGGTGTA	sfGFP For AflIII (para clonar GFP en el IC ZIKV)

AVG2393	ataaCTCGAGtgggccagggttgactcgacgtctcccgaagcttgagaagggtcaaaattc aacaActgCTTGACAGCTCGTCCATGCCGTGTGT	sfGFP 2A Rev Xhol (IC ZIKV)
AVG2394	GCATGGACGAGCTGTACAAGcagTtgtgaaatttgaccttcaagcttgcgggag acg	sfGFP2AForZV (para OL, con Rev 2265)
AVG2395	aagcttgagaagggtcaaaattcaacaActgCTTGACAGCTCGTCCATGCCGT GTGTGATGCCA	sfGFP2ARevZV (para OL, con For AfIII)
AVG2396	GATCTTAAgAtgggtgagcaagggcgaggaggataacatg	mCherry For AfIII (para clonar mCh en el IC ZIKV)
AVG2397	ATGCTCGAGtgggccagggttgactcgacgtctcccgaag	FMDV2A Rev Xhol (IC ZIKV)
AVG2415	gtgattgaatcatggggaatgg	For Renilla para clonados dCapsid reportero
AVG2418	GTATCTGCGCCGGGGCTCACACGGGGCTACTC	ΔC186-419 en IC Rev
AVG2419	GTGTGAGCCCCGGCGCAGATACTAGTGTCCG	ΔC186-419 en IC For
AVG2420	gctgCttaagGGGGCTCACACGGGGCTACTC	ΔC186-419 en REP Rev
AVG2421	GTGTGAGCCCCcttaaGcagctcctaaatttgattactc	ΔC186-419 en REP For
AVG2438	GATGGGGTTCAGTGGGGTCAAAGAGGCTATGAAAT	C ZV K74S For
AVG2439	ATTTCCATAGCCTCTTTTGACCCCACTGAACCCCATC	C ZV K74S Rev
AVG2440	GGCTATGAAAATAATAAAGTCGTTCCGCGAAAGATCTGGCTGCCAT GCTGAGAA	C ZV K83SK85A For
AVG2441	TTCTCAGCATGGCAGCCAGATCTTTCCGGAACGACTTTATTATTTCC CATAGCC	C ZV K83SK85A Rev
AVG2506	CCATGCTGAGAATAATCAATGCTTCGGCGGAGAAGAAGAGACGA GGCGC	C ZV R98SK99A For
AVG2507	TCGTCTCTTCTTCTCCGCCGAAGCATTGATTATTCTCAGCATGGC	C ZV R98SK99A Rev
AVG2508	GAATAATCAATGCTAGGAAGGAGTCGGGGAGACGAGGCCGAGAT ACTAG	C ZV K101SK102G For
AVG2509	CTAGTATCTGCGCCTCGTCTCCCCGACTCCTTCTAGCATTGATT ATTC	C ZV K101SK102G Rev
AVG2504	GGAAATAATAAAGTcGTTcgcGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGA ATAATCAATGCTtcggcGGAGtcgggGAGACGAGGCCGAG	Combinada For K83S K85A R98S K99A K101S K102G
AVG2505	CTGCGCCTCGTCTCcccgaCTCCgcccgaAGCATTGATTATTCTCAGCA TGGCAGCCAGATCTTTcgcGAACgaCTTTATTATTTCC	Combinada Rev K83S K85A R98S K99A K101S K102G
AVG2490	CAGAAGTCCGGCTTTTAGCATATTGACAATCCGGAATCCTCC	ΔG Rev
AVG2491	CAATATGCTAAAAGCCGGACTTCTGCTGGGTCATGGG	ΔG For
AVG2492	AAAGGCTAGAATTGGCAGCCTCTTCAAGCCCCC	ΔK Rev
AVG2493	AAGAGGCTGCCAATTCTAGCCTTTTTGAGATTACGGC	ΔK For
AVG2494	CTTTATTATTTCCAGAATCGCCAAGACCATCCTGATGGG	ΔL Rev
AVG2495	GTCTTGGCGATTCTGGAAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTG GC	ΔL For
AVG2496	aggagctgCttaagTCTTTCCATAGCCTCTTTTTTCCCCACT	ΔM Rev
AVG2497	AGAGGCTATGGAAAGActtaaGcagctcctaaatttgattactcaaac	ΔM For
AVG2565	GAGTAGCCcatacGAGCCCTTTGGGGGCTTG	Stem 1 M1 For
AVG2566	GCCCCAAAGGGGCTCgtatGGGCTACTCCGC	Stem 1 M1 Rev
AVG2567	GTAGCCCGTGTGAAGAGGCTGCCAGCCGACTTCTG	ΔStem 2 For
AVG2568	GGCAGCCTCTTACACGGGGCTACTCCGCGTTTTAGCA	ΔStem 2 Rev
AVG2600	GTCAATATGCTAAAACaCaGAGTAGCCCGTGTGAGCC	LR M1 For
AVG2601	TCACACGGGCTACTCtGtTTTTAGCATATTGAC	LR M1 Rev
AVG2602	GTCAATATGCTAAAAGaGaGGAGTAGCCCGTGTGAG	Stem 1 M2 For
AVG2603	CTCACACGGGCTACTCCtCtTTTTAGCATATTGACAATCC	Stem 1 M2 Rev
AVG2610	GCTAAAACGCGacGTAGCCCGTGTGAGC	Loop M1 For
AVG2611	GCTCACACGGGCTACgtCGCGTTTTAGC	Loop M1 Rev
AVG2639	AATATGCTAAAAGcGGAGTAGCCCGTG	Stem 1 M3 For
AVG2640	CGGGCTACTCCGctTTTTAGCATATTGAC	Stem 1 M3 Rev
AVG2647	CCCCCGGAAAAtGtAAAACAGCATATTGAC	LR M1R For

AVG2648	TATGCTGTTTTaCaTTTTCCGGGGGGTCTCC	LR M1R Rev
AVG2651	GGCTATGGAATAATAAAGtcGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGC	K83S For
AVG2652	GATCTTTCTTGAACgaCTTTATTATTTCCATAGCCTCTTTTTTCCCC	K83S Rev
AVG2653	GAAATAATAAGAAGTTCgcGAAAGATCTGGCTGCCATGC	K85A For
AVG2654	GCATGGCAGCCAGATCTTTcgcGAACTTCTTTATTATTTTC	K85A Rev
AVG2679	CGCGGAGTAGCCCCGAGTGAGCCCCCTTTGGGG	Stem 1 M4 For
AVG2680	CCCCAAAGGGGCTCACTCGGGCTACTCCGCG	Stem 1 M4 Rev
AVG2824	CGCGGAGTAGCCCCgGTGAGCCCCCTTTGGGG	Pseudo rev S1M4 For
AVG2825	CCCCAAAGGGGCTCAcGCGGGCTACTCCGCG	Pseudo rev S1M4 Rev
AVG2844	GTCAATATGCTAAACaCGGAGTAGCCCGTGTG	LR M2 For
AVG2845	CACACGGGCTACTCCGtGTTTTAGCATATTGAC	LR M2 Rev
AVG2846	CCCGTGTGAaCCCCTTTGGaGGCTTGAAGAGGC	Stem2 M1 For
AVG2847	GCCTCTCAAGCCtCCAAAGGGGtTCACACGGG	Stem2 M1 Rev
AVG2848	AGCCCGTGTGAaCCtCTTTGGaGGtTTGAAGAGGCTGCC	Stem2 M2 For
AVG2849	GGCAGCCTCTTCAaCCtCCAAAGaGGtTCACACGGGCT	Stem2 M2 Rev
AVG2850	CGCGGAGgtGCCCGTGTGAGCCCC	PK M1 For
AVG2851	GGCTCACACGGGcAcCTCCGCTTTTAGC	PK M1 Rev
AVG2852	CGCGGAGgtGCCCGTGTGAGCCCCCTTTGGGGGCTTGAAGAGGCatCCAGCCGGAC	PK M2 For
AVG2853	GTCCGGCTGGatGCCTCTTCAAGCCCCCAAAGGGGCTCACACGGGCacCTCCGCTTTTAGC	PK M2 Rev
AVG2854	GCTAAAAaGCGGAGTAGCCCGTtTGAGCCCC	Stem 1 M3R For
AVG2855	GGGGCTCAaACGGGCTACTCCGctTTTTAGC	Stem 1 M3R Rev

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la introducción de mutaciones por PCR por solapamiento. Se realizan dos reacciones de PCR (A y B), cuyos productos se utilizan como molde para la reacción de PCR con los oligonucleótidos PCR A Fw y PCR B Rev, en la cual obtiene un producto solapado de A+B. Fw: oligonucleótido sentido, Rev: oligonucleótido antisentido.

Mutación	PCR A Fw	PCR A Rev	PCR B Fw	PCR B Rev
ΔC186-419 en IC	AVG2170	AVG2419	AVG2418	AVG2039
ΔC186-419 en Rep	AVG2170	AVG2421	AVG2420	AVG2137
C ZV K74S	AVG2107	AVG2439	AVG2438	AVG2039
C ZV K83SK85A	AVG2107	AVG2441	AVG2440	AVG2039
C ZV R98SK99A	AVG2107	AVG2507	AVG2506	AVG2039
C ZV K101SK102G	AVG2107	AVG2509	AVG2508	AVG2039
Combinada NLS	AVG2107	AVG2505	AVG2504	AVG2039
ΔG	AVG2170	AVG2491	AVG2490	AVG2416
ΔK	AVG2170	AVG2493	AVG2492	AVG2416
ΔL	AVG2170	AVG2495	AVG2494	AVG2416
ΔM	AVG2170	AVG2497	AVG2496	AVG2416
Stem 1 M1	AVG2170	AVG2566	AVG2565	AVG2416
ΔStem 2	AVG2170	AVG2568	AVG2567	AVG2416
LR M1	AVG2170	AVG2601	AVG2600	AVG2416
Stem 1 M2	AVG2170	AVG2603	AVG2602	AVG2416
Loop M1	AVG2170	AVG2611	AVG2610	AVG2416

Stem 1 M3	AVG2170	AVG2640	AVG2639	AVG2416
LR M1R	AVG2170	AVG2648	AVG2647	AVG2416
K83S	AVG2107	AVG2652	AVG2651	AVG2039
K85A	AVG2107	AVG2654	AVG2653	AVG2039
Stem 1 M4	AVG2170	AVG2680	AVG2679	AVG2416
Pseudo rev S1M4	AVG2170	AVG2825	AVG2824	AVG2416
LR M2	AVG2170	AVG2845	AVG2844	AVG2416
Stem2 M1	AVG2170	AVG2847	AVG2846	AVG2416
Stem2 M2	AVG2170	AVG2849	AVG2848	AVG2416
PK M1	AVG2170	AVG2851	AVG2850	AVG2416
PK M2	AVG2170	AVG2853	AVG2852	AVG2416
Stem 1 M3R	AVG2170	AVG2855	AVG2854	AVG2416

Referencias

- Acosta, Eliana G., Viviana Castilla, and Elsa B. Damonte. 2008. "Functional Entry of Dengue Virus into *Aedes Albopictus* Mosquito Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis." *The Journal of General Virology* 89(Pt 2):474–84.
- Acosta, Eliana G., Viviana Castilla, and Elsa B. Damonte. 2009. "Alternative Infectious Entry Pathways for Dengue Virus Serotypes into Mammalian Cells." *Cellular Microbiology* 11(10):1533–49.
- Acosta, Eliana G., Viviana Castilla, and Elsa B. Damonte. 2012. "Differential Requirements in Endocytic Trafficking for Penetration of Dengue Virus." *PLoS ONE* 7(9):44835.
- Addis, Siti Nor Khadijah, Eva Lee, Jayaram Bettadapura, and Mario Lobigs. 2015. "Proteolytic Cleavage Analysis at the Murray Valley Encephalitis Virus NS1-2A Junction." *Virology Journal* 12(1).
- Airo, Adriana M., Alberto Felix-Lopez, Valeria Mancinelli, Danyel Evseev, Joaquin Lopez-Orozco, Kathy Shire, Patrick Paszkowski, Lori Frappier, Katharine E. Magor, and Tom C. Hobman. 2022. "Flavivirus Capsid Proteins Inhibit the Interferon Response." *Viruses* 14(5):1–18.
- Akiyama, Benjamin M., Monica E. Graham, Zoe O'donoghue, J. David Beckham, and Jeffrey S. Kieft. 2021. "Three-Dimensional Structure of a Flavivirus Dumbbell RNA Reveals Molecular Details of an RNA Regulator of Replication." *Nucleic Acids Research* 49(12):7122–38.
- Aktepe, Turgut E. and Jason M. Mackenzie. 2018. "Shaping the Flavivirus Replication Complex: It Is Curvaceous!" *Cellular Microbiology* 20(8).
- Alenquer, Marta, Sílvia Vale-Costa, Temitope Akhigbe Etibor, Filipe Ferreira, Ana Laura Sousa, and Maria João Amorim. 2019. "Influenza A Virus Ribonucleoproteins Form Liquid Organelles at Endoplasmic Reticulum Exit Sites." *Nature Communications* 10(1).
- Alvarez, Diego E., Claudia V. Filomatori, and Andrea V. Gamarnik. 2008. "Functional Analysis of Dengue Virus Cyclization Sequences Located at the 5' and 3'UTRs." *Virology* 375(1):223–35.
- Alvarez, Diego E., Ana Laura De Lella Ezcurra, Silvana Fucito, and Andrea V. Gamarnik. 2005. "Role of RNA Structures Present at the 3'UTR of Dengue Virus on Translation, RNA Synthesis, and Viral Replication." *Virology* 339(2):200–212.
- Alvarez, Diego E., María F. Lodeiro, Silvio J. Ludueña, Lía I. Pietrasanta, and Andrea V. Gamarnik. 2005. "Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome." *Journal of Virology* 79(11):6631–43.
- Ambroggio, Ernesto E., Guadalupe S. Cost. Navarro, Luis Benito Pérez Socas, Luis A. Bagatolli, and Andrea V. Gamarnik. 2021. "Dengue and Zika Virus Capsid Proteins Bind to Membranes and Self-Assemble into Liquid Droplets with Nucleic Acids." *The Journal of Biological Chemistry* 297(3).
- Atasheva, Svetlana, Alexander Fish, Maarten Fornerod, and Elena I. Frolova. 2010. "Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Forms a Tetrameric Complex with CRM1 and Importin α/β That Obstructs Nuclear Pore Complex Function." *Journal of Virology* 84(9):4158–71.
- Atasheva, Svetlana, Natalia Garmashova, Ilya Frolov, and Elena Frolova. 2008. "Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Inhibits Nuclear Import in Mammalian but Not in Mosquito Cells." *Journal of Virology* 82(8):4028–41.
- Bacia, Kirsten, Elke Haustein, and Petra Schwillie. 2014. "Fluorescence Correlation Spectroscopy: Principles and Applications." *Cold Spring Harbor Protocols* 2014(7):pdb.top081802.

- Bagatolli, Luis A. and Roberto P. Stock. 2016. "The Use of 6-Acyl-2-(Dimethylamino)Naphthalenes as Relaxation Probes of Biological Environments." 197–216.
- Balinsky, Corey A., Hana Schmeisser, Sundar Ganesan, Kavita Singh, Theodore C. Pierson, and Kathryn C. Zoon. 2013. "Nucleolin Interacts with the Dengue Virus Capsid Protein and Plays a Role in Formation of Infectious Virus Particles." *Journal of Virology* 87(24):13094–106.
- Bhatt, Samir, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, John S. Brownstein, Anne G. Hoen, Osman Sankoh, Monica F. Myers, Dylan B. George, Thomas Jaenisch, G. R. William Wint, Cameron P. Simmons, Thomas W. Scott, Jeremy J. Farrar, and Simon I. Hay. 2013. "The Global Distribution and Burden of Dengue." *Nature* 2013 496:7446 496(7446):504–7.
- Bhuvanakantham, Raghavan, Yuen Kuen Cheong, Mah Lee Ng, Bhuvanakantham R, Cheong YK, and Ng ML. 2010. "West Nile Virus Capsid Protein Interaction with Importin and HDM2 Protein Is Regulated by Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation." *Microbes and Infection* 12(8–9):615–25.
- Bhuvanakantham, Raghavan, Mun Keat Chong, and Mah Lee Ng. 2009. "Specific Interaction of Capsid Protein and Importin- α/β Influences West Nile Virus Production." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389(1):63–69.
- Biswal, Shibadas, Humberto Reynales, Xavier Saez-Llorens, Pio Lopez, Charissa Borja-Tabora, Pope Kosalaraksa, Chukiat Sirivichayakul, Veerachai Watanaveeradej, Luis Rivera, Felix Espinoza, LakKumar Fernando, Reynaldo Dietze, Kleber Luz, Rivaldo Venâncio da Cunha, José Jimeno, Eduardo López-Medina, Astrid Borkowski, Manja Brose, Martina Rauscher, Inge LeFevre, Svetlana Bizjajeva, Lulu Bravo, and Derek Wallace. 2019. "Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents." *New England Journal of Medicine* 381(21):2009–19.
- Blaney, Joseph E., Anna P. Durbin, Brian R. Murphy, and Stephen S. Whitehead. 2006. "Development of a Live Attenuated Dengue Virus Vaccine Using Reverse Genetics." *Viral Immunology* 19(1):10–32.
- Blitvich, Bradley J. and Andrew E. Firth. 2015. "Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization." *Viruses* 7(4):1927.
- de Borba, Luana, Sergio M. Villordo, Nestor G. Iglesias, Claudia V. Filomatori, Leopoldo G. Gebhard, and Andrea V. Gamarnik. 2015. "Overlapping Local and Long-Range RNA-RNA Interactions Modulate Dengue Virus Genome Cyclization and Replication." *Journal of Virology* 89(6):3430–37.
- de Borba, Luana, Sergio M. Villordo, Franco L. Marsico, Juan M. Carballeda, Claudia V. Filomatori, Leopoldo G. Gebhard, Horacio M. Pallarés, Sebastian Lequime, Louis Lambrechts, Irma Sánchez Vargas, Carol D. Blair, and Andrea V. Gamarnik. 2019. "RNA Structure Duplication in the Dengue Virus 3' UTR: Redundancy or Host Specificity?" *MBio* 10(1).
- Boulant, Steeve, Paul Targett-Adams, and John McLauchlan. 2007. "Disrupting the Association of Hepatitis C Virus Core Protein with Lipid Droplets Correlates with a Loss in Production of Infectious Virus." *The Journal of General Virology* 88(Pt 8):2204–13.
- Brooks, Andrew J., Magnus Johansson, Anna V. John, Yibin Xu, David A. Jans, and Subhash G. Vasudevan. 2002. "The Interdomain Region of Dengue NS5 Protein That Binds to the Viral Helicase NS3 Contains Independently Functional Importin B1 and Importin α/β -Recognized Nuclear Localization Signals." *Journal of Biological Chemistry* 277(39):36399–407.
- Bulich, R. and J. G. Aaskov. 1992. *Nuclear Localization of Dengue 2 Virus Core Protein Detected with Monoclonal Antibodies*. Vol. 73.

- Butrapet, Siritorn, Claire Y. H. Huang, Dennis J. Pierro, Natth Bhamarapravati, Duane J. Gubler, and Richard M. Kinney. 2000. "Attenuation Markers of a Candidate Dengue Type 2 Vaccine Virus, Strain 16681 (PDK-53), Are Defined by Mutations in the 5' Noncoding Region and Nonstructural Proteins 1 and 3." *Journal of Virology* 74(7):3011–19.
- Byk, Laura A. and Andrea V. Gamarnik. 2016. "Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein." *Annual Review of Virology* 3:263–81.
- Byk, Laura A., Néstor G. Iglesias, Federico A. De Maio, Leopoldo G. Gebhard, Mario Rossi, and Andrea V. Gamarnik. 2016. "Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination." *MBio* 7(3):1–10.
- Byrd, Chelsea M., Dongcheng Dai, Douglas W. Grosenbach, Aklile Berhanu, Kevin F. Jones, Kara B. Cardwell, Christine Schneider, Kristin A. Wineinger, Jessica M. Page, Chris Harver, Eric Stavale, Shanthakumar Tyavanagimatt, Melialani A. Stone, Ralf Bartenschlager, Pietro Scaturro, Dennis E. Hrubby, and Robert Jordan. 2013. "A Novel Inhibitor of Dengue Virus Replication That Targets the Capsid Protein." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(1):15–25.
- Cahour, A., B. Falgout, and C. J. Lai. 1992. "Cleavage of the Dengue Virus Polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 Junctions Is Mediated by Viral Protease NS2B-NS3, Whereas NS4A/NS4B May Be Processed by a Cellular Protease." *Journal of Virology* 66(3):1535–42.
- Campbell, Lindsay P., Caylor Luther, David Moo-Llanes, Janine M. Ramsey, Rogelio Danis-Lozano, and A. Townsend Peterson. 2015. "Climate Change Influences on Global Distributions of Dengue and Chikungunya Virus Vectors." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1665):1–9.
- Cermelli, Silvia, Yi Guo, Steven P. Gross, and Michael A. Welte. 2006. "The Lipid-Droplet Proteome Reveals That Droplets Are a Protein-Storage Depot." *Current Biology: CB* 16(18):1783–95.
- Chen, Jincheng, Mary Mah Lee Ng, and Justin Jang Hann Chu. 2015. "Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection." *PLOS Pathogens* 11(7):e1005053.
- Chen, Lin H. and Mary Elizabeth Wilson. 2016. "Update on Non-Vector Transmission of Dengue: Relevant Studies with Zika and Other Flaviviruses." *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines* 2(1):1–6.
- Chen, Rubing and Nikos Vasilakis. 2011. "Dengue-Quo Tu et Quo Vadis?" *Viruses* 3(9):1562–1608.
- Chen, Yaping, Terry Maguire, Ronald E. Hileman, Jonathan R. Fromm, Jeffrey D. Esko, Robert J. Linhardt, and Rory M. Marks. 1997. "Dengue Virus Infectivity Depends on Envelope Protein Binding to Target Cell Heparan Sulfate." *Nature Medicine* 3(8):866–71.
- Chen, Yen Liang, Fumiaki Yokokawa, and Pei Yong Shi. 2015. "The Search for Nucleoside/Nucleotide Analog Inhibitors of Dengue Virus." *Antiviral Research* 122:12–19.
- Chu, J. J. H. and Mah Lee Ng. 2003. "The Mechanism of Cell Death during West Nile Virus Infection Is Dependent on Initial Infectious Dose." *Journal of General Virology* 84(12):3305–14.
- Chu, P. W. G. and E. G. Westaway. 1985. "Replication Strategy of Kunjin Virus: Evidence for Recycling Role of Replicative Form RNA as Template in Semiconservative and Asymmetric Replication." *Virology* 140(1):68–79.
- Ci, Yali, Zhong Yu Liu, Na Na Zhang, Yuqiang Niu, Yang Yang, Caimin Xu, Wei Yang, Cheng Feng Qin, and Lei Shi. 2020. "Zika NS1-Induced ER Remodeling Is Essential for Viral Replication." *Journal of Cell Biology* 219(2).
- Clarke, B. D., J. A. Roby, A. Slonchak, and A. A. Khromykh. 2015. "Functional Non-Coding RNAs Derived from the Flavivirus 3' Untranslated Region." *Virus Research* 206:53–61.

- Clyde, Karen, Julio Barrera, and Eva Harris. 2008. "The Capsid-Coding Region Hairpin Element (CHP) Is a Critical Determinant of Dengue Virus and West Nile Virus RNA Synthesis." *Virology* 379(2):314–23.
- Clyde, Karen and Eva Harris. 2006. "RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication." *Journal of Virology* 80(5):2170–82.
- Colpitts, Tonya M., Sebastian Barthel, Penghua Wang, and Erol Fikrig. 2011. "Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells." *PLoS ONE* 6(9).
- Counotte, Michel Jacques, Caron Rahn Kim, Jingying Wang, Kyle Bernstein, Carolyn D. Deal, Nathalie Jeanne Nicole Broutet, and Nicola Low. 2018. "Sexual Transmission of Zika Virus and Other Flaviviruses: A Living Systematic Review." 15(7):3.
- Coyne, Carolyn B. and Helen M. Lazear. 2016. "Zika Virus - Reigniting the TORCH." *Nature Reviews. Microbiology* 14(11):707–15.
- Cui, Taian, Richard J. Sugrue, Qiurong Xu, Adrian K. W. Lee, Yow Cheong Chan, and Jianlin Fu. 1998. "Recombinant Dengue Virus Type 1 NS3 Protein Exhibits Specific Viral RNA Binding and NTPase Activity Regulated by the NS5 Protein." *Virology* 246(2):409–17.
- Daep, Carlo Amorin, Jorge L. Muñoz-Jordán, and Eliseo Alberto Eugenin. 2014. "Flaviviruses, an Expanding Threat in Public Health: Focus on Dengue, West Nile, and Japanese Encephalitis Virus." *Journal of Neurovirology* 20(6):539.
- Daffis, Stephane, Kristy J. Szretter, Jill Schriewer, Jianqing Li, Soonjeon Youn, John Errett, Tsai Yu Lin, Stewart Schneller, Roland Zust, Hongping Dong, Volker Thiel, Ganes C. Sen, Volker Fensterl, William B. Klimstra, Theodore C. Pierson, R. Mark Buller, Michael Gale Jr, Pei Yong Shi, and Michael S. Diamond. 2010. "2'-O Methylation of the Viral mRNA Cap Evades Host Restriction by IFIT Family Members." *Nature* 468(7322):452–56.
- Dange, Thomas, David Grünwald, Antje Grünwald, Reiner Peters, and Ulrich Kubitscheck. 2008. "Autonomy and Robustness of Translocation through the Nuclear Pore Complex: A Single-Molecule Study." *The Journal of Cell Biology* 183(1):77–86.
- Davis, Carl W., Hai-Yen Nguyen, Sheri L. Hanna, Melissa D. Sánchez, Robert W. Doms, and Theodore C. Pierson. 2006. "West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection." *Journal of Virology* 80(3):1290.
- Denton, J. A., D. A. Joubert, A. A. Goundar, and J. R. L. Gilles. 2022. "International Shipments of Wolbachia-Infected Mosquito Eggs: Towards the Scaling-up of World Mosquito Program Operations." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 41(1):91–99.
- Dethoff, Elizabeth A., Mark A. Boerneke, Nandan S. Gokhale, Brejnev M. Muhire, Darren P. Martin, Matthew T. Sacco, Michael J. McFadden, Jules B. Weinstein, William B. Messer, Stacy M. Horner, and Kevin M. Weeks. 2018. "Pervasive Tertiary Structure in the Dengue Virus RNA Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(45):11513–18.
- Diallo, Diawo, Amadou A. Sall, Cheikh T. Diagne, Oumar Faye, Ousmane Faye, Yamar Ba, Kathryn A. Hanley, Michaela Buenemann, Scott C. Weaver, and Mawlouth Diallo. 2014. "Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011." *PLoS ONE* 9(10).
- Digman, Michelle A., Claire M. Brown, Parijat Sengupta, Paul W. Wiseman, Alan R. Horwitz, and Enrico Gratton. 2005. "Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope." *Biophysical Journal* 89(2):1317–27.
- Ding, Binbin, Yali Qin, and Mingzhou Chen. 2016. "Nucleocapsid Proteins: Roles beyond Viral RNA Packaging." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 7(2):213–26.
- Durbin, A. P., R. A. Karron, W. Sun, D. W. Vaughn, M. J. Reynolds, J. R. Perreault, B. Thumar, R. Men, C. J. Lai, W. R. Elkins, R. M. Chanock, B. R. Murphy, and S. S. Whitehead. 2001.

- “Attenuation and Immunogenicity in Humans of a Live Dengue Virus Type-4 Vaccine Candidate with a 30 Nucleotide Deletion in Its 3'-Untranslated Region.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65(5):405–13.
- Durbin, Anna P., Stephen S. Whitehead, Donna Shaffer, Dan Elwood, Kimberli Wanionek, Bhavin Thumar, Joseph E. Blaney, Brian R. Murphy, and Alexander C. Schmidt. 2011. “A Single Dose of the DENV-1 Candidate Vaccine RDEN1Δ30 Is Strongly Immunogenic and Induces Resistance to a Second Dose in a Randomized Trial.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(8):1267.
- Ebi, Kristie L. and Joshua Nealon. 2016. “Dengue in a Changing Climate.” *Environmental Research* 151:115–23.
- Egloff, Marie Pierre, Delphine Benarroch, Barbara Selisko, Jean Louis Romette, and Bruno Canard. 2002. “An RNA Cap (Nucleoside-2'-O-)-Methyltransferase in the Flavivirus RNA Polymerase NS5: Crystal Structure and Functional Characterization.” *The EMBO Journal* 21(11):2757.
- Falgout, B. and L. Markoff. 1995. “Evidence That Flavivirus NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum.” *Journal of Virology* 69(11):7232.
- Falgout, Barry, Michtle Pethel, Yi-Ming Zhang, and Ching-Juh Lai. 1991. “Both Nonstructural Proteins NS2B and NS3 Are Required for the Proteolytic Processing of Dengue Virus Nonstructural Proteins.” *Journal of Virology* 65(5):2467.
- Faller, Roland. 2021. *Ucd Biophysics 241 : Membrane Biology*.
- Farelo, Mafalda A., Despoina Korrou-Karava, Katrina F. Brooks, Tiffany A. Russell, Kevin Maringer, and Peter U. Mayerhofer. 2022. “Dengue and Zika Virus Capsid Proteins Contain a Common PEX19-Binding Motif.” *Viruses* 14(2):1–19.
- Faustino, André F., Ana S. Martins, Nina Karguth, Vanessa Artilheiro, Francisco J. Enguita, Joana C. Ricardo, Nuno C. Santos, and Ivo C. Martins. 2019. “Structural and Functional Properties of the Capsid Protein of Dengue and Related Flavivirus.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(16).
- Feng, Zhe, Xudong Chen, Xiandeng Wu, and Mingjie Zhang. 2019. “Formation of Biological Condensates via Phase Separation: Characteristics, Analytical Methods, and Physiological Implications.” *Journal of Biological Chemistry* 294(40):14823–35.
- Filomatori, Claudia V., Juan M. Carballeda, Sergio M. Villordo, Sebastian Aguirre, Horacio M. Pallarés, Ana M. Maestre, Irma Sánchez-Vargas, Carol D. Blair, Cintia Fabri, Maria A. Morales, Ana Fernandez-Sesma, and Andrea V. Gamarnik. 2017. “Dengue Virus Genomic Variation Associated with Mosquito Adaptation Defines the Pattern of Viral Non-Coding RNAs and Fitness in Human Cells.” *PLoS Pathogens* 13(3):1–23.
- Filomatori, Claudia V., Maria F. Lodeiro, Diego E. Alvarez, Marcelo M. Samsa, Lía Pietrasanta, and Andrea V. Gamarnik. 2006. “A 5' RNA Element Promotes Dengue Virus RNA Synthesis on a Circular Genome.” *Genes and Development* 20(16):2238–49.
- Fitzpatrick, James A. J. and Björn F. Lillemeier. 2011. “Fluorescence Correlation Spectroscopy: Linking Molecular Dynamics to Biological Function in Vitro and in Situ.” *Current Opinion in Structural Biology* 21(5):650–60.
- Fontaine, Krystal A., Kristoffer E. Leon, Mir M. Khalid, Sakshi Tomar, David Jimenez-Morales, Mariah Dunlap, Julia A. Kaye, Priya S. Shah, Steve Finkbeiner, Nevan J. Krogan, and Melanie Ott. 2018. “The Cellular NMD Pathway Restricts Zika Virus Infection and Is Targeted by the Viral Capsid Protein.” *MBio* 9(6).
- Friebe, Peter and Eva Harris. 2010. “Interplay of RNA Elements in the Dengue Virus 5' and 3' Ends Required for Viral RNA Replication.” *Journal of Virology* 84(12):6103–18.
- Friebe, Peter, Pei-Yong P. Y. Shi, and Eva Harris. 2011. “The 5' and 3' Downstream AUG Region Elements Are Required for Mosquito-Borne Flavivirus RNA Replication.” *Journal of*

Virology 85(4):1900–1905.

- Gabriel, Manuela V., Ignacio Sallaberry, Guadalupe S. Costa Navarro, Enrico Gratton, Andrea V. Gamarnik, and Laura C. Estrada. 2022. “Dengue Virus Capsid-Protein Dynamics in Live Infected Cells Studied by Pair Correlation Analysis.” Pp. 99–117 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2409. Humana Press Inc.
- García, Cybele C., Cecilia A. Vázquez, Federico Giovannoni, Constanza A. Russo, Sandra M. Cordo, Agustina Alaimo, and Elsa B. Damonte. 2020. “Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells.” *Frontiers in Microbiology* 11:1558.
- Garmashova, Natalia, Svetlana Atasheva, Wenli Kang, Scott C. Weaver, Elena Frolova, and Ilya Frolov. 2007. “Analysis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Function in the Inhibition of Cellular Transcription.” *Journal of Virology* 81(24):13552–65.
- Gaunt, M. W., A. A. Sall, X. de Lamballerie, A. K. I. Falconar, T. I. Dzhivanian, and E. A. Gould. 2001. “Phylogenetic Relationships of Flaviviruses Correlate with Their Epidemiology, Disease Association and Biogeography.” *Journal of General Virology* 82(8):1867–76.
- Gebhard, Leopoldo G., Claudia V. Filomatori, and Andrea V. Gamarnik. 2011. “Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome.” *Viruses* 3(9):1739–56.
- Gebhard, Leopoldo G., Néstor G. Iglesias, Laura A. Byk, Claudia V. Filomatori, Federico A. De Maio, and Andrea V. Gamarnik. 2016. “A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production.” *Journal of Virology* 90(11):5451–61.
- Gebhard, Leopoldo G., Sergio B. Kaufman, and Andrea V. Gamarnik. 2012. “Novel ATP-Independent RNA Annealing Activity of the Dengue Virus NS3 Helicase.” *PLoS One* 7(4).
- Glasner, Dustin R., Henry Puerta-Guardo, P. Robert Beatty, and Eva Harris. 2018. “The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis.” <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041848> 5:227–53.
- Goodfellow, John A. and Hugh J. Willison. 2016. “Guillain–Barré Syndrome: A Century of Progress.” *Nature Reviews Neurology* 2016 12:12 12(12):723–31.
- Gould, EA and T. Solomon. 2008. “Pathogenic Flaviviruses.” *The Lancet* 371(9611):500–509.
- Gould, Ernest A., Xavier de Lamballerie, Pablo M. d. A. Zanotto, and Edward C. Holmes. 2003. “Origins, Evolution, and Vector/Host Coadaptations within the Genus Flavivirus.” *Advances in Virus Research* 59:277–314.
- Guirakhoo, F., J. Arroyo, K. V. Pugachev, C. Miller, Z. X. Zhang, R. Weltzin, K. Georgakopoulos, J. Catalan, S. Ocran, K. Soike, M. Ratterree, and T. P. Monath. 2001. “Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine.” *Journal of Virology* 75(16):7290–7304.
- Guzman, Maria G. and Eva Harris. 2015. “Dengue.” *The Lancet* 385(9966):453–65.
- Hackett, Brent A. and Sara Cherry. 2018. “Flavivirus Internalization Is Regulated by a Size-Dependent Endocytic Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(16):4246–51.
- Hackett, Brent A., Ari Yasunaga, Debasis Panda, Michael A. Tartell, Kaycie C. Hopkins, Scott E. Hensley, and Sara Cherry. 2015. “RNASEK Is Required for Internalization of Diverse Acid-Dependent Viruses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(25):7797–7802.
- Halstead, S. B., J. S. Chow, and N. J. Marchette. 1973. “Immunological Enhancement of Dengue Virus Replication.” *Nature New Biology* 243(122):24–25.
- Halstead, S. B. and E. J. O’Rourke. 1977. “Dengue Viruses and Mononuclear Phagocytes: I. Infection Enhancement by Non-Neutralizing Antibody*.” *Journal of Experimental Medicine* 146(1):201–17.

- Halstead, Scott B. 2017. "Dengvaxia Sensitizes Seronegatives to Vaccine Enhanced Disease Regardless of Age." *Vaccine* 35(47):6355–58.
- Halstead, Scott B., Suresh Mahalingam, Mary A. Marovich, Sukathida Ubol, and David M. Mosser. 2010. "Intrinsic Antibody-Dependent Enhancement of Microbial Infection in Macrophages: Disease Regulation by Immune Complexes." 10(10).
- He, Yu, Xiaoli Wang, Jiaqi Guo, Li Mao, Senzhao Zhang, Tao Hu, Mingshu Wang, Renyong Jia, Dekang Zhu, Mafeng Liu, Xinxin Zhao, Qiao Yang, Ying Wu, Shaqiu Zhang, Juan Huang, Sai Mao, Xumin Ou, Qun Gao, Di Sun, Yunya Liu, Ling Zhang, Yanling Yu, Anchun Cheng, and Shun Chen. 2021. "Replication/Assembly Defective Avian Flavivirus With Internal Deletions in the Capsid Can Be Used as an Approach for Living Attenuated Vaccine." *Frontiers in Immunology* 12(August):1–15.
- Hebert, Benedict, Santiago Costantino, and Paul W. Wiseman. 2005. "Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS) Theory, Verification, and Application to Protein Velocity Mapping in Living CHO Cells." *Biophysical Journal* 88(5):3601.
- Heinrich, Bianca S., Zoltan Maliga, David A. Stein, Anthony A. Hyman, and Sean P. J. Whelan. 2018. "Phase Transitions Drive the Formation of Vesicular Stomatitis Virus Replication Compartments." *MBio* 9(5).
- Hou, Wangheng, Ruth Cruz-cosme, Najealicka Armstrong, Lilian Akello Obwolo, Fayuan Wen, Wenhui Hu, Min Hua Luo, and Qiyi Tang. 2017. "Molecular Cloning and Characterization of the Genes Encoding the Proteins of Zika Virus." *Gene* 628:117–28.
- Howley, Peter M., David M. (David Mahan) Knipe, and Sean P. J. Whelan. 2021. *Fields Virology. Volume 1, Emerging Viruses*.
- Huang, Claire Y. H., Siritorn Butrapet, Kiyotaka R. Tsuchiya, Natth Bhamarapravati, Duane J. Gubler, and Richard M. Kinney. 2003. "Dengue 2 PDK-53 Virus as a Chimeric Carrier for Tetravalent Dengue Vaccine Development." *Journal of Virology* 77(21):11436–47.
- Huber, Roland G., Xin Ni Lim, Wy Ching Ng, Adelene Y. L. Sim, Hui Xian Poh, Yang Shen, Su Ying Lim, Karin B. Sundstrom, Xuyang Sun, Jong Ghut Aw, Horng Khit Too, Peng Hee Boey, Andreas Wilm, Tanu Chawla, Milly M. Choy, Lu Jiang, Paola Florez de Sessions, Xian Jun Loh, Sylvie Alonso, Martin Hibberd, Niranjan Nagarajan, Eng Eong Ooi, Peter J. Bond, October M. Sessions, and Yue Wan. 2019. "Structure Mapping of Dengue and Zika Viruses Reveals Functional Long-Range Interactions." *Nature Communications* 10(1).
- Humphrey, William, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *Journal of Molecular Graphics* 14(1):33–38.
- Hussain, Khairunnisa Mohamed, Regina Ching Hua Lee, Mary Mah Lee Ng, and Justin Jang Hann Chu. 2016. "Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis." *Scientific Reports* 2016 6:1 6(1):1–12.
- Iglesias, Nestor G., Juan A. Mondotte, Laura A. Byk, Federico A. De Maio, Marcelo M. Samsa, Cecilia Alvarez, and Andrea V. Gamarnik. 2015. "Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets." *Traffic* 16(9):962–77.
- Ilinkaya, O. N. and Raihan Shah Mahmud. 2014. "Ribonucleases as Antiviral Agents." *Molecular Biology* 48(5):615–23.
- Iserman, Christiane, Christine A. Roden, Mark A. Boerneke, Rachel S. G. Sealfon, Grace A. McLaughlin, Irwin Jungreis, Ethan J. Fritch, Yixuan J. Hou, Joanne Ekena, Chase A. Weidmann, Chandra L. Theesfeld, Manolis Kellis, Olga G. Troyanskaya, Ralph S. Baric, Timothy P. Sheahan, Kevin M. Weeks, and Amy S. Gladfelter. 2020. "Genomic RNA Elements Drive Phase Separation of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid." *Molecular Cell* 80(6):1078.
- Ivanyi-Nagy, Roland and Jean-Luc Darlix. 2010. "Intrinsic Disorder in the Core Proteins of Flaviviruses." *Protein & Peptide Letters* 17(8):1019–25.

- de Jesús-González, Luis Adrián, Margot Cervantes-Salazar, José Manuel Reyes-Ruiz, Juan Fidel Osuna-Ramos, Carlos Noe Farfán-Morales, Selvin Noé Palacios-Rápalo, José Humberto Pérez-Olais, Carlos Daniel Cordero-Rivera, Arianna M. Hurtado-Monzón, Fernando Ruíz-Jiménez, Ana Lorena Gutiérrez-Escolano, and Rosa María del Ángel. 2020. "The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses." *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 583 12(6):583.
- De Jesús-González, Luis Adrián, Selvin Noé Palacios-Rápalo, José Manuel Reyes-Ruiz, Juan Fidel Osuna-Ramos, Carlos Noe Farfán-Morales, Carlos Daniel Cordero-Rivera, Bulmaro Cisneros, Ana Lorena Gutiérrez-Escolano, and Rosa María del Ángel. 2022. "Nucleo-Cytoplasmic Transport of ZIKV Non-Structural 3 Protein Is Mediated by Importin- α/β and Exportin CRM-1." *Journal of Virology*.
- Katzelnick, Leah C., Lionel Gresh, M. Elizabeth Halloran, Juan Carlos Mercado, Guillermina Kuan, Aubree Gordon, Angel Balmaseda, and Eva Harris. 2017. "Antibody-Dependent Enhancement of Severe Dengue Disease in Humans." *Science (New York, N.Y.)* 358(6365):929–32.
- Khromykh, A. A. and E. G. Westaway. 1996. "RNA Binding Properties of Core Protein of the Flavivirus Kunjin." *Archives of Virology* 141(3–4):685–99.
- Khromykh, Alexander A., Hedije Meka, Kimberley J. Guyatt, and Edwin G. Westaway. 2001. "Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication." *Journal of Virology* 75(14):6719–28.
- Kirkegaard, Karla, Nicholas J. van Buuren, and Roberto Mateo. 2016. "My Cousin, My Enemy: Quasispecies Suppression of Drug Resistance." *Current Opinion in Virology* 20:106–11.
- Kitamura, Akira and Masataka Kinjo. 2018. "Determination of Diffusion Coefficients in Live Cells Using Fluorescence Recovery after Photobleaching with Wide-Field Fluorescence Microscopy." *Biophysics and Physicobiology* 15:1–7.
- Klumpp, Klaus and Thibaut Crépin. 2014. "Capsid Proteins of Enveloped Viruses as Antiviral Drug Targets." *Current Opinion in Virology* 5(1):63–71.
- Knipe Howley, P., D. M. 1990. *Fields Virology*. Vol. 113. Sixth Edit. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Kofler, Regina M., Franz X. Heinz, and Christian W. Mandl. 2002. "Capsid Protein C of Tick-Borne Encephalitis Virus Tolerates Large Internal Deletions and Is a Favorable Target for Attenuation of Virulence." *Journal of Virology* 76(7).
- Kofler, Regina M., Agnes Leitner, Gabriel O'Riordain, Franz X. Heinz, and Christian W. Mandl. 2003. "Spontaneous Mutations Restore the Viability of Tick-Borne Encephalitis Virus Mutants with Large Deletions in Protein C." *Journal of Virology* 77(1):443–51.
- Koonin, E. V. 1991. "The Phylogeny of RNA-Dependent RNA Polymerases of Positive-Strand RNA Viruses." *The Journal of General Virology* 72 (Pt 9)(9):2197–2206.
- Kosugi, Shunichi, Masako Hasebe, Nobutaka Matsumura, Hideaki Takashima, Etsuko Miyamoto-Sato, Masaru Tomita, and Hiroshi Yanagawa. 2009. "Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin α ." *Journal of Biological Chemistry* 284(1):478–85.
- Kraemer, Moritz U. G., Marianne E. Sinka, Kirsten A. Duda, Adrian Q. N. Mylne, Freya M. Shearer, Christopher M. Barker, Chester G. Moore, Roberta G. Carvalho, Giovanini E. Coelho, Wim Van Bortel, Guy Hendrickx, Francis Schaffner, Iqbal Rf Elyazar, Hwa Jen Teng, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, David M. Pigott, Thomas W. Scott, David L. Smith, G. R. William Wint, Nick Golding, and Simon I. Hay. 2015. "The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*." *ELife* 4(JUNE2015).
- Kubitscheck, Ulrich, David Grünwald, Andreas Hoekstra, Daniel Rohleder, Thorsten Kues, Jan Peter Siebrasse, and Reiner Peters. 2005. "Nuclear Transport of Single Molecules: Dwell Times at the Nuclear Pore Complex." *The Journal of Cell Biology* 168(2):233–43.

- Kuhn, Richard J., Wei Zhang, Michael G. Rossmann, Sergei V. Pletnev, Jeroen Corver, Edith Lenches, Christopher T. Jones, Suchetana Mukhopadhyay, Paul R. Chipman, Ellen G. Strauss, Timothy S. Baker, and James H. Strauss. 2002. "Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion." *Cell* 108(5):717–25.
- Kumar, Rinki, Nirpendra Singh, Malik Z. Abdin, Arvind H. Patel, and Guruprasad R. Medigeshi. 2018. "Dengue Virus Capsid Interacts with DDX3X-A Potential Mechanism for Suppression of Antiviral Functions in Dengue Infection." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7(JAN):1–15.
- Lee, Eva, Christine E. Stocks, Sean M. Amberg, Charles M. Rice, and Mario Lobigs. 2000. "Mutagenesis of the Signal Sequence of Yellow Fever Virus PrM Protein: Enhancement of Signalase Cleavage In Vitro Is Lethal for Virus Production." *Journal of Virology* 74(1):24–32.
- Leung, Jason Y., Gorben P. Pijlman, Natasha Kondratieva, Jennifer Hyde, Jason M. Mackenzie, and Alexander A. Khromykh. 2008. "Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly." *Journal of Virology* 82(10):4731–41.
- Li, Haohua, Christina Ernst, Marta Kolonko-Adamska, Beata Greb-Markiewicz, Jackie Man, Vincent Parissi, and Billy Wai Lung Ng. 2022. "Phase Separation in Viral Infections." *Trends in Microbiology* 30(12):1217–31.
- Li, Pan, Yifan Wei, Miao Mei, Lei Tang, Lei Sun, Wenze Huang, Jianyu Zhou, Chunlin Zou, Shaojun Zhang, Cheng Feng Qin, Tao Jiang, Jianfeng Dai, Xu Tan, and Qiangfeng Cliff Zhang. 2018. "Integrative Analysis of Zika Virus Genome RNA Structure Reveals Critical Determinants of Viral Infectivity." *Cell Host and Microbe* 24(6):875-886.e5.
- Li, Xiao-Dan, Cheng-Lin Deng, Han-Qing Ye, Hong-Lei Zhang, Qiu-Yan Zhang, Dong-Dong Chen, Pan-Tao Zhang, Pei-Yong Shi, Zhi-Ming Yuan, and Bo Zhang. 2016. "Transmembrane Domains of NS2B Contribute to Both Viral RNA Replication and Particle Formation in Japanese Encephalitis Virus." *Journal of Virology* 90(12):5735–49.
- Li, Zhong, Matthew Brecher, Yong Qiang Deng, Jing Zhang, Srilatha Sakamuru, Binbin Liu, Ruili Huang, Cheri A. Koetzner, Christina A. Allen, Susan A. Jones, Haiying Chen, Na Na Zhang, Min Tian, Fengshan Gao, Qishan Lin, Nilesh Banavali, Jia Zhou, Nathan Boles, Menghang Xia, Laura D. Kramer, Cheng Feng Qin, and Hongmin Li. 2017. "Existing Drugs as Broad-Spectrum and Potent Inhibitors for Zika Virus by Targeting NS2B-NS3 Interaction." *Cell Research* 2017 27:8 27(8):1046–64.
- Lindenbach, Brett D. and Charles M. Rice. 2007. "Flaviviridae: The Viruses and Their Replication." *Fields Virology* 1101–51.
- Liu, Zhong-Yu, Xiao-Feng Li, Tao Jiang, Yong-Qiang Deng, Hui Zhao, Hong-Jiang Wang, Qing Ye, Shun-Ya Zhu, Yang Qiu, Xi Zhou, E. De Qin, and Cheng-Feng Qin. 2013. "Novel Cis -Acting Element within the Capsid-Coding Region Enhances Flavivirus Viral-RNA Replication by Regulating Genome Cyclization ." *Journal of Virology* 87(12):6804–18.
- Liu, Zhong-Yu, Jiu-Yang Yu, Xing-Yao Huang, Hang Fan, Xiao-Feng Li, Yong-Qiang Deng, Xue Ji, Meng-Li Cheng, Qing Ye, Hui Zhao, Jian-Feng Han, Xiao-Ping An, Tao Jiang, Bo Zhang, Yi-Gang Tong, and Cheng-Feng Qin. 2017. "Characterization of Cis -Acting RNA Elements of Zika Virus by Using a Self-Splicing Ribozyme-Dependent Infectious Clone ." *Journal of Virology* 91(21).
- Lobigs, Mario and Eva Lee. 2004. "Inefficient Signalase Cleavage Promotes Efficient Nucleocapsid Incorporation into Budding Flavivirus Membranes." *Journal of Virology* 78(1):178–86.
- Lobigs, Mario, Eva Lee, Mah Lee Ng, Megan Pavy, and Päivi Lobigs. 2010. "A Flavivirus Signal Peptide Balances the Catalytic Activity of Two Proteases and Thereby Facilitates Virus Morphogenesis." *Virology* 401(1):80–89.
- Ma, Lixin, Christopher T. Jones, Teresa D. Groesch, Richard J. Kuhn, and Carol Beth Post. 2004. "Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10):3414–19.
- Macháň, Radek, Thorsten Wohland, Elias M. Puchner, Bo Huang, Hermann E. Gaub, and Wilhelm Just. 2014. “Recent Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy in Live Systems.” *FEBS Letters* 588(19):3571–84.
- Mackenzie, Jason. 2005. “Wrapping Things up about Virus RNA Replication.” *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6(11):967–77.
- Magde, Douglas, Elliot Elson, and W. W. Webb. 1972. “Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy.” *Physical Review Letters* 29(11):705.
- Majerová, Taťána, Pavel Novotný, Eliška Krýsová, and Jan Konvalinka. 2019. “Exploiting the Unique Features of Zika and Dengue Proteases for Inhibitor Design.” *Biochimie* 166:132–41.
- Malacrida, Leonel, Per Niklas Hedde, Suman Ranjit, Francesco Cardarelli, and Enrico Gratton. 2018. “Visualization of Barriers and Obstacles to Molecular Diffusion in Live Cells by Spatial Pair-Cross-Correlation in Two Dimensions.” *Biomedical Optics Express* 9(1):303.
- Mansuy, Jean Michel, Elsa Suberbielle, Sabine Chapuy-Regaud, Catherine Mengelle, Louis Bujan, Bruno Marchou, Pierre Delobel, Daniel Gonzalez-Dunia, Cécile E. Malnou, Jacques Izopet, and Guillaume Martin-Blondel. 2016. “Zika Virus in Semen and Spermatozoa.” *The Lancet Infectious Diseases* 16(10):1106–7.
- Martins, Ivo C., Francisco Gomes-Neto, André F. Faustino, Filomena A. Carvalho, Fabiana A. Carneiro, Patricia T. Bozza, Ronaldo Mohana-Borges, Miguel A. R. B. Castanho, Fábio C. L. Almeida, Nuno C. Santos, and Andrea T. Da Poian. 2012. “The Disordered N-Terminal Region of Dengue Virus Capsid Protein Contains a Lipid-Droplet-Binding Motif.” *Biochemical Journal* 444(3):405–15.
- Mateo, Roberto, Claude M. Nagamine, and Karla Kirkegaard. 2015. “Suppression of Drug Resistance in Dengue Virus.” *MBio* 6(6).
- Meertens, Laurent, Xavier Carnec, Manuel Perera Lecoin, Rasika Ramdasi, Florence Guivel-Benhassine, Erin Lew, Greg Lemke, Olivier Schwartz, and Ali Amara. 2012. “The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry.” *Cell Host & Microbe* 12(4):544–57.
- Messina, Jane P., Oliver J. Brady, David M. Pigott, Nick Golding, Moritz U. G. Kraemer, Thomas W. Scott, G. R. Willia. Wint, David L. Smith, and Simon I. Hay. 2015. “The Many Projected Futures of Dengue.” *Nature Reviews Microbiology* 2015 13:4 13(4):230–39.
- Miller, Sven, Stefan Kastner, Jacomine Krijnse-Locker, Sandra Bühler, and Ralf Bartenschlager. 2007. “The Non-Structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-Regulated Manner.” *The Journal of Biological Chemistry* 282(12):8873–82.
- Miller, Sven, Sandra Sparacio, and Ralf Bartenschlager. 2006. “Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-Structural Protein 4B.” *The Journal of Biological Chemistry* 281(13):8854–63.
- Miner, Jonathan J. and Michael S. Diamond. 2017. “Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism.” *Cell Host & Microbe* 21(2):134.
- Mitrea, Diana M. and Richard W. Kriwacki. 2016. “Phase Separation in Biology; Functional Organization of a Higher Order Short Linear Motifs - The Unexplored Frontier of the Eukaryotic Proteome.” *Cell Communication and Signaling* 14(1):1–20.
- Miyanari, Yusuke, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, and Kunitada Shimotohno. 2007. “The Lipid Droplet Is an Important Organelle for Hepatitis C Virus Production.” *Nature Cell Biology* 9(9):1089–97.

- Mondotte, Juan A., Pierre-Yves Lozach, Ali Amara, and Andrea V. Gamarnik. 2007. "Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation." *Journal of Virology* 81(13):7136–48.
- Monel, Blandine, Alex A. Compton, Timothée Bruel, Sonia Amraoui, Julien Burlaud -Gaillard, Nicolas Roy, Florence Guivel -Benhassine, Françoise Porrot, Pierre Génin, Laurent Meertens, Laura Sinigaglia, Nolwenn Jouvenet, Robert Weil, Nicoletta Casartelli, Caroline Demangel, Etienne Simon- Lorière, Arnaud Moris, Philippe Roingear, Ali Amara, Olivier Schwartz, Julien Burlaud-Gaillard, Nicolas Roy, Florence Guivel-Benhassine, Françoise Porrot, Pierre Génin, Laurent Meertens, Laura Sinigaglia, Nolwenn Jouvenet, Robert Weil, Nicoletta Casartelli, Caroline Demangel, Etienne Simon-Lorière, Arnaud Moris, Philippe Roingear, Ali Amara, and Olivier Schwartz. 2017. "Zika Virus Induces Massive Cytoplasmic Vacuolization and Paraptosis -like Death in Infected Cells." *The EMBO Journal* 36(12):1653–68.
- Monel, Blandine, Maaran Michael Rajah, Mohamed Lamine Hafirassou, C. Samy, Sid Ahmed, Julien Burlaud-Gaillard, Peng-Peng Zhu, Quentin Nevers, Julian Buchrieser, Françoise Porrot, Cécile Meunier, Sonia Amraoui, Maxime Chazal, Audrey Salles, Nolwenn Jouvenet, Philippe Roingear, Craig Blackstone, Ali Amara, and Olivier Schwartz. 2019. "Atlantin Endoplasmic Reticulum-Shaping Proteins Facilitate Zika Virus Replication."
- Monson, E. A., K. M. Crosse, M. Duan, W. Chen, R. D. O'Shea, L. M. Wakim, J. M. Carr, D. R. Whelan, and K. J. Helbig. 2021. "Intracellular Lipid Droplet Accumulation Occurs Early Following Viral Infection and Is Required for an Efficient Interferon Response." *Nature Communications* 12(1):1–17.
- Morando, Maria A., Glauce M. Barbosa, Christine Cruz-Oliveira, Andrea T. Da Poian, and Fabio C. L. L. Almeida. 2019. "Dynamics of Zika Virus Capsid Protein in Solution: The Properties and Exposure of the Hydrophobic Cleft Are Controlled by the α -Helix 1 Sequence." *Biochemistry* 58(20):2488–98.
- Mori, Yoshio, Tamaki Okabayashi, Tetsuo Yamashita, Zijiang Zhao, Takaji Wakita, Kotaro Yasui, Futoshi Hasebe, Masayuki Tadano, Eiji Konishi, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. 2005. "Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication." *Journal of Virology* 79(6):3448–58.
- Mukhopadhyay, Suchetana, Bong Suk Kim, Paul R. Chipman, Michael G. Rossmann, and Richard J. Kuhn. 2003. "Structure of West Nile Virus." *Science* 302(5643):248.
- Mukhopadhyay, Suchetana, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. 2005. "A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle." *Nature Reviews Microbiology* 3(1):13–22.
- Navarro-Sanchez, Erika, Ralf Altmeyer, Ali Amara, Olivier Schwartz, Franck Fieschi, Jean Louis Virelizier, Fernando Arenzana-Seisdedos, and Philippe Desprès. 2003. "Dendritic-Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin Is Essential for the Productive Infection of Human Dendritic Cells by Mosquito-Cell-Derived Dengue Viruses." *EMBO Reports* 4(7):723–28.
- Netsawang, Janjuree, Sansanee Noisakran, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrer, Wiyada Wongwiwat, Prida Malasit, Pa thai Yenchitsomanus, and Thawornchai Limjindaporn. 2010. "Nuclear Localization of Dengue Virus Capsid Protein Is Required for DAXX Interaction and Apoptosis." *Virus Research* 147(2):275–83.
- Nicholson, Beth L. and K. Andrew White. 2015. "Exploring the Architecture of Viral RNA Genomes." *Current Opinion in Virology* 12:66–74.
- Nikolic, Jovan, Romain Le Bars, Zoé Lama, Nathalie Scrima, Cécile Lagaudrière-Gesbert, Yves Gaudin, and Danielle Blondel. 2017. "Negri Bodies Are Viral Factories with Properties of Liquid Organelles." *Nature Communications* 8(1).
- OPS. 2016. *Instrumento Para El Diagnóstico y La Atención a Pacientes Con Sospecha de Arbovirosis*. Vol. 97.
- PAHO. 2020. *Integrated Management Strategy for Arboviral Disease Prevention and Control in the Americas*. Organización Panamericana de la Salud.

- Pallarés, Horacio M., Guadalupe Soledad Costa Navarro, Sergio M. Villordo, Fernando Merwaiss, Luana de Borba, Maria M. Gonzalez Lopez Ledesma, Diego S. Ojeda, Annabelle Henrion-Lacritick, Maria A. Morales, Cintia Fabri, María Carla Saleh, and Andrea V. Gamarnik. 2020. "Zika Virus Subgenomic Flavivirus RNA Generation Requires Cooperativity between Duplicated RNA Structures That Are Essential for Productive Infection in Human Cells." *Journal of Virology* 94(18):1–20.
- Patkar, Chinmay G., Christopher T. Jones, Yu-hsuan Chang, Ranjit Warriar, and Richard J. Kuhn. 2007. "Functional Requirements of the Yellow Fever Virus Capsid Protein." *Journal of Virology* 81(12):6471–81.
- Peeling, Rosanna W., Harvey Artsob, Jose Luis Pelegrino, Philippe Buchy, Mary J. Cardoso, Shamala Devi, Delia A. Enria, Jeremy Farrar, Duane J. Gubler, Maria G. Guzman, Scott B. Halstead, Elizabeth Hunsperger, Susie Kliks, Harold S. Margolis, Carl M. Nathanson, Vinh Chau Nguyen, Nidia Rizzo, Susana Vázquez, and Sutee Yoksan. 2010. "Evaluation of Diagnostic Tests: Dengue." *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:12 8(12):S30–37.
- Petersen, N. O., P. L. Höddelius, P. W. Wiseman, O. Seger, and K. E. Magnusson. 1993. "Quantitation of Membrane Receptor Distributions by Image Correlation Spectroscopy: Concept and Application." *Biophysical Journal* 65(3):1135–46.
- Pijlman, Gorben P., Anneke Funk, Natasha Kondratieva, Jason Leung, Shessy Torres, Lieke van der Aa, Wen Jun Liu, Ann C. Palmenberg, Pei Yong Shi, Roy A. Hall, and Alexander A. Khromykh. 2008. "A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity." *Cell Host and Microbe* 4(6):579–91.
- Pong, Wen Li, Zhi Shun Huang, Pak Guan Teoh, Chung Chun Wang, and Huey Nan Wu. 2011. "RNA Binding Property and RNA Chaperone Activity of Dengue Virus Core Protein and Other Viral RNA-Interacting Proteins." *FEBS Letters* 585(16):2575–81.
- Powell, Jeffrey R. 2022. "Modifying Mosquitoes to Suppress Disease Transmission: Is the Long Wait Over?" *Genetics* 221(3).
- Prasad, Vidya Mangala, Andrew S. Miller, Thomas Klose, Devika Sirohi, Geeta Buda, Wen Jiang, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. 2017. "Structure of the Immature Zika Virus at 9 Å Resolution." *Nature Structural and Molecular Biology* 24(2):184–86.
- Rana, Jyoti, José Luis Slon Campos, Gabriella Leccese, Maura Francolini, Marco Bestagno, Monica Poggianella, and Oscar R. Burrone. 2018. "Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus." *Journal of Virology* 92(22).
- Rana, Jyoti, José Luis Slon Campos, Monica Poggianella, and Oscar R. Burrone. 2019. "Dengue Virus Capsid Anchor Modulates the Efficiency of Polyprotein Processing and Assembly of Viral Particles." *The Journal of General Virology* 100(12):1663–73.
- Rasmussen, Sonja A., Denise J. Jamieson, Margaret A. Honein, and Lyle R. Petersen. 2016. "Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality." *New England Journal of Medicine* 374(20):1981–87.
- Rathore, Abhay P. S. and Ashley L. St. John. 2020. "Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses." *Frontiers in Immunology* 11(February):1–9.
- Rawlinson, Stephen M., Melinda J. Pryor, Peter J. Wright, and David A. Jans. 2009. "CRM1-Mediated Nuclear Export of Dengue Virus RNA Polymerase NS5 Modulates Interleukin-8 Induction and Virus Production." *The Journal of Biological Chemistry* 284(23):15589–97.
- Rhine, Kevin, Velinda Vidaurre, and Sua Myong. 2020. "RNA Droplets." *Annual Review of Biophysics* 49:247–65.
- El Sahili, Abbas, Tingjin Sherryl Soh, Jonas Schiltz, Aicha Gharbi-Ayachi, Cheah Chen Seh, Pei-Yong Shi, Siew Pheng Lim, and Julien Lescar. 2019. "NS5 from Dengue Virus Serotype 2 Can Adopt a Conformation Analogous to That of Its Zika Virus and Japanese Encephalitis Virus Homologues." *Journal of Virology* 94(1).
- Samsa, M. M., J. A. Mondotte, J. J. Caramelo, and A. V. Gamarnik. 2012. "Uncoupling Cis-

- Acting RNA Elements from Coding Sequences Revealed a Requirement of the N-Terminal Region of Dengue Virus Capsid Protein in Virus Particle Formation." *Journal of Virology* 86(2):1046–58.
- Samsa, Marcelo M., Juan A. Mondotte, Nestor G. Iglesias, Iranai Assunção-Miranda, Giselle Barbosa-Lima, Andrea T. Da Poian, Patricia T. Bozza, and Andrea V. Gamarnik. 2009. "Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation." *PLoS Pathogens* 5(10).
- Samuel, Gladys Hazitha, Michael R. Wiley, Atif Badawi, Zach N. Adelman, and Kevin M. Myles. 2016. "Yellow Fever Virus Capsid Protein Is a Potent Suppressor of RNA Silencing That Binds Double-Stranded RNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(48):13863–68.
- Sangiambut, Sutha, Poonsook Keelapang, John Aaskov, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrerak, Prida Malasit, and Nopporn Sittisombut. 2008. "Multiple Regions in Dengue Virus Capsid Protein Contribute to Nuclear Localization during Virus Infection." *Journal of General Virology* 89(5):1254–64.
- Sarkar, Riya, Kiran Bala Sharma, Anita Kumari, Shailendra Asthana, and Manjula Kalia. 2021. "Japanese Encephalitis Virus Capsid Protein Interacts with Non-Lipidated MAP1LC3 on Replication Membranes and Lipid Droplets." *Journal of General Virology* 0786994449(M):5–7.
- Scaturro, Pietro, Iuni Margaret Laura Trist, David Paul, Anil Kumar, Eliana G. Acosta, Chelsea M. Byrd, Robert Jordan, Andrea Brancale, and Ralf Bartenschlager. 2014. "Characterization of the Mode of Action of a Potent Dengue Virus Capsid Inhibitor." *Journal of Virology* 88(19):11540–55.
- Van Der Schaar, Hilde M., Michael J. Rust, Chen, Heidi Van Der Ende-Metselaar, Jan Wilschut, Xiaowei Zhuang, and Jolanda M. Smit. 2008. "Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells." *PLOS Pathogens* 4(12):e1000244.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 2012 9:7 9(7):676–82.
- Schlick, Petra, Christian Taucher, Beate Schittl, Janina L. Tran, Regina M. Kofler, Wolfgang Schueler, Alexander von Gabain, Andreas Meinke, and Christian W. Mandl. 2009. "Helices A2 and A3 of West Nile Virus Capsid Protein Are Dispensable for Assembly of Infectious Virions." *Journal of Virology* 83(11):5581–91.
- Schmidt, Aaron G., Kyungae Lee, Priscilla L. Yang, and Stephen C. Harrison. 2012. "Small-Molecule Inhibitors of Dengue-Virus Entry." *PLOS Pathogens* 8(4):e1002627.
- Schnettler, Esther, Mark G. Sterken, Jason Y. Leung, Stefan W. Metz, Corinne Geertsema, Rob W. Goldbach, Just M. Vlak, Alain Kohl, Alexander A. Khromykh, and Gorben P. Pijlman. 2012. "Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells." *Journal of Virology* 86(24):13486–500.
- Schoggins, John W., Marcus Dorner, Michael Feulner, Naoko Imanaka, Mary Y. Murphy, Alexander Ploss, and Charles M. Rice. 2012. "Dengue Reporter Viruses Reveal Viral Dynamics in Interferon Receptor-Deficient Mice and Sensitivity to Interferon Effectors in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(36):14610–15.
- Shang, Zifang, Hao Song, Yi Shi, Jianxun Qi, and George F. Gao. 2018. "Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus." *Journal of Molecular Biology* 430(7):948–62.
- Shragai, Talya, Blanka Tesla, Courtney Murdock, and Laura C. Harrington. 2017. "Zika and Chikungunya: Mosquito-Borne Viruses in a Changing World." *Annals of the New York*

- Academy of Sciences* 1399(1):61–77.
- Silva, Patrícia A. G. C., Carina F. Pereira, Tim J. Dalebout, Willy J. M. Spaan, and Peter J. Bredenbeek. 2010. “An RNA Pseudoknot Is Required for Production of Yellow Fever Virus Subgenomic RNA by the Host Nuclease XRN1.” *Journal of Virology* 84(21):11395–406.
- Simmonds, Peter, Paul Becher, Jens Bukh, Ernest A. Gould, Gregor Meyers, Tom Monath, Scott Muerhoff, Alexander Pletnev, Rebecca Rico-Hesse, Donald B. Smith, and Jack T. Stapleton. 2017. “ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae.” *Journal of General Virology* 98(1):2–3.
- Sing, Charles E. and Sarah L. Perry. 2020. “Recent Progress in the Science of Complex Coacervation.” *Soft Matter* 16(12):2885–2914.
- Sirohi, Devika, Zhenguo Chen, Lei Sun, Thomas Klose, Theodore C. Pierson, Michael G. Rossmann, and Richard J. Kuhn. 2016. “The 3.8 Å Resolution Cryo-EM Structure of Zika Virus.” *Science* 352(6284):467–70.
- Sirohi, Devika and Richard J. Kuhn. 2017. “Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors.” *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl_10):S935–44.
- Slomnicki, Lukasz P., Dong Hoon Chung, Austin Parker, Taylor Hermann, Nolan L. Boyd, and Michal Hetman. 2017. “Ribosomal Stress and Tp53-Mediated Neuronal Apoptosis in Response to Capsid Protein of the Zika Virus.” *Scientific Reports* 7(1).
- Smit, Jolanda M., Bastiaan Moesker, Izabela Rodenhuis-Zybert, and Jan Wilschut. 2011. “Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion.” *Viruses* 3(2):160–71.
- Soni, Krishnakant G., Gonzalo A. Mardones, Rachid Sougrat, Elena Smirnova, Catherine L. Jackson, and Juan S. Bonifacino. 2009. “Coatomer-Dependent Protein Delivery to Lipid Droplets.” *Journal of Cell Science* 122(Pt 11):1834–41.
- Sotcheff, Stephanea and Andrew Routh. 2020. “Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg.” *Pathogens* 9(1).
- Sridhar, Saranya, Alexander Luedtke, Edith Langevin, Ming Zhu, Matthew Bonaparte, Tiffany Machabert, Stephen Savarino, Betzana Zambrano, Annick Moureau, Alena Khromava, Zoe Moodie, Ted Westling, Cesar Mascareñas, Carina Frago, Margarita Cortés, Danaya Chansinghakul, Fernando Noriega, Alain Bouckenoghe, Josh Chen, Su-Peung Ng, Peter B. Gilbert, Sanjay Gurunathan, and Carlos A. DiazGranados. 2018. “Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy.” *The New England Journal of Medicine* 379(4).
- Stiasny, Karin, Richard Fritz, Karen Pangerl, and Franz X. Heinz. 2011. “Molecular Mechanisms of Flavivirus Membrane Fusion.” *Amino Acids* 41(5):1159–63.
- Stocks, C. E. and M. Lobigs. 1998. “Signal Peptidase Cleavage at the Flavivirus C-PrM Junction: Dependence on the Viral NS2B-3 Protease for Efficient Processing Requires Determinants in C, the Signal Peptide, and PrM.” *Journal of Virology* 72(3):2141–49.
- Sun, Changxia, Weidong Yang, Li Chun Tu, and Siegfried M. Musser. 2008. “Single-Molecule Measurements of Importin α /Cargo Complex Dissociation at the Nuclear Pore.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(25):8613.
- Tan, Ter Yong, Guntur Fibriansah, Victor A. Kostyuchenko, Thiam-Seng Seng Ng, Xin-Ni Ni Xin-Xiang Xiang Lim, Shuijun Zhang, Xin-Ni Ni Xin-Xiang Xiang Lim, Jiaqi Wang, Jian Shi, Marc C. Morais, Davide Corti, and Shee-Mei Mei Lok. 2020. “Capsid Protein Structure in Zika Virus Reveals the Flavivirus Assembly Process.” *Nature Communications* 11(1).
- Tan, Ter Yong, Guntur Fibriansah, and Shee-Mei Mei Lok. 2020. “Capsid Protein Is Central to the Birth of Flavivirus Particles.” *PLoS Pathogens* 16(5):1–8.
- Tassaneeritthep, Boonrat, Timothy H. Burgess, Angela Granelli-Piperno, Christine Trumfheller, Jennifer Finke, Wellington Sun, Michael A. Eller, Kovit Pattanapanyasat, Suttiapant

- Sarasombath, Deborah L. Birx, Ralph M. Steinman, Sarah Schlesinger, and Mary A. Marovich. 2003. "DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 197(7):823–29.
- Tay, Moon Y. F., Kate Smith, Ivan H. W. Ng, Kitti W. K. Chan, Yongqian Zhao, Eng Eong Ooi, Julien Lescar, Dahai Luo, David A. Jans, Jade K. Forwood, and Subhash G. Vasudevan. 2016. "The C-Terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates Its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production." *PLoS Pathogens* 12(9).
- Therkelsen, Matthew D., Thomas Klose, Frank Vago, Wen Jiang, Michael G. Rossmann, and Richard J. Kuhn. 2018. "Flaviviruses Have Imperfect Icosahedral Symmetry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(45):11608–12.
- Tsuda, Yoshimi, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuo Yamashita, Toru Okamoto, Tohru Ichimura, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. 2006. "Nucleolar Protein B23 Interacts with Japanese Encephalitis Virus Core Protein and Participates in Viral Replication." *Microbiology and Immunology* 50(3):225–34.
- Umareddy, Indira, Alex Chao, Aruna Sampath, Feng Gu, and Subhash G. Vasudevan. 2006. "Dengue Virus NS4B Interacts with NS3 and Dissociates It from Single-Stranded RNA." *Journal of General Virology* 87(9):2605–14.
- Uversky, Vladimir N. and Alexei V. Finkelstein. 2019. "Life in Phases: Intra- and Inter- Molecular Phase Transitions in Protein Solutions." *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 842 9(12):842.
- Villordo, Sergio M., Diego E. Alvarez, and Andrea V. Gamarnik. 2010. "A Balance between Circular and Linear Forms of the Dengue Virus Genome Is Crucial for Viral Replication." *Rna* 16(12):2325–35.
- Villordo, Sergio M., Juan M. Carballeda, Claudia V. Filomatori, and Andrea V. Gamarnik. 2016. "RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation." *Trends in Microbiology* 24(4):270–83.
- Villordo, Sergio M., Claudia V. Filomatori, Irma Sánchez-Vargas, Carol D. Blair, and Andrea V. Gamarnik. 2015. "Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation." *PLoS Pathogens* 11(1):1–22.
- Villordo, Sergio M. and Andrea V. Gamarnik. 2009. "Genome Cyclization as Strategy for Flavivirus RNA Replication." *Virus Research* 139(2):230–39.
- Villordo, Sergio M. and Andrea V. Gamarnik. 2013. "Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells." *Journal of Virology* 87(16):9365–72.
- Vuitika, Larissa, Wasim A. Prates-syed, Jaqueline Dinis, Queiros Silva, Karin P. Crema, C. Nelson, Aline Lira, Julia Beatriz, Menuci Lima, Niels Olsen, Saraiva Camara, Lena F. Schimke, Otavio Cabral-marques, Mohammad Sadraeian, Lorena C. S. Chaves, and Gustavo Cabral-miranda. 2022. "Vaccines against Emerging and Neglected Infectious Diseases : An Overview." 1–11.
- Walker, T., P. H. Johnson, L. A. Moreira, I. Iturbe-Ormaetxe, F. D. Frentiu, C. J. McMeniman, Y. S. Leong, Y. Dong, J. Axford, P. Kriesner, A. L. Lloyd, S. A. Ritchie, S. L. O'Neill, and A. A. Hoffmann. 2011. "The WMe1 Wolbachia Strain Blocks Dengue and Invades Caged Aedes Aegypti Populations." *Nature* 2011 476:7361 476(7361):450–53.
- Wang, Bin, Lei Zhang, Tong Dai, Ziran Qin, Huasong Lu, Long Zhang, and Fangfang Zhou. 2021. "Liquid–Liquid Phase Separation in Human Health and Diseases." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6(1).
- Wang, Shao Hung, Wan Jr Syu, Kao Jean Huang, Huan Yao Lei, Chen Wen Yao, Chwan Chuen King, and Shiao Ting Hu. 2002. "Intracellular Localization and Determination of a Nuclear Localization Signal of the Core Protein of Dengue Virus." *Journal of General Virology* 83(12):3093–3102.

- Weaver, Scott C., Federico Costa, Mariano A. Garcia-Blanco, Albert I. Ko, Guilherme S. Ribeiro, George Saade, Pei Yong Shi, and Nikos Vasilakis. 2016. "Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control." *Antiviral Research* 130:69–80.
- Welsch, Sonja, Sven Miller, Ines Romero-Brey, Andreas Merz, Christopher K. E. Bleck, Paul Walther, Stephen D. Fuller, Claude Antony, Jacomine Krijnse-Locker, and Ralf Bartenschlager. 2009. "Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites." *Cell Host and Microbe* 5(4):365–75.
- Wen, Jinsheng and Sujan Shresta. 2019. "Antigenic Cross-Reactivity between Zika and Dengue Viruses: Is It Time to Develop a Universal Vaccine?" *Current Opinion in Immunology* 59:1–8.
- Whitehead, Stephen S., Anna P. Durbin, Kristen K. Pierce, Dan Elwood, Benjamin D. McElvany, Ellen A. Fraser, Marya P. Carmolli, Cecilia M. Tibery, Noreen A. Hynes, Matthew Jo, Janece M. Lovchik, Catherine J. Larsson, Elena A. Doty, Dorothy M. Dickson, Catherine J. Luke, Kanta Subbarao, Sean A. Diehl, and Beth D. Kirkpatrick. 2017. "In a Randomized Trial, the Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine TV003 Is Well-Tolerated and Highly Immunogenic in Subjects with Flavivirus Exposure Prior to Vaccination." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11(5).
- WHO and TDR. 2009. *Dengue Guidelines, for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Vol. 41.
- Wu, Bin, Yan Chen, and Joachim D. Müller. 2009. "Fluorescence Fluctuation Spectroscopy of MCherry in Living Cells." *Biophysical Journal* 96(6):2391–2404.
- Wu, Yaoxing, Tao Zhou, Jiajia Hu, Yishan Liu, Shouheng Jin, and Jianfeng Wu. 2022. "Autophagy Activation Induces P62-Dependent Autophagic Degradation of Dengue Virus Capsid Protein During Infection." 13(July):1–14.
- Xia, Hongjie, Xuping Xie, Jing Zou, Christian G. Noble, William K. Russell, Luis Marcelo F. Holthausen, Kyung H. Choi, Mark A. White, and Pei Yong Shi. 2020. "A Cocrystal Structure of Dengue Capsid Protein in Complex of Inhibitor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(30):17992–1.
- Xie, Xuping, Shovanlal Gayen, CongBao Kang, Zhiming Yuan, and Pei-Yong Shi. 2013. "Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein." *Journal of Virology* 87(8):4609–22.
- Xie, Xuping, Dieudonné B. Kum, Hongjie Xia, Huanle Luo, Chao Shan, Jing Zou, Antonio E. Muruato, Daniele B. A. Medeiros, Bruno T. D. Nunes, Kai Dallmeier, Shannan L. Rossi, Scott C. Weaver, Johan Neyts, Tian Wang, Pedro F. C. Vasconcelos, and Pei Yong Shi. 2018. "A Single-Dose Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with Controlled Infection Rounds That Protects against Vertical Transmission." *Cell Host and Microbe* 24(4):487-499.e5.
- Xu, Zaikun, Robert Anderson, and Tom C. Hobman. 2011. "The Capsid-Binding Nucleolar Helicase DDX56 Is Important for Infectivity of West Nile Virus." *Journal of Virology* 85(11):5571–80.
- Yang, Mi Ran, Sung Ryul Lee, Wonkyung Oh, Eun Woo Lee, Jung Yong Yeh, Jin Ju Nah, Yi Seok Joo, Jaekyoon Shin, Han Woong Lee, Suhkneung Pyo, and Jaewhan Song. 2008. "West Nile Virus Capsid Protein Induces P53-Mediated Apoptosis via the Sequestration of HDM2 to the Nucleolus." *Cellular Microbiology* 10(1):165–76.
- Yang, Weidong, Jeff Gelles, and Siegfried M. Musser. 2004. "Imaging of Single-Molecule Translocation through Nuclear Pore Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(35):12887–92.
- Yeasmin, Mahmuda, Md Maruf, Ahmed Molla, | H M Abdullah, Al Masud, and | K M Saif-Ur-Rahman. 2022. "Safety and Immunogenicity of Zika Virus Vaccine: A Systematic Review of Clinical Trials." *Reviews in Medical Virology* e2385.
- Yon, Changsuek, Tadahisa Teramoto, Niklaus Mueller, Jessica Phelan, Vannakambadi K. Ganesh, Krishna H. M. Murthy, and R. Padmanabhan. 2005. "Modulation of the

- Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by Interaction with NS5, the RNA-Dependent RNA Polymerase." *The Journal of Biological Chemistry* 280(29):27412–19.
- You, Shihyun and R. Padmanabhan. 1999. "A Novel in Vitro Replication System for Dengue Virus. Initiation of RNA Synthesis at the 3'-End of Exogenous Viral RNA Templates Requires 5'- and 3'-Terminal Complementary Sequence Motifs of the Viral RNA." *The Journal of Biological Chemistry* 274(47):33714–22.
- Yun, Sang Im, Byung Hak Song, Jordan C. Frank, Justin G. Julander, Irina A. Polejaeva, Christopher J. Davies, Kenneth L. White, and Young Min Lee. 2016. "Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59." *Genome Announcements* 4(4).
- Zhang, Xianwen, Xuping Xie, Hongjie Xia, Jing Zou, Linfen Huang, Vsevolod L. Popov, Xinwen Chen, Pei-Yong Yong Shi, Citation X. Zhang, Shi P-y, and Editor M. Stacy Horner. 2019. "Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly." *MBio* 10(5):2375–94.
- Zhang, Xiaokang, Peng Ge, Xuekui Yu, Jennifer M. Brannan, Guoqiang Bi, Qinfen Zhang, Stan Schein, and Z. Hong Zhou. 2012. "Cryo-EM Structure of the Mature Dengue Virus at 3.5-Å Resolution." *Nature Structural & Molecular Biology* 20(1):105–10.
- Zhao, Baoyu, Guanghui Yi, Fenglei Du, Yin Chih Chuang, Robert C. Vaughan, Banumathi Sankaran, C. Cheng Kao, and Pingwei Li. 2017. "Structure and Function of the Zika Virus Full-Length NS5 Protein." *Nature Communications* 8.
- Zhou, Sheng, Zhifei Fu, Ziwei Zhang, Xing Jia, Guangjun Xu, Long Sun, Fei Sun, Pu Gao, Pingyong Xu, and Hongyu Deng. 2023. "Liquid-Liquid Phase Separation Mediates the Formation of Herpesvirus Assembly Compartments." *The Journal of Cell Biology* 222(1).
- Ziv, Omer, Marta M. Gabryelska, Aaron T. L. Lun, Luca F. R. Gebert, Jessica Sheu-Gruttadauria, Luke W. Meredith, Zhong Yu Liu, Chun Kit Kwok, Cheng Feng Qin, Ian J. MacRae, Ian Goodfellow, John C. Marioni, Grzegorz Kudla, and Eric A. Miska. 2018. "COMRADES Determines in Vivo RNA Structures and Interactions." *Nature Methods* 15(10):785–88.