



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

“Participación de la proteína NS4B del virus Dengue en la modulación de expresión de efectores inmunes dependientes de estrés de RE en células de insecto”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

MCs Karla Javonny Sepúlveda Salinas

Tutor Principal: Dr. José Ramos Castañeda **INSP- CISEI**

Comité Tutorial: Dra. Lourdes Massieu Trigo **UNAM-IF**

Dr. Mauricio Díaz Muñoz **UNAM- INB**

Ciudad de México, Agosto 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Participación de la proteína NS4B del virus Dengue en la modulación de expresión de efectores inmunes dependientes de estrés de RE en células de insecto.

Karla Javonny Sepúlveda Salinas, Agosto 2017

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Programa de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca doctoral número 344684 y número de becario 264529.

Agradezco a los Doctores Lourdes Massieu Trigo y Mauricio Díaz Muñoz por sus consejos, sugerencias y disponibilidad durante este proyecto y al Dr. José Moreno Rodríguez por su apoyo en la revisión de esta tesis.

Agradezco también al Dr. Adolfo García-Sastre de la escuela de medicina del Monte Sinaí en Nueva York, EUA y al Dr. James Sutherland en España por la donación del vector pCAGGS con el promotor de b-actina con el cDNA de la proteína NS4B-DENV2 cepa 16681 y el vector de expresión para células de insecto Ac5-STABLE1-blast respectivamente.

Agradezco a la Dr. Ann Falon de la Universidad de Wisconsin en Minnesota por donación de la línea celular Aag2 de *Ae. Aegypti*.

Agradezco al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE de la Secretaría de Salud, por la donación del virus DENV2 cepa Nueva Guinea para las infecciones realizadas durante este proyecto.

Así mismo, agradezco el apoyo a la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular y Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México a cargo de Ana María Escalante y Lourdes Lara, para la realización de las videoconferencias entre CDMX y Querétaro en cada tutorial..

Finalmente me siento infinitamente agradecida por que el destino permitió el paso del Dr. Eduardo García Zepeda QEPD por mi formación académica por que al asesorarme en los protocolos en la medición de péptidos antimicrobianos me demostró su calidad científica y humana.

La vida recompensa de forma extraordinaria a quienes se entregan de forma extraordinaria.

Arturo Orantes.

En memoria de mi Tita QEPD.... Tú has sido la persona de la que más he aprendido de fortaleza, dedicación y entrega, gracias por quererme tanto y demostrarme que los tiempos de Dios son perfectos.

Alejandro, ha sido un camino difícil pero tu corazón ha caminado junto al mío, me has confortado y consentido de tal manera que has sido un factor indispensable para finalizar este proyecto juntos, esto es para cumplir todos los planes que tenemos juntos tammnaa..

Gracias mamá por la inteligencia y a ti papá por el ejemplo, ustedes han sido los promotores incondicionales de mis sueños, sin su amor, confianza, oraciones, horas de sacrificio y exigencias no habría llegado hasta donde estoy hoy.

A mis hermanas May, Pao y Faty por que me han demandado ser un ejemplo moral y académico y hoy cumplo una vez más.

A la familia que siempre ha estado al pendiente de mi desarrollo personal y académico y el día de hoy agradecen conmigo un logro más.

Dr. José Ramos Castañeda sus conocimientos, su manera de trabajar, su paciencia y motivación inculcaron en mí la seriedad y rigor académico que se necesitan para desarrollarse como una investigadora competitiva e integral. Tiene mi lealtad y admiración hoy y siempre.

A Gustavo y a Ary, con ustedes los momentos difíciles fueron abismalmente más llevaderos, gracias por una amistad tan sincera, desinteresada y divertida!!!!

A mis amigos de camino Ruth, Yvonne, Nalú, y Jorge por que iniciamos proyectos académicos juntos y me demostraron que la disciplina, el caer y levantarse pero sobre todo el apoyo de una amistad sincera son esenciales para lograr metas, los llevo en mi corazón siempre...

La actitud es una pequeña cosa que hace una gran diferencia.

Winston Churchill.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
MARCO TEORICO.....	9
1. Virus Dengue (DENV).....	9
1.1 La proteína NS4B del DENV.....	13
2. Respuesta antiviral en insectos.....	15
2.1 Vía de Toll.....	16
2.2 Vía de Jak-Stat.....	18
2.3 Vía de IMD.....	18
2.4 Vía de interferencia de RNA.....	20
3. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	21
3.1 ATF6.....	21
3.2 PERK.....	21
3.3 IRE1.....	22
3. La UPR y la respuesta inmune.....	25
JUSTIFICACION.....	33
HIPOTESIS.....	33
OBJETIVOS.....	34
ESTRATEGIA METODOLOGICA.....	35
MATERIAL Y METODOS.....	36
1. Cultivo celular, virus y tratamientos	
2. Plásmidos	
3. Transfección y FACS	
4. Infección y ensayos de viabilidad celular	
5. Western blotting.	

6. Análisis de RT-PCR y del splicing del mRNA de XBP1
7. RT-PCR en tiempo real
8. Concentración de ON (Nitritos/Nitratos) y péptidos antimicrobianos en el sobrenadante de células estimuladas
9. Análisis y estadística

RESULTADOS.....50

1. Determinación de la línea celular como modelo de estudio.
2. Construcción del plásmido de la proteína NS4B-DENV2
3. Activación de la UPR en células que expresan la proteína NS4B-DENV2.
4. La expresión de NS4B-DENV2 modula la activación transcripcional de la UPR.
5. La activación de la UPR genera transcripción de efectores inmunes que la expresión de NS4B-DENV2 modula
6. NS4B-DENV2 disminuye la actividad antimicrobiana y la producción de ON dependiente de la activación de la UPR
7. Efecto de la expresión de la proteína NS4B-DENV2 en la infección del virus Dengue y en la sobrevivencia en células de insecto sometidas a estrés de RE.
8. El splicing de XBP1 es principal regulador de la expresión de efectores inmunes en células de insecto
9. El silenciamiento postranscripcional de NS4B-DENV2 recupera el fenotipo de los efectores inmunes dependientes de la UPR.

DISCUSION.....68

CONCLUSIONES.....75

PERSPECTIVAS.....76

REFERENCIAS.....77

La respuesta de los organismos a eventos adversos que demandan una respuesta metabólica, resultan en la generación de efectores inmunes que en el caso de insectos provienen de la activación directa de vías como Toll, Jak-Stat, Imd e interferencia de RNA pero también puede ser derivada del entrecruzamientos de distintas vías intracelulares. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en ingles) pertenece a una de estas vías, además de ser una respuesta adaptativa altamente conservada entre los organismos, cuyo objetivo principal es restaurar la homeostasis en el retículo endoplásmico (RE), su señalización es capaz de entrecruzar con las vías de inmunidad generando protección contra organismos patógenos. El virus Dengue (DENV) un virus de RNA de cadena positiva que pertenece al género Flavivirus, utiliza el RE como sitio de replicación, lo que activa la UPR, que induce la síntesis de membranas internas y la traducción preferencial de proteínas virales, mecanismos que optimizan la replicación y el ensamblaje de los viriones. Además DENV cuenta con mecanismos que le permiten evadir la respuesta antiviral, como es el caso de una de sus proteínas la NS4B, la cual en cordados es capaz de bloquear la vía del interferón α/β . Sin embargo la relación UPR-inmunidad en los insectos vectores de este virus, podría ser mejor estudiada ya que en ellos no existe la principal vía antiviral, el interferón. En este estudio demostramos que la proteína NS4B-DENV2 es capaz de modular los efectores inmunes resultantes de la activación de la UPR en células de insecto.

ABSTRACT

The reactions of living beings to adverse events lead to the generation of immune effectors, which, in insects, it depends on the direct activation of pathways such as Toll, Jak-Stat, Imd, or RNAi, or it could arise from the crosstalk of different intracellular pathways. One such pathway, the unfolded protein response (UPR), has the primary objective of restoring homeostasis in the endoplasmic reticulum. In addition, the UPR participates in signaling crosstalk with the immune pathways, generating protection against pathogenic organisms. Dengue virus (DENV) is a plus-strand RNA virus belonging to the Flavivirus genus that uses the ER as a replication site; during DENV infection, there are indicators of the activation of the UPR, which in turn, induces the synthesis of internal membranes with the preferential translation of viral proteins enhancing viral replication. One such DENV proteins, NS4B can block the α/β interferon pathway in mammals. However, the response to viral infection in insects is of particular interest because they lack of the main antiviral pathway of chordates, the interferon, which could allow a better understanding of the role of the NS4B protein in the UPR-immunity relationship. Thus, in the present study, we demonstrated that the DENV2-NS4B protein is capable of modulating the immune effectors that result from the activation of the UPR in insect cells.

1. Virus Dengue

El dengue es una infección viral sistémica con espectros clínicos que pueden ir desde un paciente asintomático hasta un síndrome de choque por dengue, llegando en algunos casos incluso a la muerte. El dengue es considerado como un problema de salud global, debido al incremento en el número de casos reportados y el aumento en los casos de dengue grave(2009). Esta enfermedad es transmitida por la picadura de un mosquito vector del género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*, el cual tiene una amplia distribución, por lo que aproximadamente 100 millones se infectan anualmente alrededor del mundo y 3 mil millones de personas se encuentran en riesgo (Wilder-Smith, Renhorn et al. 2012). Los esfuerzos para obtener un control del vector han sido insuficientes, y por otro lado no se cuenta con un tratamiento antiviral específico para este virus, por lo que una vez instalada la infección el tratamiento es meramente paliativo. Existe hasta ahora una sola vacuna licenciada, creada por el laboratorio Sanofi Pasteur®, aunque no ha sido empleada en programas nacionales de vacunación de manera extensiva.

La enfermedad es causada por el virus Dengue (DENV), el cual es de forma esférica, con un tamaño de aproximadamente 50 nm. Pertenece a la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus*, con cuatro serotipos distintos que a su vez se dividen en genotipos. El genoma del DENV está compuesto por una sola copia de RNA de cadena positiva de aproximadamente 10.7 kb asociada a las proteínas de la cápside(Zhang, Kostyuchenko et

al. 2007). El RNA viral codifica para un polipéptido que es procesado por proteasas virales (NS3 y su co-factor NS2B) y peptidasas y furinas celulares. Los cortes co y post-traduccionales en la poliproteína dar lugar a diez proteínas virales, tres estructurales: la de la cápside (C), la de membrana (M) y la de envoltura (E) y siete no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5, involucradas en la replicación y en la evasión de la respuesta inmune (Fig.1)

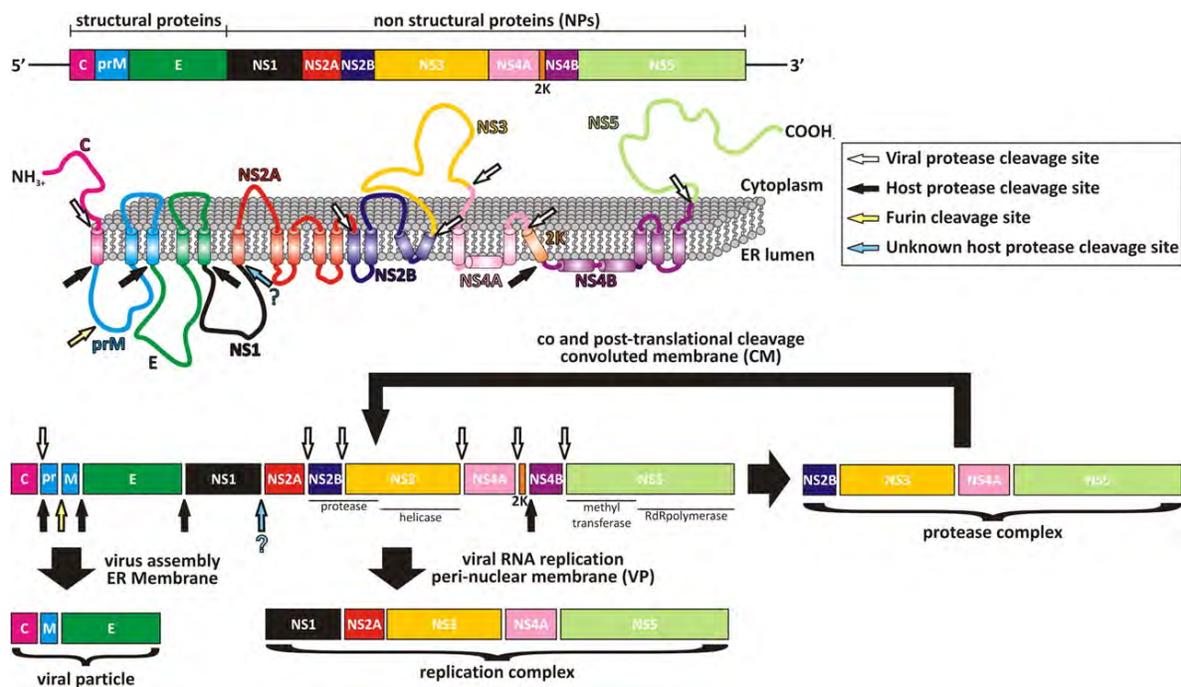


Figura 1. Proteínas virales de los Flavivirus. En el panel superior de esta figura se muestra la organización de la poliproteína del DENV, en el panel intermedio se muestran la disposición putativa de las proteínas en la membrana del RE derivada de análisis bioquímicos y celulares, además se señalan los lugares del corte de las proteasas virales y celulares respectivamente (flechas blancas y negras). En el último panel se muestran los cortes de las proteasas celulares y virales y los diferentes complejos funcionales que surgen posteriores al procesamiento proteolítico. Tomado de Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., et al (2009) Crystal structure of a Novel conformational state of the Flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication *J. Virol.* **83**, 12895-12906

Al momento de la picadura en el humano, el mosquito infectado libera el virus hacia el torrente sanguíneo, donde alcanza la superficie de las células del sistema fagocítico

mononuclear: macrófagos, monocitos y células dendríticas (Marchette, Halstead et al. 1973, St John, Abraham et al. 2013), la infección de éstas células por sí misma genera la activación de la respuesta de interferón tipo I (IFN-I ó IFN α/β). Después de la unión con sus receptores, el virus es internalizado mediante endocitosis, la vesícula endocítica viaja hacia el RE y durante el trayecto experimenta la acidificación, lo cual permite la liberación del genoma viral en el citoplasma, generando la traducción del mismo en los ribosomas asociados al RE.

La replicación del DENV ocurre asociada al RE en estructuras denominadas complejos replicativos (RCs) que contienen proteínas y RNA virales, además de proteínas celulares. Los estudios de microscopía electrónica de estos RCs muestran que DENV induce alteraciones membranales de diferentes morfologías entre ellas, vesículas de doble membrana (VPs) de entre 50 -150nm de diámetro y membranas complejas (CM) (Welsch, Miller et al. 2009, Paul and Bartenschlager 2013). Estos complejos derivados del RE, concentran los componentes celulares como lípidos y proteínas específicos requeridos para la replicación y la formación de viriones, además de que previenen la activación de mecanismos de defensa del hospedero (Grief, Galler et al. 1997, Novoa, Calderita et al. 2005, Netherton, Moffat et al. 2007).

Durante la replicación viral se generan RNA de doble cadena y otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos por receptores como los tipo Toll y tipo Rig, particularmente el TLR3, generando una serie de eventos que culminan en la producción de IFN α/β . Finalmente el genoma replicado se asocia a las proteínas virales

recién sintetizadas, que dan lugar a viriones inmaduros con las proteínas prM y E, formando 90 heterodímeros que se presentan como 60 picos triméricos en la superficie del virión. A su paso por el Golgi estas proteínas sufren modificaciones que consisten en el procesamiento de la proteína prM por una furina proteasa, lo que genera la partícula viral madura con 90 homodímeros organizados en una posición plana y generando un virión de superficie “suave” capaz de infectar (Yu, Zhang et al. 2008) (Fig. 2).

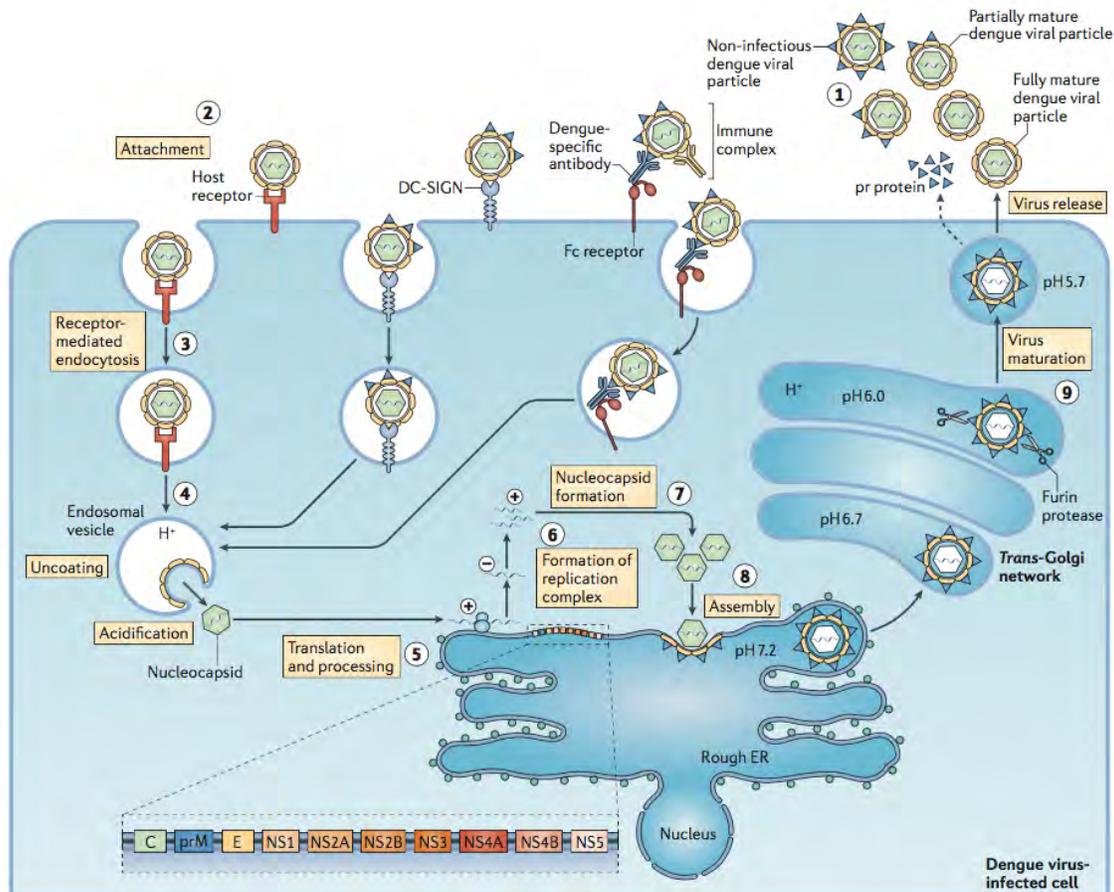


Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo del DENV. El DENV existe en diferentes formas virales dependiendo del procesamiento de la proteína prM. Las partículas completas inmaduras contienen una proteína prM sin procesar y no son infecciosas. Existen también partículas intermedias, parcialmente maduras en las cuales algunas proteínas prM han sido procesadas y otras se mantienen intactas. Finalmente están las partículas completamente maduras que, al igual que las parcialmente inmaduras son capaces de infectar (**paso 1**). El ciclo replicativo del DENV inicia cuando un virión se une a los distintos receptores en la superficie celular (receptor Fc, receptor DC-SIGN, etc.) (**paso 2**) y entra a la célula mediante endocitosis (**paso 3**). La acidificación en las vesículas endosómicas desencadena cambios conformacionales

que permiten la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma generando la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. El RNA viral también es liberado en el citoplasma y se une al RE rugoso (**paso 4**). En el RE, el RNA viral es traducido en una sola poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares (**paso 5**). Después de la síntesis del complejo replicativo, se inicia la síntesis del RNA viral con la transcripción de un RNA viral antisentido seguido de la amplificación del RNA viral (**paso 6**). La proteína C empaqueta el RNA recién sintetizado para formar la nucleocápside (**paso 7**). El ensamblaje viral ocurre en la superficie del RE cuando la nucleocápside emerge del lumen del RE, como una partícula inmadura no infecciosa (**paso 8**). Las partículas inmaduras son transportadas a través del Golgi y la red trans-Golgi, donde la acidificación induce cambios conformacionales en el virión que se exponen los sitios de corte de la furina, la cual procesa la proteína prM. El péptido pr continúa unido al virión hasta su liberación al pH neutro del medio extracelular (**paso 9**). Tomado de Srean, G., J. Mongkolsapaya, S. Yacoub and C. Roberts (2015). "New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection." *Nat Rev Immunol* **15**(12): 745-759.

1.1 La proteína NS4B del DENV

La proteína NS4B es una de las proteínas virales no estructurales, que conserva una identidad de entre el 35% y el 60% entre los Flavivirus, se mantiene embebida en el RE y es liberada del polipéptido por proteasas celulares y virales generando una proteína de 248 aminoácidos con un peso aparente de 27 kDa, de los cuales el 40% son hidrofóbicos(Cahour, Falgout et al. 1992). Debido a su alta hidrofobicidad se encuentra pobremente caracterizada, se sabe que es una proteína integral de membrana que forma dímeros(Zou, Xie et al. 2014). Predominantemente se encuentra localizada en el RE pero también hay reportes de localización en Golgi, nuclear y en uniones mitocondria-RE (Westaway, Khromykh et al. 1997, Miller, Sparacio et al. 2006). Los programas de predicción de estructuras secundarias junto con las aproximaciones bioquímicas sugieren que tiene al menos cuatro segmentos transmembranales(Nemesio, Palomares-Jerez et al. 2012). La proteína NS4B es esencial para la replicación y patogenicidad tanto en cultivo como en modelos animales(Kelly, Puri et al. 2010, Grant, Tan et al. 2011).

Los diferentes roles descritos de la proteína NS4B de los Flavivirus durante una infección son:

- 1) La proteína NS4B del Flavivirus West Nile es capaz de inducir alteraciones membranales derivadas del RE para su replicación(Kaufusi, Kelley et al. 2014). La replicación y el ensamblaje viral requieren de la inducción de vesículas de doble membrana y membranas complejas que son diferentes para cada tipo de Flavivirus, aunque en el caso de DENV no se ha demostrado la capacidad de la proteína NS4B de inducir estos cambios, sí colocaliza con las vesículas derivadas del RE y con los RNAs de doble cadena generados durante la replicación.(Miller, Sparacio et al. 2006)
- 2) Contribuye a la supresión de respuesta de la vía de interferencia de RNA del hospedero(Kakumani, Ponia et al. 2013). Los resultados de *Kakumani et al* sugieren que la proteína NS4B podría estar interactuando con Dicer, proteína que forma parte de la señalización de la vía de interferencia de RNA, inactivandola y así bloquear la señalización río abajo.
- 3) Interactúa con el dominio de helicasa en carboxilo terminal de la proteína NS3. La proteína NS3 es una proteína con función de NTPasa, RTPasa y helicasa. La interacción entre la proteína NS4B y el dominio de helicasa de NS3, disocia a la proteína NS3 del RNA de cadena sencilla, lo que le permite interactuar con el siguiente RNA de doble cadena, lo que sugiere que la interacción entre ambas proteínas aumenta el nivel de procesamiento de NS3 y con ello un aumento en la replicación viral (Umareddy, Chao et al. 2006).

- 4) Interactúa con la proteína NS1 para establecer una infección productiva. Los modelos propuestos para lograrlo son: a) Esta interacción inhibe la señalización derivada de la activación de TLR3 y la translocación de NF- κ B e IRF3 (Wilson, de Sessions et al. 2008). b) Potenciando la actividad de la proteína NS4B que se encuentra próxima al complejo de replicación en la cara citosólica del RE (Youn, Li et al. 2012).
- 5) Junto con la proteína NS5 induce la transcripción de inmunomoduladores como IL-8, IL-6, IP-10 e IFN γ que se han descrito en pacientes con fiebre hemorrágica por dengue (Kelley, Kaufusi et al. 2011).
- 6) Una sola mutación en la proteína NS4B es capaz de disminuir la infectividad en mosquitos y aumentar el nivel de replicación en células de mamífero (Hanley, Manlucu et al. 2003). Esto sugiere que la proteína NS4B contribuye a la adaptación del DENV para una replicación eficiente dependiendo del hospedero.
- 7) Inhibe la cascada de señalización del IFN-I. Los aminoácidos 54-102 son responsables de la inhibición de la vía del IFN-I, principal respuesta antiviral en cordados. Esto resulta mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína STAT1 (*Signal transduction and activator of transcription*) (Munoz-Jordan, Laurent-Rolle et al. 2005).

2. Respuesta antiviral en insectos

Una vez que el mosquito se alimenta de la sangre de un humano infectado con DENV, el primer tejido en infectarse es el epitelio del intestino medio, posteriormente se disemina por

la hemolinfa hasta que, después de 4 a 12 días, se localiza en casi todos los tejidos, y es entonces cuando las glándulas salivales pueden secretar virus, por lo tanto al picar es capaz de transmitir el agente patógeno durante toda su vida (Salazar, Richardson et al. 2007). Mientras que en los vertebrados la infección puede causar una enfermedad severa, la presencia del DENV en los mosquitos no es patogénica y es persistente. Esta diferencia sugiere la capacidad que tienen los insectos de montar una respuesta inmune eficiente ante un reto viral (Ip, Reach et al. 1993, Hoffmann, Kafatos et al. 1999). La respuesta inmune de los insectos ante un patógeno depende de factores estructurales, celulares y humorales. La respuesta humoral es controlada por vías de señalización que se encuentran conservadas en organismos superiores y son denominadas las vías de Toll, Jak-Stat, IMD y la vía de interferencia de RNA (Fig. 3). Ante un reto con DENV hay una activación complementaria de más de una vía de defensa y se describe a continuación. (Xi, Ramirez et al. 2008, Sanchez-Vargas, Scott et al. 2009, Souza-Neto, Sim et al. 2009, Sim and Dimopoulos 2010, Luplertlop, Surasombatpattana et al. 2011).

2.1 Vía de Toll

La detección de patógenos como hongos, bacterias Gram + y virus mediante receptores que reconocen patrones (PRRs) activan la vía de Toll, ésta activación genera un corte proteolítico de la citosina Spätzle que se une y activa el receptor Toll. Esto desencadena una señalización a través de las proteínas adaptadoras MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), Tube and Pell que resulta en la fosforilación y degradación de Cactus (homólogo de I- κ B) que es el regulador negativo de Rel1 (miembro de la familia de

las proteínas NF- κ B, homólogo Dif en *Drosophila m*). Esto libera el factor de transcripción Rel1 y permite su translocación a núcleo, lo que induce la transcripción de genes que codifican para moléculas efectoras, como los péptidos antimicrobianos (PAMs), defensina y cecropina. Finalmente este proceso concluye en un estado antiviral (Pan, Zhou et al. 2012)(Fig. 3). Xi, et al encontraron que la infección con DENV en el intestino, carcasa y glándulas salivales del mosquito *Ae. aegypti* activa la transcripción de genes de los componentes vía de Toll, sugiriendo que esta vía participa en la defensa anti-DENV del mosquito. Para demostrarlo silenciaron el gen *cactus* y encontraron una reducción de cuatro veces los títulos virales en el intestino medio. Por otro lado al silenciar el gen de la proteína MyD88, la cual se une al receptor Toll y activa la vía, resulta en un incremento de 2.7 veces los títulos virales comparadas con el control(Xi, Ramirez et al. 2008). La capacidad de estos PAM para afectar la viabilidad de los patógenos se debe a que permeabilizan y rompen las membranas celulares e interactuar con blancos intracelulares, lo que altera las membranas citoplásmicas, inhibe la formación de la pared celular y la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. Todo esto podría inhibir la replicación viral(Carballar-Lejarazu, Rodriguez et al. 2008, Hsieh, Tsai et al. 2010).

Otros de los efectores inmunes que se expresan durante una infección viral por la translocación de NF- κ B en la vía de Toll, es el óxido nítrico (ON)(Saura, Zaragoza et al. 1999, Zaragoza, Ocampo et al. 1999). En la infección con DENV, el ON participa en la nitrosilación de componentes intermediarios de la replicación viral, lo que genera un estado antiviral(Takhampunya, Padmanabhan et al. 2006). En mosquitos, se demostró la producción de ON en la hemolinfa después de la alimentación con DENV. Además en mosquitos tratados con SNP (Nitroprusiato de Sodio como donador de Oxido nítrico)

previo a la infección con DENV, disminuyó la acumulación del genoma viral en el intestino medio (Ramos-Castaneda, Gonzalez et al. 2008).

2.2 Vía de Jak-Stat

Los componentes de la vía de Jak (*Janus kinase*) – Stat (*signal transducer and activator of transcription*) fueron identificados por primera vez en vertebrados como la vía del IFN-I y es la principal vía de señalización antiviral (Isaacs and Lindenmann 1957, Isaacs, Lindenmann et al. 1957). En insectos la activación de la vía de Jak-Stat, inicia cuando el ligando Upd (*Unpaired*) se une al receptor Dome (*Domeless*), un homólogo del receptor tipo I de citocinas, que sufre un cambio conformacional, autofosforilación y dimerización, lo que permite que la proteína Hop (*Hopscotch*) que es una Jak cinasa se asocie y fosforile a la proteína Dome lo que a su vez resulta en la activación de sitios de unión para Stat que son fosforilados, después de lo cual se dimerizan y translocan a núcleo para activar la transcripción de genes específicos como el de IFN-I (Fig. 3). Al silenciar los genes de la cinasa Hop y Pias (*Protein inhibitor of activated Stat*) un regulador negativo de las proteínas Stat, observaron un incremento y disminución en la resistencia a la infección viral respectivamente, demostrando la activación y participación de esta vía en la respuesta a la infección con DENV en mosquitos (Souza-Neto, Sim et al. 2009).

2.3 Vía de Imd

La vía de inmunodeficiencia (Imd) es activada por el reconocimiento de péptidoglicano (PGN) un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas y algunas Gram

positivas, que se une a las proteínas de reconocimiento de PGN (PGRPs), la transmembranal (PGRP-LC) o la intracelular o secretada (PGRP-LE). La unión del PGN a estos receptores resulta en su dimerización u oligomerización y en el reclutamiento de la proteína Imd, que a su vez recluta a la proteína adaptadora dFadd (*Drosophila Fas-Associated protein with death domain*) y a la caspasa Dredd (*caspasa Death-related ced-3/Nedd2-like protein*). La proteína Dredd procesa a la proteína Imd en el amino terminal, lo que permite su ubiquitinación por la E3 ligasa IAP2 (*inhibitor of apoptosis 2*) y su subsecuente activación. Las cadenas de ubiquitina en la proteína Imd reclutan y activan al complejo Tab2 (*TAK1- associated binding protein*)/Tak1(*Transforming-growth-factor-b-activated kinase 1*), que es responsable de la fosforilación y activación de los dos ejes de la vía de Imd: el eje de JNK y el de IKK/Rel. Esta activación provoca la fosforilación de IKK y la fosforilación y procesamiento de Rel por Dredd después de lo cual, Rel se transloca a núcleo y activa la transcripción de genes para la producción de PAMs, como dipterina, defensina y cecropina. (Fig. 3) Para demostrar la activación de la vía IMD en la infección del DENV en el vector *Ae. Aegypti*, Luplertlop et al. realizaron un análisis genómico comparativo de las glándulas salivarias infectadas y no infectadas en el que identificaron un péptido antibacteriano perteneciente a la familia de las cecropinas. Esto sugiere la activación de la vía de Imd en la defensa contra DENV en el mosquito vector(Luplertlop, Surasombatpattana et al. 2011).

2.4 Vía de interferencia de RNA

La vía de interferencia de RNA constituye un mecanismo de regulación postranscripcional que se descubrió en *C. elegans* (Fire, Xu et al. 1998). También funciona como una respuesta antiviral, sobretodo en invertebrados por que durante la replicación de los virus de RNA, se forman intermediarios de RNA de doble cadena (exógenos) en el citoplasma, que son reconocidos por la proteína Dicer-2 y son procesados y convertidos en RNA de interferencia dobles de entre 19 a 22 pares de bases. Estos se asocian con la proteína R2D2 (*two dsRNA-binding domains and associated with Dicer-2*), facilitando su incorporación al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) que tiene una proteína efectora denominada Ago2 (*Argonaute 2*), que genera la degradación de una de las hebras del RNA de interferencia pequeño y usa la contraria para complementarse con el genoma viral y de esta manera provocar su degradación. (Gaines, Olson et al. 1996, Olson, Higgs et al. 1996, Li, Li et al. 2002). El silenciamiento de las proteínas que forman parte de la vía de interferencia de RNA como Ago2, Dicer-2 y R2D2 provoca un aumento en los títulos de DENV en los mosquitos (Sanchez-Vargas, Scott et al. 2009), lo que indica la activación de la vía de interferencia de RNA en la resistencia a DENV.

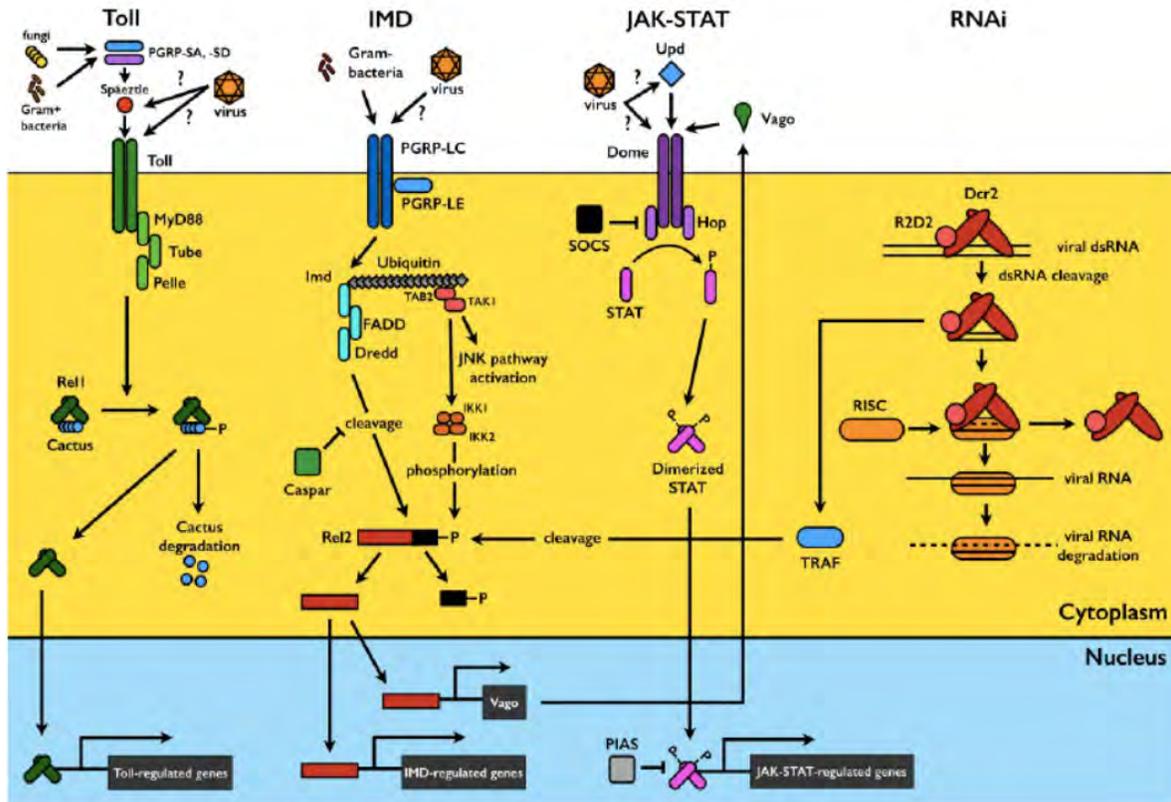


Figura 3. Vías de respuesta inmune y de interferencia de RNA en mosquitos. En la vía de señalización de Toll, la detección de ligandos derivada del reconocimiento de patógenos por parte de los receptores que reconocen patrones (PRRs) generan un corte proteolítico de la citocina Spätzle, que se une y activa al receptor Toll. Esto genera la señalización a través de las proteínas adaptadoras MyD88, Tube y Pelle para la fosforilación y degradación de Cactus, que es el regulador negativo que se une y secuestra a Rel1 en el citoplasma. La degradación de la proteína Cactus permite que Rel1 se transloque a núcleo donde activa la transcripción de genes regulados por la vía de Toll. La vía de Imd es activada por la unión de peptidoglicanos a las proteínas PGRP-LC y LE. Esto desencadena una serie de señalizaciones a través de caspasas y cinasas, con dos ejes en la vía: un eje desencadena la señalización de Jnk que fosforila a Jun y activa la transcripción del factor AP1, y el otro que resulta en la fosforilación del factor de transcripción Rel y su subsecuente corte por parte de Dredd. Rel activado es translocado a núcleo para iniciar la transcripción de los genes dependientes de la vía de Imd. La vía de Jak-Stat es activada por la unión de la proteína Upd al receptor Dome, activando a su vez a las proteínas cinasas Hop Janus, asociadas a la proteína Dome. La proteína Hop recluta y fosforila al factor de transcripción Stat, una vez fosforilado se dimeriza y transloca a núcleo para generar la transcripción de genes dependientes de la vía de Jak-Stat. Por su parte la vía de la interferencia de RNA se activa cuando hay un reconocimiento de RNAs de doble cadena largos por parte de la proteína Dicer-2, la cual los procesa en RNA de interferencia pequeños. Estos RNA de interferencia pequeños doble son reconocidos por el complejo RISC que degrada una de las hebras y usa la otra para la degradación de RNA viral complementario. Tomada de Sim, S., Jupatanakul, N. & Dimopoulos, G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses* **6**, 4479-4504, doi:10.3390/v6114479 (2014).

Ante un reto viral en insectos, además de la activación de las vías previamente descritas, existe un entrecruzamiento entre ellas. El ejemplo principal de esto, es la inducción de la expresión de un péptido secretado llamado Vago. La expresión de Vago es dependiente de

la helicasa Dicer-2 que, gracias a su dominio DExD7H-box (dominio que encontramos en sensores de RNA viral como RIG-I y MDA5 en mamíferos) es capaz de detectar intermediarios de RNA de doble cadena durante una infección viral en insectos. El péptido Vago sirve a su vez como ligando de la proteína Dome, lo cual activa la vía de Jak-Stat generando la inducción de genes antivirales. La expresión de Vago en el mosquito del género *Culex* bloquea la replicación de West Nile virus (WNV) por la activación de la vía de Jak-Stat en células vecinas. Este mecanismo resulta particularmente interesante ya que el péptido Vago podría ser el equivalente del IFN-I en invertebrados (Deddouche, Matt et al. 2008, Paradkar, Trinidad et al. 2012, Paradkar, Duchemin et al. 2014).

3. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

El RE es el compartimento celular compuesto por una red de membranas continuación de la envoltura nuclear, considerado casi un gel por su alta concentración de proteínas (100mg/Lt) (Stevens and Argon 1999, Nixon-Abell, Obara et al. 2016). El ambiente del RE es oxidativo y rico en calcio, características que le confieren la habilidad de vigilar y ajustar la síntesis de lípidos y la homeostasis de calcio, pero principalmente en este organelo, se lleva a cabo el control de calidad en el plegamiento de las proteínas transmembranales locales y de las que continuarán por la vía secretoria, que entre ambas constituyen un tercio del proteoma eucarionte (Hurtley and Helenius 1989). Las modificaciones postraduccionales como la formación de puentes disulfuro y N-glicosilaciones son algunos de los procesos que se llevan a cabo en el ambiente del RE y que contribuyen a la conformación final de las proteínas (Wickner, Maurizi et al. 1999). Cualquier alteración en

el equilibrio ambiental puede generar estrés al interior del mismo, lo que repercute en el plegamiento de las proteínas, ej. entrada o salida de Ca⁺, diferenciación de las células secretoras profesionales, radicales libres, falta de nutrientes, mutación de proteínas, infecciones, etc.(Reimold, Iwakoshi et al. 2001, Kaufman 2002, Rutkowski and Kaufman 2004, Marciniak, Garcia-Bonilla et al. 2006). El mecanismo celular encargado de permitir la adaptación de la célula al estrés tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, lleva el nombre de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés: unfolded protein response)(Ron and Walter 2007). La UPR es una vía de regulación transcripcional altamente conservada entre todos los organismos. Se descubrió en *Saccharomyces cerevisiae*, y la activación de la respuesta es mediada sólo por el eje de Ire1p, que cuenta con actividad de cinasa y endoribonucleasa y que tiene blanco principal el RNA mensajero del homólogo de XBP1 (*X-box binding protein 1*), HAC1 (*Homologous to ATF/CREB 1*) en levaduras. Al traducirse el RNA mensajero de HAC1, se convierte en un factor de transcripción que regula genes de respuesta a la UPR, mediante su unión a uno de los tres elementos en cis, llamado UPRE (*unfolded protein response element, CAGCGTG*) (Cox, Shamu et al. 1993, Cox and Walter 1996), cuyo papel principal es recuperar la homeostasis del RE. En cambio en metazoarios la señalización es más compleja, la manera en que se recupera la homeostasis del RE es mediante 3 proteínas transmembranales sensoras: IRE1 (*inositol requiring kinase-1*)(Tirasophon, Welihinda et al. 1998), ATF6 (*activating transcription factor 6*)(Wang, Shen et al. 2000) y PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase PKR-like endoplasmic reticulum kinase*)(Harding, Zhang et al. 1999) que son reguladas directa o indirectamente por la chaperona residente del RE, BiP (Binding immunoglobulin protein) también conocida como GRP78 (78kDa glucose-

regulated protein)(Bertolotti, Zhang et al. 2000, Okamura, Kimata et al. 2000, Shen, Chen et al. 2002). Estos sensores mantienen comunicación entre el RE y el núcleo y al activarse generan: 1) la disminución de la traducción de las proteínas(Harding, Zhang et al. 1999), 2) expresión de genes que codifican proteínas de la maquinaria que aumenta la capacidad de plegamiento(Ma and Hendershot 2004), y 3) la degradación de las proteínas que no logran salir de RE por diversas causas, mediante el mecanismo denominado ERAD (*ER-associated degradation*)(Casagrande, Stern et al. 2000, Friedlander, Jarosch et al. 2000, Travers, Patil et al. 2000). Cuando el estrés persiste, la UPR puede inducir la muerte celular(Rutkowski, Arnold et al. 2006) (Fig. 4). A continuación se describe detalladamente cada uno de los ejes de la UPR.

3.1 ATF6

ATF6 es una proteína transmembranal con un dominio que incluye una región bZIP, su activación por estrés en el RE permiten su disociación de BiP/GRP78 o calreticulina, lo cual genera su translocación vía COPII (*coat protein complex*) al Golgi, donde es procesada por las proteasas S1P (*site-1 protease*) y S2P (*site-2 protease*), liberando su dominio citosólico, el cual se transloca a núcleo donde funciona como factor de transcripción(Shen, Chen et al. 2002, Hong, Luo et al. 2004). Este eje de la UPR se encarga de transcribir genes que aumentan la capacidad de plegamiento, ya que aumenta el número de chaperonas, enzimas de plegado y la expansión de RE, y además, induce la expresión de los genes encargados de degradar proteínas mal plegadas asociadas al RE (ERAD) como Edem (*ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*) (Okada, Yoshida et al. 2002). Existe una relación entre la UPR y la respuesta inflamatoria por la proteína CREBH, uno de los

miembros de la misma familia de ATF6, que se expresa en hígado donde induce la transcripción de proteínas de fase aguda y citocinas que participan en la inflamación(Zhang, Shen et al. 2006).

3.2 PERK

La proteína PERK cuenta con un dominio citosólico de cinasa, que es compartido con otras tres cinasas, HRI (*heme regulated inhibitor*), GCN2 (*general control non-derepressible- 2*) y la cinasa citosólica PKR (*protein kinase RNA-activated*) que genera inmunidad antiviral, al reconocer RNA de doble cadena derivados de la replicación viral(Dey, Cao et al. 2007, Cui, Li et al. 2011, Nallagatla, Toroney et al. 2011). Todas estas cinasas, son capaces de fosforilar al factor de iniciación eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2, subunit alpha*), lo que bloquea la traducción de proteínas. Cuando PERK detecta proteínas mal plegadas, se disocia de BiP/GRP78, se autotransfosforila y se dimeriza y al fosforilar eIF2 α logra disminuir la carga del RE reduciendo el flujo de nuevos polipéptidos (Harding, Zhang et al. 1999). Por otro lado, la fosforilación de eIF2 α induce la traducción preferencial de genes como ATF4 (*activating transcription factor 4*) que tiene un marco de lectura abierto río arriba del codón de inicio, incrementando las probabilidades de escaneo por parte de la subunidad 40s del ribosoma en busca del codón de inicio, lo que favorece el reinicio de su traducción. ATF4 es un factor que activa la transcripción de genes dependientes de la UPR, involucrados en la importación de aminoácidos, la biosíntesis de glutatión y la resistencia al estrés oxidativo y autofagia(Harding, Novoa et al. 2000). Cuando el estrés es prolongado, ATF4 induce la expresión de la proteína CHOP (*C/EBP homologous protein- 10*), también conocido como GADD153 (*growth arrest DNA-damage- inducible gen 153*), que puede

funcionar como un factor de transcripción de supervivencia celular por la inducción de la proteína GADD34 (*growth arrest DNA-damage- inducible protein 34*) que es la subunidad de la fosfatasa 1c (PP1c) que desfosforila la proteína eIF2 α por lo tanto se reactiva la traducción de proteínas, pero dependiendo de la duración y le tipo de estrés que enfrenta la célula, también puede inducir apoptosis(Ma, Brewer et al. 2002, Harding, Zhang et al. 2003, Jiang, Wek et al. 2004).

3.3 IRE1

IRE1 es una proteína residente del RE altamente conservada, se describe como el regulador maestro de la UPR(Hetz and Glimcher 2009, Hetz, Martinon et al. 2011). Tiene tres dominios, el luminal, el transmembranal y el citosólico. Sus características distintivas son: el lado luminal actúa como sensor y tiene una concavidad que interactúa con proteínas mal plegadas y chaperonas(Ron and Hubbard 2008). Al igual que PERK, la región citosólica de IRE1 cuenta con un dominio de cinasa (Ser/Thr) y de unión a ATP que le permite auto-transfosforilarse, oligomerizarse y que sirve de regulador alostérico para activar el dominio de endoribonucleasa cuyo principal blanco es el RNA mensajero del factor de transcripción XBP1 (Hac1 en levaduras), que después de ser procesado se transloca a núcleo. XBP1 se une a promotores de sus genes blanco que codifican chaperonas moleculares como Ero1L que cataliza la formación de puentes disulfuro y otras proteínas que contribuyen a la ERAD como Edem(Nikawa and Yamashita 1992, Bork and Sander 1993, Tirasophon, Lee et al. 2000, Dong, Niwa et al. 2001). El mecanismo de activación de IRE1 tiene dos modelos propuestos: el primero, IRE1 y BiP/GRP78 se encuentran interactuando de manera basal, cuando hay estrés al interior del RE, la interacción entre ambas se ve interrumpida por que

BiP/GRP78 tiene alta afinidad con las proteínas mal plegadas, lo que genera la oligomerización y activación de IRE1 (Bertolotti, Zhang et al. 2000, Zhou, Liu et al. 2006). El segundo modelo propone que IRE1 reconoce directamente las proteínas mal plegadas mediante la cavidad que se encuentra en su dominio luminal. Este modelo se basa en la evidencia de que las mutantes de IRE1 que son incapaces de unir a BiP/GRP78 siguen respondiendo a estrés en el RE (Credle, Finer-Moore et al. 2005, Pincus, Chevalier et al. 2010, Gardner and Walter 2011). Por otro lado, además del procesamiento de XBP1 procesa una gran variedad de RNAs mensajeros mediante un mecanismo conocido como RIDD (*regulated IRE1-dependent decay of mRNA*) que es la degradación de transcritos bajo condiciones de estrés e incluso de manera basal, lo que genera un alivio en la carga del RE y que se considera su función más ancestral, ya que en organismos que no cuentan con el eje de PERK este mecanismo compensa la inhibición de la traducción de proteínas (Hollien and Weissman 2006, Gosline, Nascimento et al. 2011). La activación de RIDD es dependiente del estado de activación de IRE1, y se da cuando se encuentra en forma dímeros y no de oligómeros (Tam, Koong et al. 2014). El procesamiento de XBP1 por la proteína IRE1 es un mecanismo adaptativo que promueve la supervivencia de la célula ya que cuando desaparece da lugar a la activación de PERK facilitando la muerte celular mediante apoptosis (Pincus, Chevalier et al. 2010).

Aunque los genes de la UPR parecen estar conservados entre los organismos, no se sabe si las funciones son equivalentes entre ellos. En invertebrados, se conservan las funciones generales de la UPR permitiendo la adaptación de las células al estrés. Por ejemplo, la regulación transcripcional, que es un aspecto clave de la UPR en eucariontes, no es

ampliamente utilizado por los protozoos, que carecen de las proteínas IRE1 y XBP1. No obstante, el estrés de ER en *Trypanosoma brucei* da lugar a cambios en la expresión génica similares a los observados en otros eucariontes durante la UPR, incluyendo la regulación de muchos genes implicados en el plegamiento de proteínas. Aunque se desconoce las proteínas que median esta respuesta, la regulación de varios objetivos se logra a través de la regulación del RNA mensajero. Curiosamente, una gran cantidad del RNA regulado negativamente por el estrés en *T. Brucei* codifica para proteínas destinadas al RE, una reminiscencia de la vía RIDD en eucariotas superiores (Goldshmidt, Matas et al. 2010, Gosline, Nascimento et al. 2011). Por el contrario, en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, sólo unos pocos genes dependen de la vía ATF6. La inducción de la respuesta al estrés del RE, chaperonas y componentes del ERAD se mantiene en el knockdown de ATF6 en *C.elegans*, lo que sugiere que el eje de IRE1 es la que induce la mayoría de los genes canónicos de la UPR. (Shen, Ellis et al. 2005). Estos hallazgos implican que en la evolución de invertebrados a mamíferos, el principal regulador de las proteínas de control de la calidad de ER pasó de ser IRE1 a ATF6 y que los mecanismos que alivian el estrés dentro del ER se preservan entre las especies.

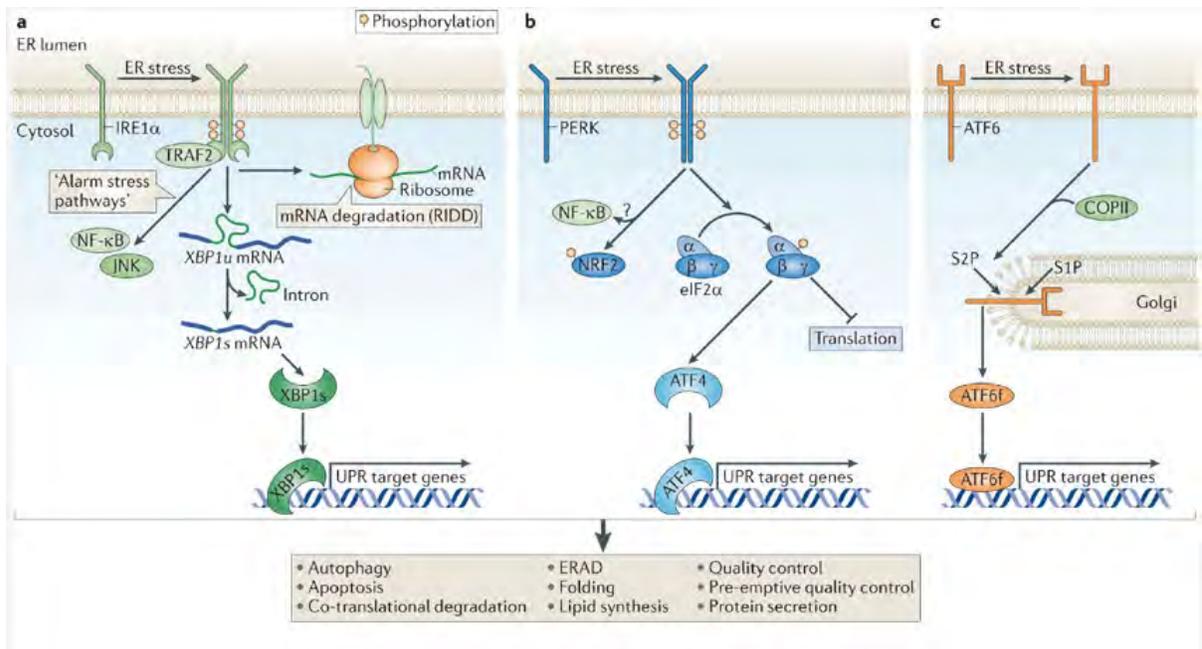


Figura 4. Respuesta a proteínas mal plegadas. Las proteínas IRE1, PERK y ATF6 traducen la información del estado de plegamiento de las proteínas en el RE al citosol y al núcleo para restaurar la capacidad de plegamiento. Tomada de Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 89-102, doi:10.1038/nrm3270 nrm3270 [pii] (2012).

4. La UPR y la inmunidad

En años recientes el interés por la relación que hay entre la UPR y la respuesta inmune ha aumentado debido a que en diversas enfermedades inflamatorias, metabólicas y respiratorias en donde existe una inflamación crónica, la UPR tiene un papel relevante (Gotoh, Endo et al. 2011, Cnop, Foufelle et al. 2012, Kolattukudy and Niu 2012). Además se ha descrito mediante microarreglos, una concordancia parcial entre los genes activados en infecciones bacterianas y virales y la activados durante la UPR (Ke and Chen 2011, Li, Kong et al. 2015). La activación de cada uno de los ejes de la UPR genera o amplifica la respuesta inmune, en particular el eje de IRE1/XBP1 promoviendo la activación de NF-κB,

JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) e IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), esta activación genera la transcripción de efectores inmunes como citocinas, especies reactivas del oxígeno y péptidos antimicrobianos que generan un fenotipo proinflamatorio que protege a la células contra organismos invasores(Maguire, Mulugeta et al. 2011, Hasnain, Lourie et al. 2012)(Fig. 2). Los mecanismos descritos para generar esta activación serán descritos a continuación.

IRE1 sirve como sitio de unión para TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) induciendo la fosforilación y degradación de IκB, por lo tanto la translocación de NF-κB. Además la interacción IRE1-TRAF2 recluta ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), lo que activa a JNK, generando la expresión de genes proinflamatorios (Urano, Wang et al. 2000). La activación de PERK inhibe la traducción de proteínas y esto resulta en una activación permanente de NF-κB, el mecanismo es independiente de la fosforilación y degradación de IκB, involucra más una cuestión de la relación NF-κB/IκB en el que IκB tiene una vida media menor que NF-κB por lo tanto al estar disminuida la traducción de IκB, NF-κB se mantiene activa(Jiang, Wek et al. 2003, Deng, Lu et al. 2004, Tam, Mercado et al. 2012). El eje de ATF6 induce la fosforilación de AKT para activar NF-κB en presencia de citotoxinas(Yamazaki, Hiramatsu et al. 2009, Nakajima, Hiramatsu et al. 2011). Por otro lado la activación de los receptores tipo Toll (TLR) puede activar la señalización de la UPR vía IRE1, lo que probablemente refleja una respuesta diseñada para combatir la infección(Martinon, Chen et al. 2010). En particular, este mecanismo es indispensable en organismos donde la defensa contra algún agente infeccioso, depende exclusivamente de la inmunidad innata. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en

Caenorhabditis elegans se encontró que el eje de IRE1-XBP1 tiene un papel central protegiendo contra una activación “excesiva” de la inmunidad innata ante un reto con *Pseudomona aeruginosa*, que induce una respuesta mediada por MAPK-p38, ya que las mutantes de XBP1 muestran una mayor letalidad en respuesta a la infección (Richardson, Kooistra et al. 2010). Otro ejemplo en el caso de dípteros es el de *Ae. aegypti* que en presencia de la toxina Cry11Aa existe un mecanismo de defensa dependiente de la UPR para promover la supervivencia celular, ya que al silenciar IRE1 y XBP1 hay un aumento en 2.6 y 3.1 veces la susceptibilidad del mosquito a la toxina bacteriana (Bedoya-Perez, Cancino-Rodezno et al. 2013).

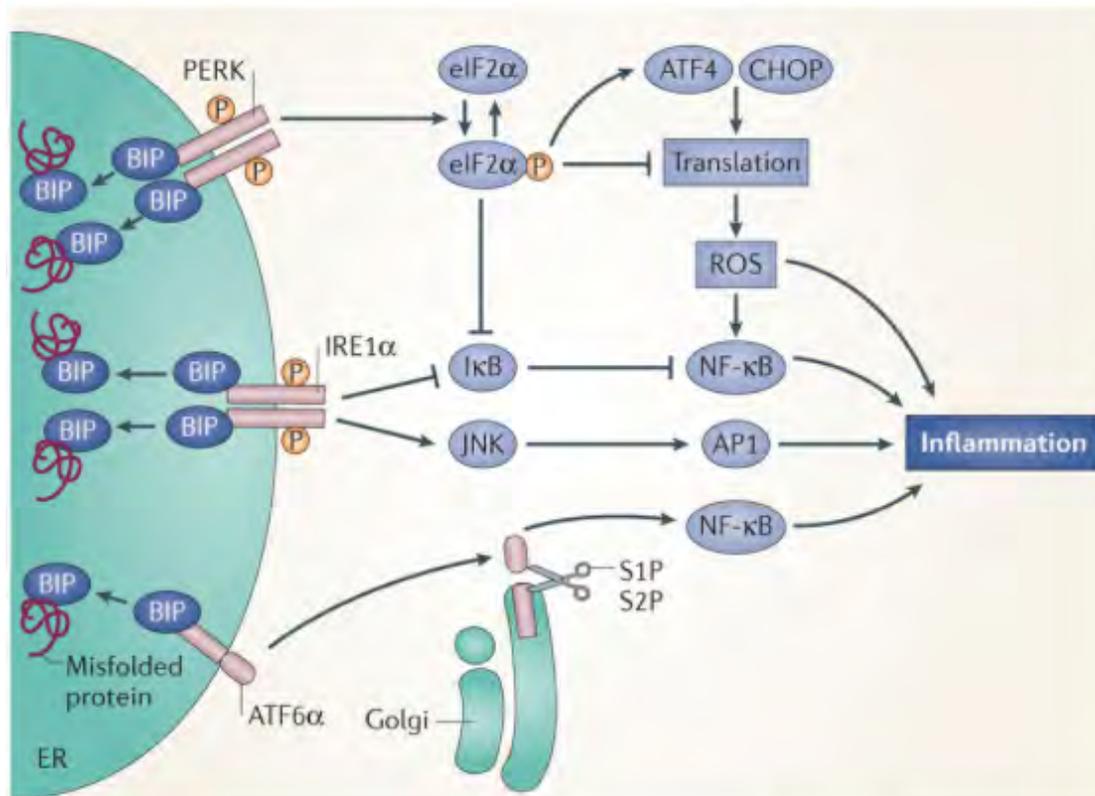


Figura 5. Entrecruzamiento entre la UPR y la respuesta inmune. Los 3 ejes de la UPR aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno, la transcripción de NF-κB y la transcripción de AP1, generando un estado de inflamación. Tomado de Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* **14**, 581-597, doi:10.1038/nrc3800 (2014).

Cuando los patógenos interfieren con la función del RE al utilizarlo como parte de su ciclo replicativo se activan vías de adaptación como la UPR. En el contexto de la infección con DENV, la activación del eje de IRE1/XBP1 intenta disminuir la carga debida a la síntesis de proteínas virales, generando VPs y CM que incrementan la concentración de componentes virales y del hospedero para optimizar la replicación y ensamblaje de los viriones, y que además sirven para ocultar estas proteínas antigénicas del sistema inmune innato(Welsch, Miller et al. 2009, Gillespie, Hoenen et al. 2010, Ambrose and Mackenzie 2011, Green, Beatty et al. 2014, Junjhon, Pennington et al. 2014).

La infección por el DENV con la subsecuente activación de la UPR, genera la adaptación y supervivencia de la célula, con los beneficios que esto significa para la replicación viral, pero también puede resultar en un agravio al virus por la activación de la respuesta inmune, por lo tanto el balance entre los mecanismos del virus para modular estas vías y la adaptación de la célula determinará el resultado final de la infección.

JUSTIFICACION

Las enfermedades virales transmitidas por vector, en particular por mosquitos, están adquiriendo una relevancia mundial, desafortunadamente los métodos de control vectorial no han mostrado impacto en la incidencia en estas enfermedades. El conocimiento de los determinantes moleculares de la resistencia a la infección del virus Dengue en el mosquito, en particular, la relación que hay entre la inmunidad innata del mosquito, y la interacción de ese sistema con la replicación viral; permitiría proponer la alternativa de generar mosquitos manipulados genéticamente para evitar la infección del virus y con ello interrumpir la transmisión.

Los modelos propuestos de la proteína NS4B-DENV2 como una de las proteínas virales claves en la regulación de la respuesta inmune del hospedero, nos permite postularla como la proteína capaz de modular la respuesta adaptativa al estrés del RE y su entrecruzamiento con las vías de la respuesta inmune en el vector de la enfermedad.

HIPOTESIS

En células de insecto NS4B-DENV2 modula la expresión de efectores dependientes de la UPR en la respuesta inmune.

OBJETIVOS

Determinar la participación de la proteína NS4B-DENV2 en la modulación de expresión de efectores de la inmunidad dependiente de la UPR en células de insecto.

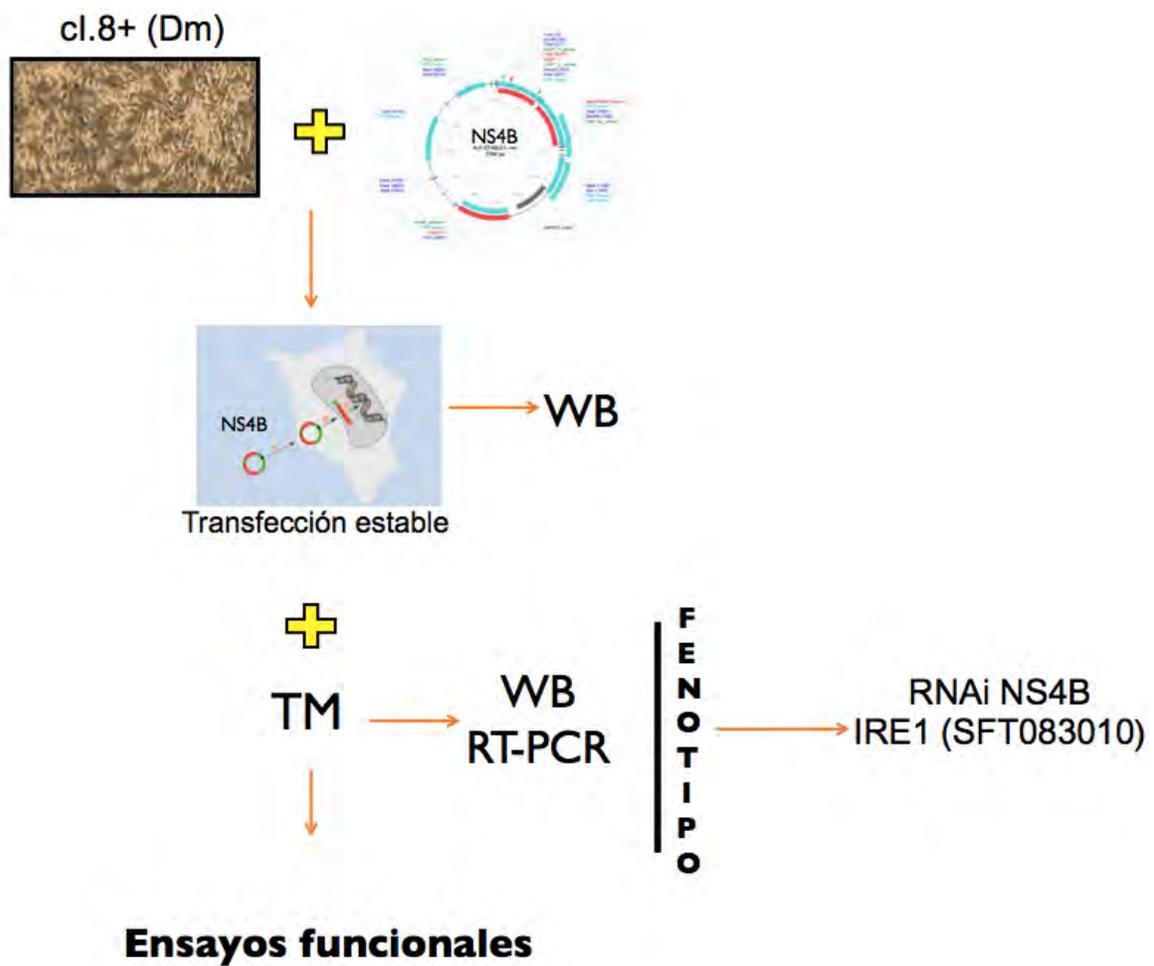
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el impacto de la sobreexpresión de la proteína NS4B-DENV2 en la activación de la utilizando drogas inductoras de estrés de RE, en células de insecto.
2. Determinar si la sobreexpresión de NS4B-DENV2 es capaz de modificar el patrón de expresión de efectores dependientes de la UPR de la inmunidad innata de los insectos.

OBJETIVOS METODOLÓGICOS

1. Realizar transfección estable de la proteína NS4B-DENV2 en células de mosquito y medir el procesamiento de XBP1, la fosforilación de eIF2 α , y el aumento en la expresión de Edem y Ero1L.
2. Desarrollar un sistema de tamizaje usando Tunicamicina (TM), una droga inductora de la UPR y evaluar el patrón de expresión de efectores de la respuesta inmune por qRT-PCR y WB.
3. Realizar el silenciamiento de la proteína NS4B-DENV2 para demostrar una reversión del fenotipo encontrado.

ESTRATEGIA METODOLÓGICA



MATERIAL Y METODOS

Cultivo celular, virus y tratamientos. Las técnicas y procedimientos usados en este trabajo fueron aprobados por los comités de ética (investigación sin riesgo, CI1005-1057) y bioseguridad (CI1005-996 31 de mayo del 2011) del Instituto Nacional de Salud Pública que a su vez cumplen con los estándares internacionales. Se utilizaron 4 líneas celulares distintas para establecer la adecuada para este proyecto,: la línea celular C6/36 (células de homogeneizado de larvas de *Aedes albopictus*), las células Aag2 (celulas de origen embrionario de *Ae. aegypti*), las células S2 de *Drosophila* y finalmente las CME W1 cI.8+ (células de origen embrionario de *Drosophila melanogaster*). La línea celular C6/36 tiene la vía de señalización de interferencia de RNA incompleta debido a una actividad deficiente de Dicer-2, además de que la transfección es técnicamente complicada. Mientras que la línea células Aag2 se encuentra infectada por un Flavivirus de insecto, así que elegimos una línea de *Drosophila melanogaster* por que cuenta con los receptores y ligandos de todas las vías de respuesta inmune. La línea celular de *Drosophila melanogaster* CME W1 cI.8+ (cI.8+) fue adquirida en el *Drosophila* Genomics Resource Center (DGRC) de la Universidad de Indiana en EUA. La línea celular cI.8+ junto con las clonas generadas H (alta expresión de la proteína NS4B-DENV2), L (con baja expresión de la proteína NS4B-DENV2) y G (vector que sólo expresa GFP) fueron cultivadas a 27° C en el medio M3 (Sigma:S3652) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Gibco:12657011), 5ug/ml de insulina (Gibco:12585014) y 2.5% de extracto de mosca (preparado de acuerdo al protocolo proporcionado en el página del DGRC)(Cherbas January 29, 2016).

El protocolo para preparar el extracto de mosca para el cultivo de las células cI.8+ fue el

siguiente:

- 1) Se colectaron las moscas en un tubo para centrifugar de 50 ml, se colocaron a -20°C al menos por 45 min. El genotipo de las moscas no importó mientras se evitaran las de fenotipo *ebony* por su alto nivel de tirosinasa, la cual cataliza la producción de melanina. Se necesitaron aproximadamente 300 moscas (cerca de 0.35g) por cada 2.5 ml de extracto.
- 2) Para hacer el extracto se necesitó: homogenizador de vidrio (dounce), hielo, centrífuga refrigerada de baja velocidad y baño maría a 60° C.
- 3) Se pesaron y se transfirieron a un tubo. Por cada gramo de moscas se utilizaron 6.8ml de medio M3 para homogenizarlas en el dounce (siempre en hielo).
- 4) El homogenizado fue centrifugado a 1500 x g a 4°C por 15 min, se tomó el sobrenadante y se desechó el botón.
- 5) Se incubó el sobrenadante a 60° C por 5 min para inactivar la tirosinasa.
- 6) Se volvió a centrifugar a 1500 x g a 4° C por 90 min.
- 7) Finalmente se filtró a través de un filtro de 0.22 y se almacenó en alícuotas de 2.5 ml y 10 ml a -20° C.

La línea celular C6/36 de *Ae. albopictus* fue cultivada en medio DMEM (1X) (Gibco 11960-044) suplementado con 10% de SFB (Gibco 12657011) inactivado, Hepes (Gibco 15630080) al 1%, glutamato al 1% y penicilina/estreptomicina (Gibco:15140163) al 1% en frascos cerrados a una temperatura de 28°C y sin CO₂. La línea celular Aag2 de *Ae. Aegypti* (donada por la Dra Ann Fallon de la Universidad de Wisconsin en Minesota) fue cultivada en Medio MEM 1X (Gibco 11095) adicionado con Glucosa al 10% (Gibco 15023), L-Glutamina al 1X (Gibco 25030), vitaminas (1X) (Gibco 11120), aminoácidos no esenciales

al 1X (Gibco 11140), bicarbonato de sodio (Gibco 25080), penicilina/streptomina (Gibco 15140) y Hepes (Gibco 15630080) a 25mM, cuando no se cuenta con incubadora con CO₂ a una temperatura de entre 28-30°C como fue descrito por Shih et al (Shih, Gerenday et al. 1998). El estrés de RE fue inducido mediante la adición de Tunicamicina (TM, Clabiochem 654380), a una concentración de 5µg/ml durante 8 y 24 h. Para la inhibición de la vía de interferencia de RNA se utilizó PMA (*phorbol myristate acetate*, Sigma P1585) y para inhibir la actividad de endonuclease de IRE1 se utilizó STF083010 (Sigma SML0409). El virus DENV2 cepa Nueva Guinea para las infecciones fue donado por el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), Secretaria de Salud, México.

Plásmidos. Se usaron técnicas de biología molecular estándar para clonar el gen de la proteína NS4B-DENV2 en un vector para expresión en células de insectos. El vector pCAGGS con el promotor de β-actina con el cDNA de la proteína NS4B-DENV2 16681 (donado por el Dr. Adolfo García-Sastre de la escuela de medicina del Monte Sinaí en Nueva York, EUA) sirvió como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se insertó el fragmento que codifica para los aminoácidos de la proteína NS4B-DENV2 en el plásmido con un promotor para su expresión en células de insecto, el Ac5-STABLE1-blast (donado por James Sutherland, CIC- bioGUNE, Spain, PMID:22355594) en fase con la secuencia de GFP. El fragmento que codifica para los aminoácidos para la proteína NS4B-DENV2 fue amplificada con los siguientes oligos: 5-AGGATCCCAAGCAAAAGCAACC-3; 5-ATAAGATCTTTATTGTCCCAACTGCTTT-3, y fue clonado entre los sitios de KpnI y EcoRI del plásmido. El plásmido obtenido después de la inserción con la proteína NS4B DENV-2 NGC fusionada con la proteína GFP fue transformado en bacterias y purificado según las instrucciones del protocolo de

purificación descrito en el Kit Maxi (Qiagen). Posteriormente la estructura del plásmido se comprobó mediante ensayos de restricción y secuenciación automatizada realizada en la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Transfección y FACS: Las células de *Drosophila* cI.8+ fueron sembradas en placas de 6 con una confluencia de 60-70%, posteriormente fueron transfectadas simultáneamente con el plásmido vacío (sólo GFP) o con el plásmido NS4B-DENV2/GFP usando el Kit de Attractene (Qiagen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Para obtener una población celular monoclonal que expresara el plásmido, las células transfectadas fueron sometidas a diluciones crecientes del cultivo parental, y posteriormente incubadas en medio completo con 30µg/ml de blasticidina (Calbiochem:203350). Para cuantificar los niveles de expresión intracelular de NS4B-DENV2/GFP, las células fueron despegadas de manera mecánica, se lavaron con PBS (137mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2.7mM KCl, 1.8mM KH_2PO_4 , pH7.4) y fueron incubadas en hielo. Las células se sometieron a citometría de flujo asociada a sorting usando el equipo FACSAria II Cell Sorter (BD Biosciences) en el Instituto de Ciencias Biomédicas y los datos fueron analizados mediante el software Flow Jo (Tree Star Inc.)

Infeción y ensayos de viabilidad celular. La línea celular de *Drosophila* CME W1 cI.8+ y las clonas L y H se sembraron en placas de 6 pozos un día antes del experimento, incubando con o sin Tunicamicina (5µg/ml) y se infectaron con el virus DENV2 a una MOI de 0.1 en medio M3 completo con 2% de suero fetal bovino (SFB) a 27°C por 1 h, seguido de medio M3 completo con 5% SFB durante 5 días. Se utilizó cisplatino como inductor de apoptosis. Después de incubar las células con un intervalo de concentraciones de cisplatino (Blastolem RU, Marca Teva) y un control de viabilidad, se obtuvo el IC50 de 50uM (no se muestra). Las células se sembraron en placas de 24 pozos y se trataron con cisplatino y una

combinación de cisplatino y TM (5µg/ml) a la dosis indicada. Después de 8 h se retiró el medio y se agregó medio fresco. Posteriormente se cuantificaron las células con el contador automático de células Scepter®

Western blot. Las células de las clonas o de los controles de la línea cI.8+ se sembraron en placas de 6 pozos donde fueron estimuladas o directamente lisadas con un buffer de lisis que contiene 20mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 10% SDS, 10% NP-40, 1mM EDTA, una pastilla del cocktail de inhibidores de proteasas (Roche 11836153001) por cada 10 ml de buffer, y para los casos proteínas fosforiladas se usó phosphosafe (Millipore 71296-3). Después de centrifugar a 13,500 RPM por 10 min a 4°C, se descartó el botón y se utilizó el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas mediante el kit de ensayo de BCA (Pierce), el sobrenadante se hirvió a 80°C durante 10 min junto con un buffer de carga de Laemmli. A continuación se cargaron 30 µg de proteína en un gel de poliacrilamida de 4-12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó con 3% de leche libre de grasa en PBS-Tween durante 1 h y se incubó en agitación con el anticuerpo primario [1:1000 policlonal de conejo anti-NS4B (Genetex GTX 103349), 1:1000 del policlonal de conejo anti-eIF2α (Cell Signalling 9722), 1 :1000 monoclonal de conejo eIF2α fosforilado en la Serina 51 (Cell Signalling 9721) y 1:2000 para el monoclonal de ratón anti-Actina (Santa Cruz sc-47778)] durante toda la noche a 4°C . La membrana se lavó e incubó de manera similar con un anticuerpo secundario 1:10,000 cabra anti-conejo o anti-ratón conjugado con Peroxidasa (Jacksone immuno research 111-035-144 y 115-035-003 respectivamente) durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con el kit Super signal TM West femto Maximum Sensitivity substrate (Pierce/Thermo). Se detectó la señal mediante el sistema C-Digit Western blotting detection

system (Li-Cor) y la señal se cuantificó mediante el software Image Studio Digits Li-Cor Inc.

Análisis de RT-PCR y del splicing del RNA mensajero de XBP1: La detección del splicing del RNA mensajero del factor de transcripción XBP1, secundario a la activación del IRE1 se determinó mediante PCR punto final. Las células control y las clonas se sembraron en placas de 6 pozos y se estimularon con TM (5µg/ml), después de lo cual se lavaron con PBS y se agregó TRIzol (Invitrogen 15596026) de acuerdo a las indicaciones del fabricante para obtener el RNA total. Una vez obtenido el RNA mensajero, tanto su concentración como la relación 280/260 se obtuvieron por espectrofotometría con el equipo Nanodrop (Thermo Scientific). De manera rutinaria se usó 1 µg de RNA como templado en cada reacción de 20 µl para la síntesis cDNA con el kit Revert Aid Minus first-strand cDNA synthesis (Thermo Scientific K1631) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se usó 1 µl del resultado de esa reacción como templado para una reacción de 25µl de PCR. El kit de PCR utilizado fue GoTaq® DNA polymerase (Promega). El buffer para la Master Mix fue el 5X Green GoTaq® Reaction Buffer, el cual contenía MgCl₂ a una concentración final de 1.5 mM. La tabla 1 muestra los reactivos y las concentraciones para la reacción. Para amplificar XBP1 de *D. melanogaster*, la mezcla se sometió a los siguientes parámetros: 94°C por 5 min, después por 40 ciclos (94°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72°C por 30s) y 5 min al final del ciclo, usando los siguiente oligonucleótidos

5-CTGGAACAGCAAGTGGTAGA-3 3-

CTGGGTCCTTCTGGGTAGAC-5. Se cargaron 10 µl del producto del PCR en un gel de electroforesis de agarosa al 3% con bromuro de etidio, fue detectado y fotografiado bajo luz UV.

Tabla 1. Mezcla de reacción para PCR en punto final.		
Reactivo	Cantidad	Concentración final
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5.0 µL	1x
PCR Nucleotide Mix (10 mM)	0.25 µL	0.3 mM
Oligonucleótido sentido (10 µM)	0.25 µL	0.2 µM
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	0.25 µL	0.2 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µL)	0.15 µL	1.25U
Agua libre de endonucleasas.	18.1 µL	---
cDNA	2.0 µL	---
Volumen final	25 µL	---

RT-PCR anidado para la detección de Flavivirus: Las células Aag2, las C6/36 y las cI.8+ se sembraron en cajas de 6 pozos y al alcanzar una confluencia de entre 70-80% se cosecharon junto con el sobrenadante y se extrajo el RNA viral mediante el protocolo del kit QIAamp viral RNA. Una vez obtenido el RNA viral, se realizó una RT-PCR genérica anidada para Flavivirus, con el kit OneStep RT-PCR de Qiagen y los siguientes oligos: Flavi1+: 5' GAYYTIGGITGYGGIIGIGGIRGITGG 3', Flavi1-: 5' TCCCAICCGCIRTRTCRTCIGC 3' para el primer paso bajo las siguientes condiciones:

Tabla 2. Mezcla de reacción para RT- PCR genérica anidada paso 1 .	
Reactivo	Cantidad
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 µL
DNTPs (10 mM)	0.5 µL

Flavi 1+ (100 pmol)	0.2 µL
Flavi 1- (100 pmol)	0.2 µL
Qiagen One step RT-PCR Enzyme Mix	0.5 µL
Agua libre de endonucleasas.	18.1 µL
RNA	2.5 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 3. Programa del termociclador RT-PCR generica anidada paso 1		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
45oC	30 min	1
94oC	15 min	1
94oC 40oC	30 s 4 s	40
72oC	1.15 s	
72oC	5 s	1

Se obtuvo un fragmento amplificado de 1385 pb. Posteriormente para el segundo paso, el producto de esa RT-PCR se sometió a la PCR anidada y se amplificó con los oligos:

FLAVI2+: 5' YGYRTIYAYAWCAYSATGGG 3', FLAVI2: 5' CCARTGITCYKYRTTIAIRAAICC 3' bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Mezcla de reacción para RT- PCR generica anidada paso 2 .	
Reactivo	Cantidad
5x Buffer Promega	5.0 µL
DNTPs (10 mM)	0.5 µL

Flavi 2+ (100 pmol)	0.2 µL
Flavi 2- (100 pmol)	0.2 µL
Taq Promega (5U/µl)	0.5 µL
Agua libre de endonucleasas.	15.475 µL
MgCl ₂ 25µM Promega	0.125 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 5. Programa del termociclador RT-PCR generica anidada paso 1		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94oC	2 min	1
94oC 47oC	30 s 1 s	40
72oC	30 s	
72oC	5 m	1

Se cargaron 10µl del producto del PCR en un gel de electroforesis de agarosa al 3% con bromuro de etidio, y se obtuvo un fragmento final de 143pb que fue detectado utilizando luz UV y que posteriormente fue fotografiado.

RT-PCR en tiempo real: Para la detección de la expresión relativa del RNA mensajero de los marcadores de la UPR y los efectores inmunes de interés, los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con el programa RealTime qPCR Assay Entry (<http://www.idtdna.com>). Los oligonucleótidos candidatos a utilizarse debían de cumplir los siguientes criterios: 1) que el oligonucleótidos 5'-3' y el 3'-5' se alinearan en diferentes

exones (para lo cual el producto de PCR debería de amplificar únicamente en una región inter-exónica), 2) que la longitud de producto de amplificación fuera menor a 150 bp, 3) que la T_m óptima fuera aproximadamente de 68°C (± 2 °C), 4) que el contenido de GC fuera cercano al 50% ($\pm 15\%$), y 5) que bajo las condiciones estándar de la qPCR, la formación de horquillas, dímeros y heterodímeros fueran casi nulas. Una vez diseñados los oligonucleótidos, la especificidad de su secuencia se analizó con el algoritmo blastn del programa Nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El porcentaje de cobertura del análisis de secuencia debería de ser de 100%, y que la alineación entre la secuencia del oligonucleótido con el gen de interés fuera específica (el menor *E value* posible con respecto al alineamiento con otras secuencias que no eran de interés).

Por cada RNA mensajero de interés se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, los cuales se analizaron tanto por PCR en punto final como por qPCR. La selección final de los oligonucleótidos se realizó bajo los siguientes dos criterios: 1) que mediante PCR en punto final sólo generaran un amplicón, y 2) que mediante qPCR las curvas de disociación fueran adecuadas. La extracción de RNA total obtenido de las clonas y del control de la línea celular cI.8+ se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante con el reactivo TRIzol (Invitrogen 15596026). Una vez obtenido se cuantificó en Nanodrop (Thermo Scientific) y se utilizó 1ng de RNA para la qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 6) con el kit Verso SYBR Green 1 step q RT-PCR Rox mix (Thermo AB4105C) y con el aparato ViiA 7 (Applied Biosystem). En la tabla 7, se menciona la mezcla de la reacción para la qPCR; y en la tabla 8, se muestra el programa utilizado en termociclador. Se usaron las curvas de disociación para verificar la especificidad de cada producto. Todos los resultados fueron normalizados mediante la expresión endógena de actina. Todas las

muestras se analizaron por triplicado y los experimentos se repitieron al menos 2 veces. El $\Delta\Delta C_t$ se calculó usando la ecuación descrita por el protocolo del fabricante. Los gráficos fueron trazados como el incremento por encima del control.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados		
Gen	Oligonucleótido	Secuencia
<i>eroll</i>	Ero1L F	5'-TGCTCCAAATACCTGCTGTC-3'
	Ero1L R	3'-CGCTTGTGGTTTCTGGACTA-5'
<i>edem</i>	Edem F	5'-ACCATCCTTCTGGAATTTGC-3'
	Edem R	3'-TTAGCTTCCACAGTGCATC-5'
<i>cactus</i>	Cactus F	5'-TGCCTTGACAGAGAAGTTCG-3'
	Cactus R	3'-TCGTAGTTGCGAATCTCCAG-3'
<i>inos</i>	iNOS F	5'-TACAGAGGTCTGCACCAAGC-3'
	iNOS R	3'-CAGCGGAACTCCAGTATCA-5'
<i>rell/dorsal</i>	Rel1 F	5'-GAAAGTAGCGATGCTGGTCA-3'
	Rel1 R	3'-TGTTGTCCATTTCGGTGTCT-5'
<i>def</i>	Def F	5'-TGGATCCAATTCCAGAGGAT-3'
	Def R	3'-CACTTGGAGAGTAGGTCGCA-5'
<i>bip/grp78</i>	BiP/GRP78 F	5'-CGCATCGAAATTGAATCCTT-3'
	BiP/GRP78 R	3'-TTCAGGGTGGAAACGGAATAG-5'

Tabla 7. Mezcla de reacción para qPCR.		
Reactivo	Cantidad	Concentración final
Enzyme mix (2x)	0.125 μ L	
2X 1 step Rox Mix	6.25 μ L	1x
RT enhancer	0.625 μ L	
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	0.875 μ L	70nM

Oligonucleótido antisentido (10 μ M)	0.875 μ L	70nM
Agua libre de endonucleasas.	hasta 12.5 μ L	---
RNA	---	1ng
Volumen final	12.5 μ L	---

Tabla 8. Programa del termociclador.		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
50oC	15 min	1
95oC	15min	1
95oC	15 s	40
60oC	30 s	
72oC	30 s	

Concentración de ON (Nitritos/Nitratos) y péptidos antimicrobianos en el sobrenadante de células estimuladas: Las células de la línea cI.8+(control) y las clonas fueron sembradas en placas de 12 pozos y fueron estimuladas con TM (5mg/ml) durante 24 h. La concentración de nitritos y nitratos fue determinada mediante la reacción de Griess. El protocolo fue el siguiente: 50 μ l del sobrenadante de las clonas estimuladas fueron mezclados con 50 μ l de Sulfanilamida al 1% y 50 μ l de naftil-etilen-diamina al 0.1% (Sigma). Después de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. La cuantificación en cada ensayo se realizó en base a una curva de referencia usando NaNO_2 (1-100mM).

Por otro lado para medir el efecto de los péptidos antimicrobianos utilizamos el kit del

ensayo BacterTiter Glo (Promega) de acuerdo al protocolo del laboratorio del Dr Eduardo García:

1.- Se crecieron las bacterias (*E. coli* ATCC 25922) en agitación (200 rpm) a 37° durante toda la noche.

2.- En 3 ml de medio TSB (Tryptic Soy Broth) al 5% se inocularon 30 ul del cultivo para que crecieran entre 2-3 horas a una densidad entre 0.1 y 1. Se leyó la densidad a ABS_{620}

3.- Para diluir las bacterias: Si la densidad era de 0.1 se diluyó 1:10 con buffer.

4.- Se colocó 50ul del sobrenadante de la células estimuladas con TM.

5.- Se tomaron 10 ul de la dilución de bacterias y se sembraron en las placas. Se mezcló con pipeta, se tapó bien y se incubó durante 3 horas a 37° sin agitación.

6.- Después de la incubación se agregó en la placa de 96 pozos para luminiscencia, 20 ul de reactivo bacter-glo previamente preparado.

7.- Se tomó 25 ul de cada pozo del experimento y se mezcló con el reactivo en la placa. Se tapó con aluminio, se agitó suavemente durante 5 mins y se leyó la placa para luminiscencia en el Glo Runner plate reader (Turner Biosystem).

Este reactivo es capaz de lisar las bacterias y generar una señal luminiscente, por la cantidad de ATP, como un indicador de células metabólicamente activas.

Silenciamiento postranscripcional de NS4B: para inhibir específicamente la expresión de NS4B, las células se transfectaron con ARN de doble cadena (*siRNA*). La secuencia utilizada fue: 5'-ACUGUUAUUC CAUCG ACAGUUGGGUUU-3 y su complementaria, como control se utilizó un oligo con la secuencia desordenada y su complementaria. Para

ello, se diluyeron 150 pmoles de *siRNA* en Medio M3 sin complementar hasta un volumen final de 100 μL y se agregaron 4.5 μL de Attractene (Qiagen 301004) en el mismo medio. A continuación se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo las células sembradas en placas de 6 pozos se lavaron 2 veces con PBS, el medio de cultivo de las células se reemplazó por 800 μL del medio M3 y se añadieron a este medio los 100 μL de la mezcla de *siRNA* y Attractene. Las células se incubaron a 37°C durante 6 h, pasado este tiempo se retiró el medio de la transfección y las células se incubaron en medio de cultivo complementado durante 96 h. Transcurrido ese tiempo, se analizaron los niveles de expresión de la proteína NS4B-DENV2 mediante WB.

Análisis y estadística: Para decidir el tipo de pruebas estadísticas a realizar, primero se evaluó la distribución y normalidad de los datos. En caso de datos con distribución normal, las diferencias entre las varianzas de la medias de los cuatro grupos se analizó con la prueba de ANOVA, sí el valor de $p < 0.05$, entonces se realizó la prueba *post-hoc* de Bonferioni. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Uso de la línea cI.8+ de Drosophila melanogaster como modelo de estudio. El vector del virus DENV es el mosquito *Ae. aegypti* por lo que las primeras células consideradas para este proyecto fueron las Aag2, pero al realizar una RT-PCR anidada para Flavivirus se demostró la infección por el CFAV (Cell Fusion Agent Virus), (Fig.6-A) un *Flavivirus* de insecto, por lo tanto la interpretación de los resultados bajo ambas infecciones sería confusa. Basados en que Sessions et al. validaron a *Drosophila m* como un modelo para identificar las interacciones DENV/hospedero (Sessions, Barrows et al. 2009) usando la línea S2 de *Drosophila m*, entonces se buscó entre de las líneas de *Drosophila m*, una que contara con las vías de señalización inmune más completas y se decidió usar la línea CME W1 cI.8+.

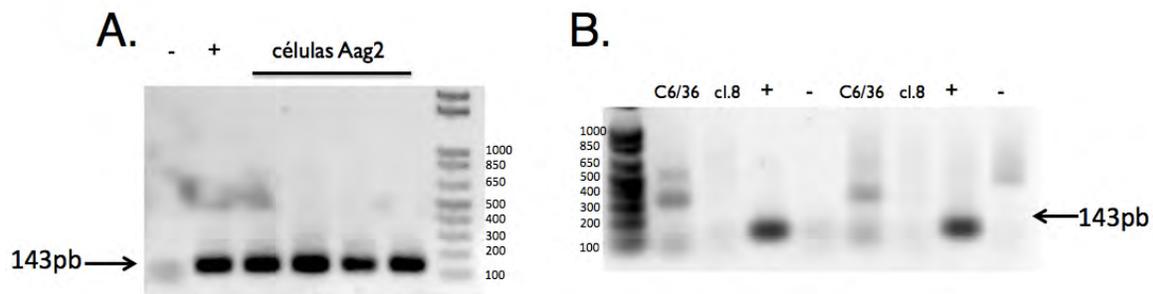


Figura 6. La línea celular Aag2 se encuentra infectada por un Flavivirus de insecto (CFAV). Se corroboró mediante una RT-PCR anidada, A) en líneas celulares Aag2 usando los controles positivo (+: cerebro de ratón infectado por DENV), y negativo (- :H₂O miliQ). B) Se corrieron las pruebas para las líneas celulares C6/36, cI.8+ con un control positivo y negativo.

Construcción del plásmido para expresar el gen de la proteína NS4B del DENV2 en células de insecto. El plásmido con el gen de la proteína NSB-DENV2/16681 con el promotor de β -actina pCAGGS-HAtag- sirvió como template para la amplificación del gen

de la proteína NS4B-DENV2 por PCR con los oligos 5'-GGAGGTACCCAAAATGAACGAGATGGGTTTCCTAGA-3' y 3'-GAGAATTCCTTCTTGTGTTGGTTGTGTT-5'. Posteriormente se insertó en fase con la proteína GFP en el plásmido Ac5-STABLE1-Blast el cual cuenta con el promotor de actina 5 y confiere resistencia a blasticidina. El gen de la proteína NS4B-DENV2 se clonó entre los sitios de restricción de las enzimas KpnI y EcoRI. Después de insertarlo el plásmido se sometió a análisis de restricción (Fig. 7-A) y a secuenciación (servicio que fue realizado en Instituto de Biotecnología de la UNAM). Una vez obtenida la secuencia del plásmido, la especificidad de su secuencia se analizó con el algoritmo blast de los programa Nucleotide blast y Protein blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La figura 7-B muestra que el gen amplificado e inserción en el plásmido codifica la proteína NS4B-DENV fusionada a la proteína GFP.

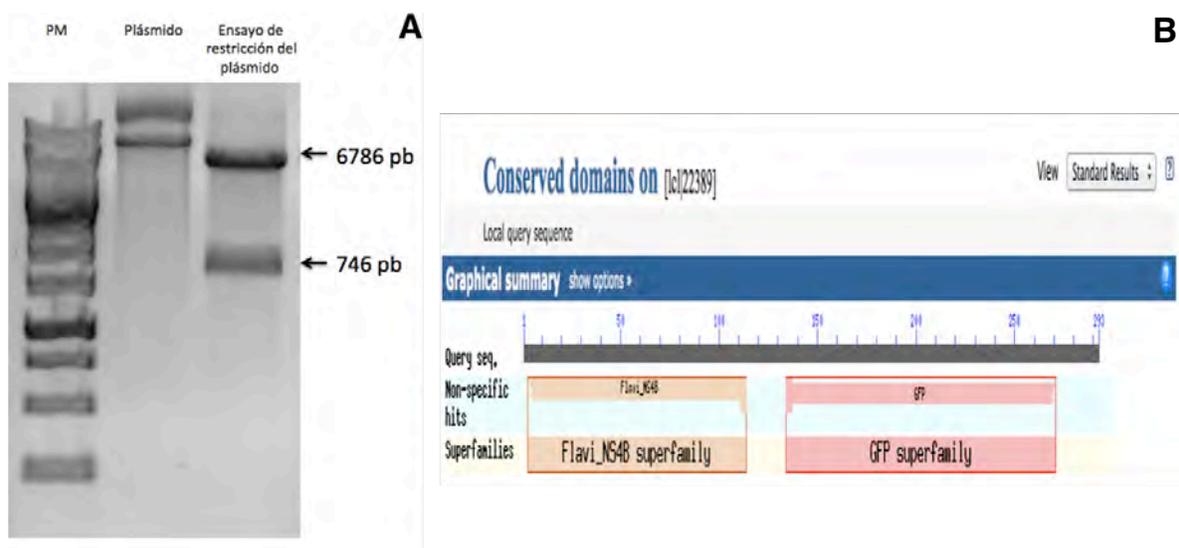


Figura 7. Restricción e identificación del plásmido Ac5 stable1-Blast donde fue clonado el gen la proteína NS4B del virus DENV2 A) Ensayo realizado con las enzimas KpnI y EcoRI 37°C 1 h. B) Imagen del Protein-Blast realizado al resultado de la secuenciación del plásmido subclonado.

Activación de la UPR en células que expresan el gen la proteína NS4B-DENV2. Para demostrar que la expresión de NS4B-DENV2 en células de insecto no afecta la activación de la UPR, estimulamos las clonas con TM y analizamos el splicing de XBP1 y la fosforilación de eIF2 α . La proteína NS4B-DENV2 es una proteína hidrofóbica de 247 aminoácidos asociada al RE. El plásmido NS4B-DENV2/GFP se transfectó en la línea celular cI.8+ de *Drosophila melanogaster*, el cultivo parenteral se sometió a diluciones progresivas con el antibiótico de resistencia, en este caso blasticidina. Posteriormente se realizó citometría de flujo y se seleccionaron y tomaron las clonas con mayor (H) y menor (L) expresión de la proteína NS4B-DENV2, utilizando como control aquellas sin transfección ó transfectadas con el plásmido sólo con GFP (Fig 8-A). Para validar el nivel de expresión de la proteína en las clonas previamente aisladas se realizó western blot utilizando como control aquellas que expresan la proteína GFP (G). Como se muestra en la Fig 8-B existe expresión diferencial de la proteína. El porcentaje de células que expresaron el transgen en las clonas estables fue del 70-80 % en la clona L y del 30-40% en la clona H, estos porcentajes fueron suficientes para observar una relación dosis-respuesta como se demuestra en lo siguientes experimentos.

Para validar la activación de la UPR tratamos las clonas con tunicamicina (TM), droga que afecta el plegamiento de las proteínas mediante la inhibición de la N-glicosilación. La figura 8-C muestra la activación del dominio de endoribonucleasa de IRE1 con el splicing de XBP1 en las clonas L y H, después del estímulo con TM a una dosis de 5ug/ml por 4 h. Por otro lado en la figura 8-D se muestra el western blot de la expresión de la proteína eIF2 α fosforilada proveniente de la activación del eje PERK y la expresión de la proteína

eIF2 α total. En la clona control (G) estimulada con TM se observa la fosforilación de eIF2 α , pero observamos una disminución de esta fosforilación en las L y H (Fig. 1-E). Con estos ensayos demostramos que nuestras clonas son sensibles a la activación de la UPR y que aquellas que expresan la proteína NS4B-DENV2, tienen una tendencia disminuir la respuesta proveniente del eje de PERK.

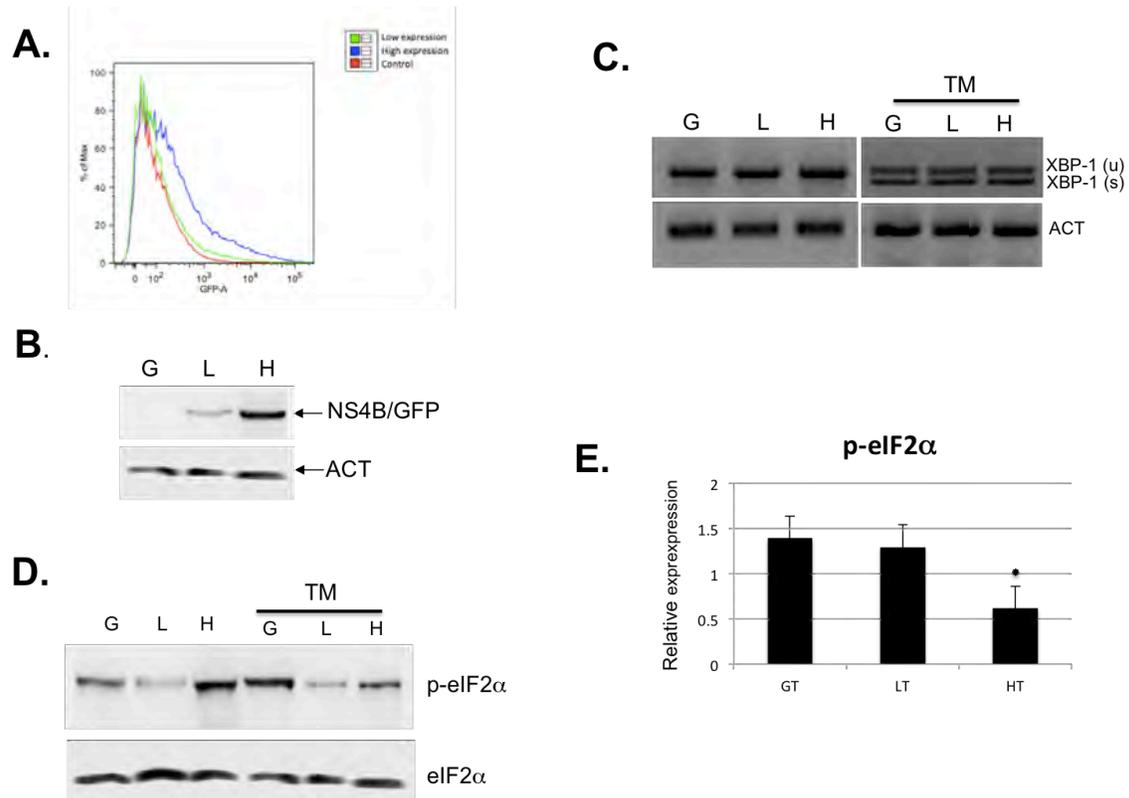


Figura 8. Activación de la UPR en las clonas que expresan la proteína NS4B-DENV2. **A)** Las células c1.8+ de *Drosophila* fueron transfectadas con el plásmido con GFP ó con el plásmido NS4B-DENV2GFP, posteriormente se seleccionaron y aislaron los células con mayor y menor expresión de la proteína. En **B)** se muestra el nivel de expresión mediante Western Blot con la actina como control. **C)** Las clonas G, L y H se tratadas con TM (5 μ g/ml) por 4 h y mediante PCR punto final medimos el splicing de XBP1 como un indicador de la activación de la UPR. **D)** Las clonas G, L y H fueron tratadas con TM a la misma dosis durante 4 h. Posteriormente realizamos un WB para p-eIF2 α y eIF2 α total. **E)** Expresión relativa de p-eIF2 α comparado con el total. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes de cada clona. Los asteriscos se refieren a una p<0.05 respecto a la clona G tratadas con TM.

La expresión de la proteína NS4B-DENV2 modula la activación transcripcional de la UPR. En los experimentos anteriores encontramos activación de la UPR en las clonas sometidas a estrés. Para comprobar si la expresión de la proteína NS4B-DENV2 en estas células puede inducir cambios a nivel transcripcional en genes dependientes de la UPR como BiP/GRP78, Edem y Ero1L, tratamos las clonas G, L y H con TM durante 8 o 24 h. A continuación mediante qRT-PCR medimos la expresión de los mRNA de proteínas que se activan para aliviar el estrés en el RE: BiP/GRP78 (ER chaperone which control the structural maturation of nascent glycoproteins), Edem y Ero1L (ER oxidoreductin-1 α). A las 8 h (Fig 9-A) de estímulo en la clona G la expresión de BiP/GRP78 presenta un aumento de 35 veces, mientras que la de Edem 4.5 veces y la de Ero1L 3.5 veces con respecto al control sin TM. En el caso de las clonas L y H que expresan la proteína NS4B-DENV2, como puede observarse existe un efecto concentración dependiente, ya que conforme aumenta su expresión disminuye la transcripción de estos marcadores de manera significativa. Suponiendo que la activación río debajo de estos efectores requería de mayor tiempo realizamos un análisis a las 24 h (Fig 9-B), y se encontró que la expresión de BiP/GRP78 e Edem disminuye a 12.5 y 1.5 veces con respecto a las G mientras que Ero1L se mantiene e incluso aumenta de manera significativa en la clona H. El comportamiento transcripcional de la respuesta de la UPR está estrechamente regulado, la transcripción tanto de BiP/GRP78 como de Edem puede resultar en la activación tanto de ATF6 como de XBP1, mientras que la de Ero1L es resultado de la activación casi exclusiva del eje de PERK. Estos resultados demuestran que la expresión de la proteína NS4B-DENV2, induce una regulación negativa en la expresión de BiP/GRP78 y Edem, pero no de Ero1L tanto a corto como a largo plazo.

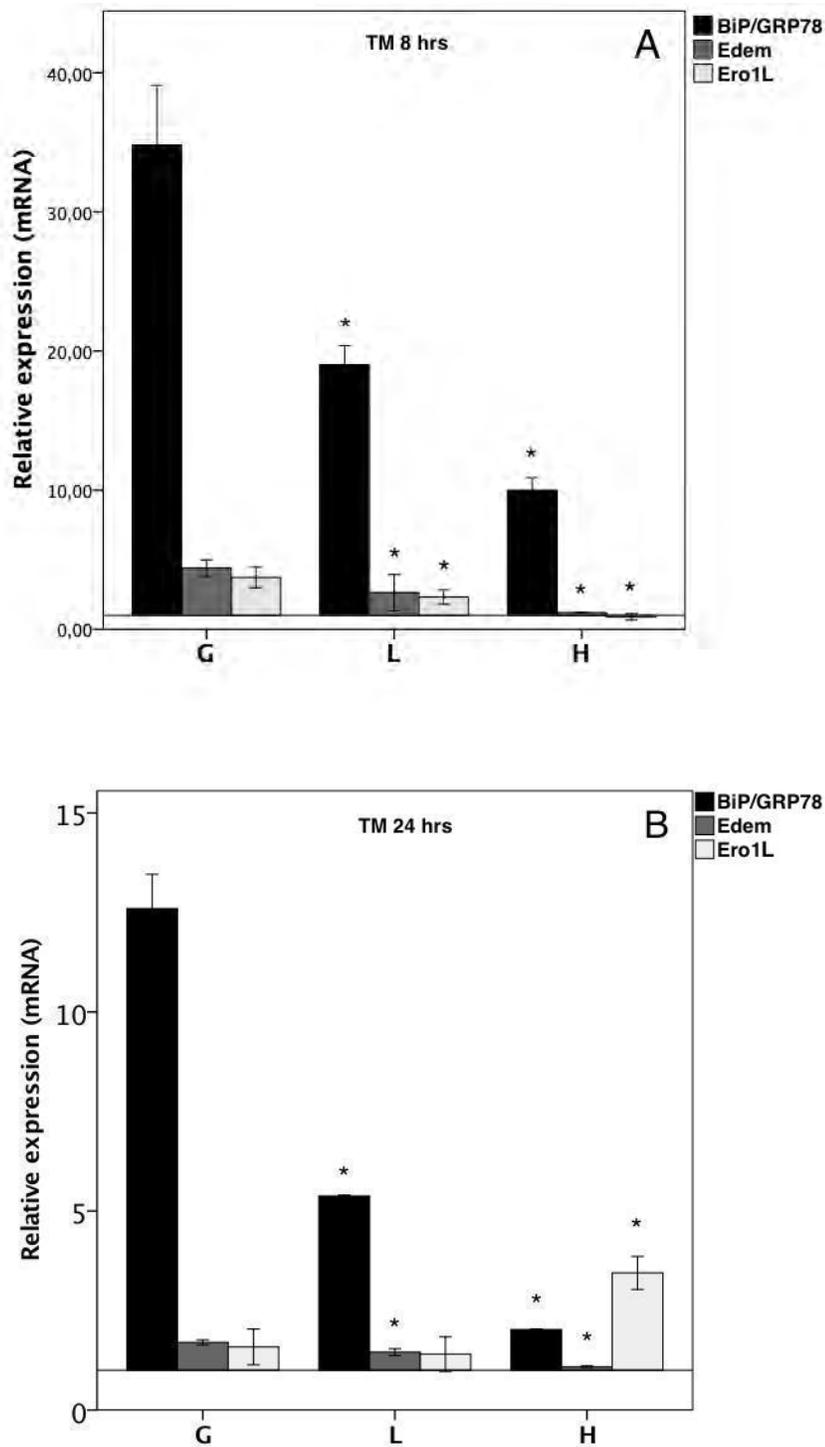
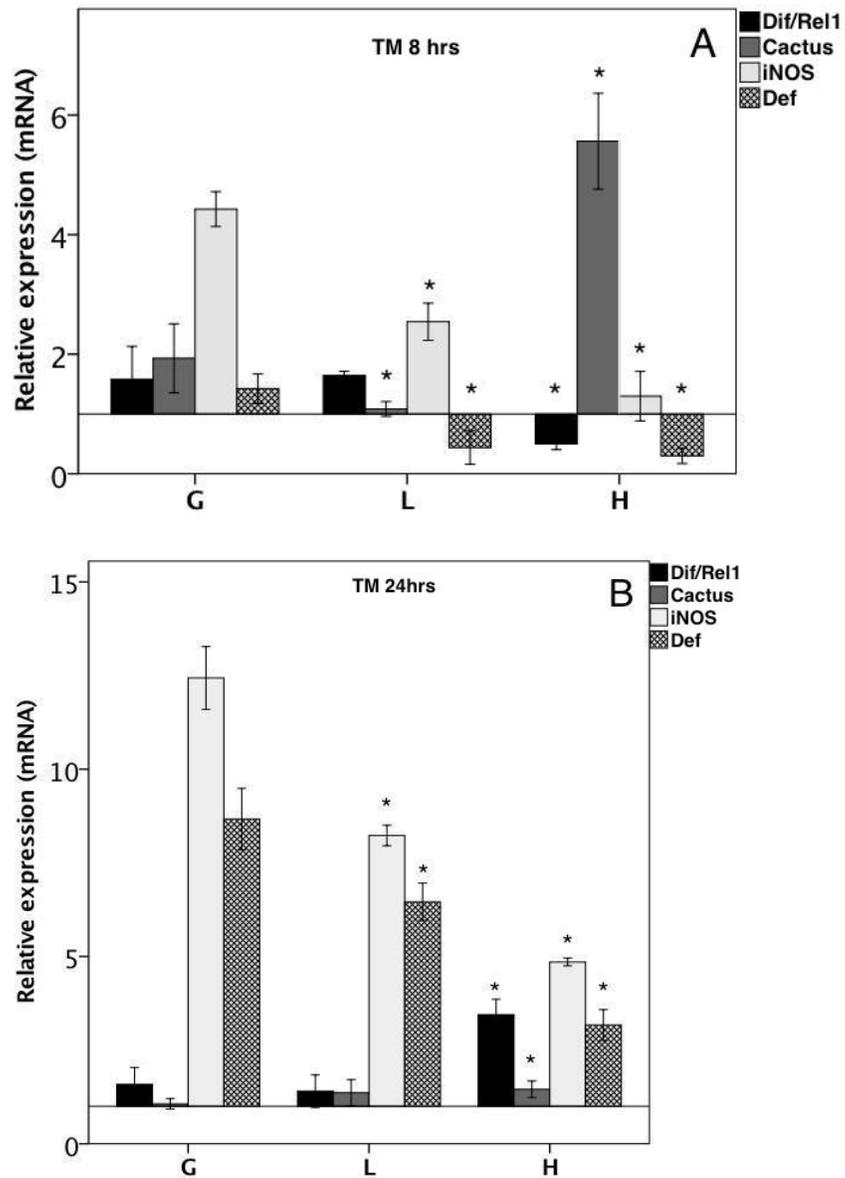


Figura 9. La expresión de NS4B-DENV2 modula la activación transcripcional de la UPR. Las clonas G, L, y H se trataron con TM (5µg/ml por 8 h (A) y 24 h (B) y mediante qRT-PCR se midieron los niveles de expresión de BiP/GRP78, Edem y Ero1L. Todos los resultados se muestran como expresión relativa de los genes blancos comparados con actina, usando como grupos de referencia las clonas G, L y H sin tratamiento. Los asteriscos se refieren a una $p < 0.05$ respecto a la clona G. Los datos representan 3 experimentos independientes.

La activación de la UPR genera transcripción de efectores inmunes modulados por la expresión de la proteína NS4B-DENV2. Existe evidencia que demuestran que la activación del eje de IRE1 activa a su vez a NF- κ B, un factor de transcripción que desencadena un estado pro-inflamatorio. Para determinar el efecto que la proteína NS4B-DENV2 tiene sobre la activación de efectores inmunes dependientes de la UPR a nivel transcripcional, se trataron las clonas con TM durante 8 y 24 h y se midieron los mensajeros de Dif/Rel1 (homólogo del factor de transcripción NF- κ B), Cactus (homólogo del regulador negativo de NF- κ B, I- κ B), iNOS (enzima capaz de catalizar el óxido nítrico) y defensina (familia de péptidos con actividad antimicrobiana). Como se muestra en la fig. 10-A a las 8 h del estímulo se encontró que la expresión de Dif/Rel1 se mantiene sin cambios, en el caso de Cactus existe un aumento significativo en la clona H, e iNOS aumenta 3.5 veces con respecto al control pero disminuye de manera significativa cuando aumenta la expresión de la proteína NS4B-DENV2, finalmente defensina presenta un comportamiento similar al de iNOS. Asumiendo que la inducción de estos efectores necesitara más tiempo hicimos una medición a las 24 h de estímulo (Fig 10-B). Después de 24 h de estímulo los resultados son diferentes en el nivel de expresión, la expresión de Dif/Rel1 se mantuvo sin cambios, Cactus tuvo una tendencia al aumento y defensina e iNOS tuvieron un aumento en su transcripción con respecto a las 8 h pero una disminución en su expresión en las clonas que expresan la proteína NS4B-DENV2. Para documentar la especificidad en la transcripción de éstos genes, estimulamos la clonas con PMA (phorbol myristate acetate) como un inductor de la respuesta inmune, pero más importante utilizamos PMA ya que es capaz de regular la vía de interferencia de RNA inhibiendo la formación de diversos complejos de micro RNA efectores. Como se muestra en la Fig 10-

C, se encontró una inducción diferencial con respecto a las estimuladas con TM. En conjunto estos resultados demuestran que la expresión de los efectores inmunes dependientes de la UPR aumenta de manera dependiente del tiempo, pero disminuyen de manera significativa cuando la proteína NS4B-DENV2 se expresa de manera estable en las células de insecto.



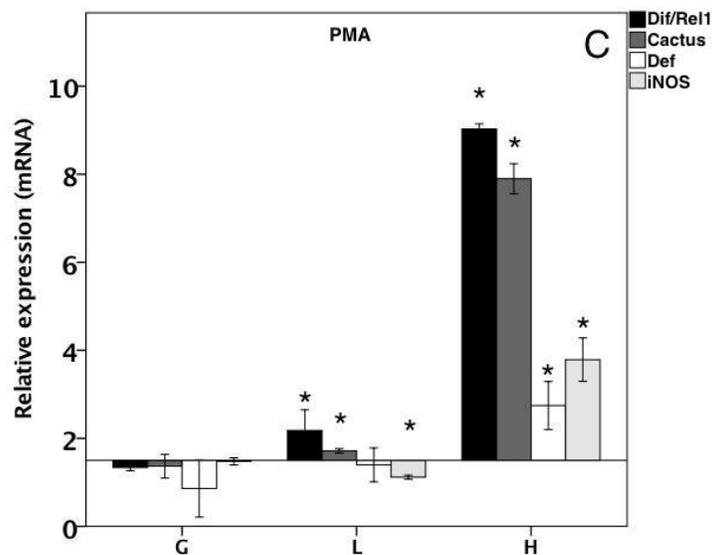


Figura 10. La expresión de NS4B-DENV2 modula la expresión de efectores inmunes dependientes de la UPR. Las clonas G, L y H fueron tratadas con TM (5µg/ml) por 8 h (A) y 24 h (B) y mediante qRT-PCR se midieron los niveles de expresión de Dif/Rel1, Cactus, iNOS y defensina. C) Las clonas fueron tratadas con PMA por 8 h. Los datos representan la media de 3 determinaciones independientes. Todos los resultados son expresados como expresión relativa de los genes blancos comparados con actina, usando como grupos de referencia las clonas G, L y H sin tratamiento. Los asteriscos se refieren a una $p < 0.05$.

La proteína NS4B-DENV2 disminuye la actividad antimicrobiana y la producción de Óxido Nítrico dependiente de la activación de la UPR. Al demostrar que la UPR activa el mensajero de defensina desde las 8 h, con un pico mayor a las 24 h caracterizamos la existencia de actividad antimicrobiana en el sobrenadante de las clonas después de 24 h de estímulo con TM. Por lo tanto se realizó un ensayo en el que medimos la viabilidad de la *E. Coli* en crecimiento después de incubarla con el sobrenadante de las células estimuladas. Como se muestra en la Fig. 11-A en la clona G estimulada con TM hay una disminución significativa en la viabilidad de las bacterias mientras que en las clonas L y H observamos el efecto contrario, un aumento en la actividad bacteriana. Estos datos demuestran que los resultados que muestran el aumento de la expresión del RNA mensajero de defensina después de 24 h de estímulo, son reproducibles en un ensayo funcional. Demostramos por

lo tanto que la expresión de NS4B-DENV2 disminuye la actividad antimicrobiana de las células estimuladas con TM.

Otro de los efectores que presenta un aumento importante a las 24 h es el RNA mensajero de iNOS, por lo tanto se esperaría un aumento en la producción de óxido nítrico (ON), así que se midió la concentración de nitritos y nitratos en el sobrenadante de las células estimuladas durante 24 h con TM (Fig. 11-B). En la clonas G hay un aumento significativo con respecto a las mismas células sin estimular, pero la expresión estable de NS4B-DENV2 en las clonas L y H disminuye la concentración de nitritos y nitratos en el sobrenadante de células de insecto. Al igual que con el ensayo de qRT-PCR para demostrar la especificidad del fenómeno utilizamos PMA y como podemos observar en la figura 11, las clonas estimuladas con PMA muestran un comportamiento diferente de aquellas derivadas de la estimulación con TM. Estos resultados demuestran que la expresión de la proteína NS4B-DENV2 inhibe la producción tanto de péptidos antimicrobianos como de ON, en el sobrenadante de células estimuladas con TM por lo tanto dependientes de la activación de la UPR. Y además nos sugieren que la acción de NS4B-DENV2 tiene su blanco corriente arriba de Cactus/Rel1.

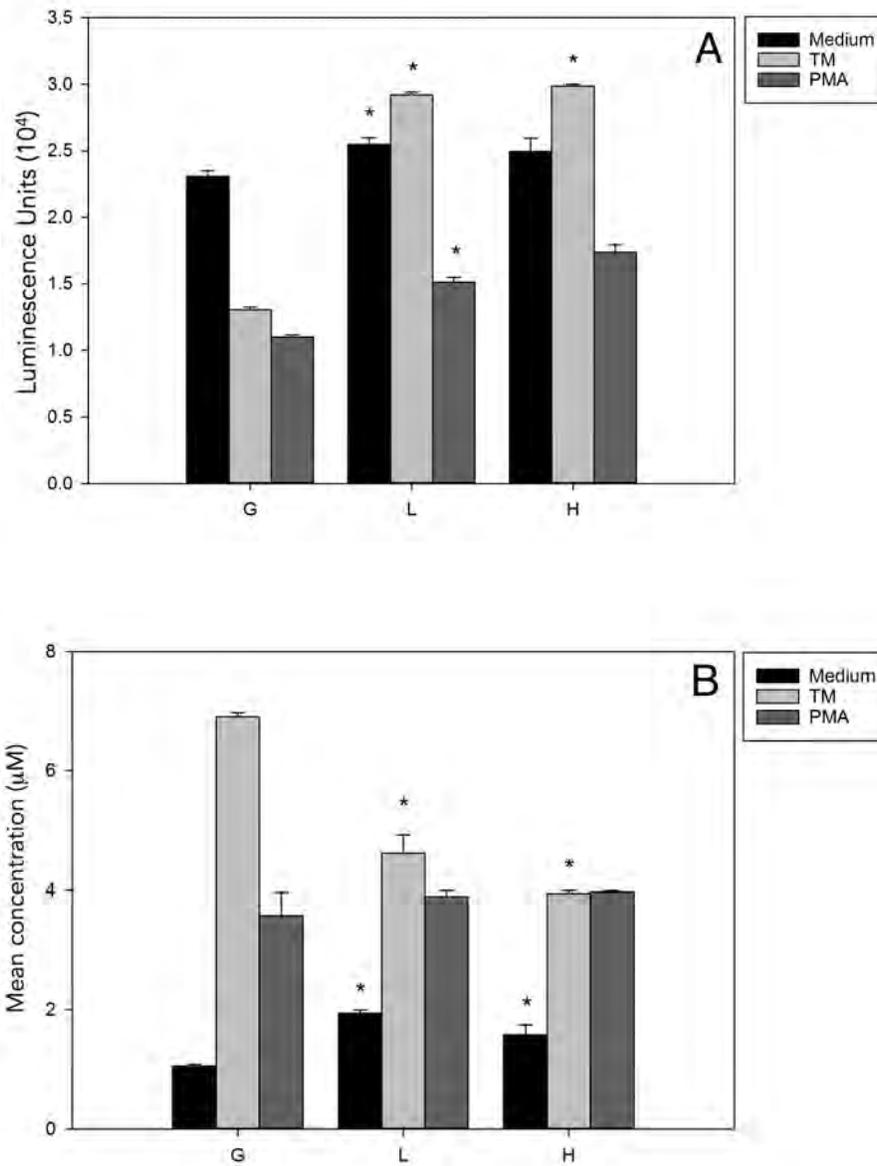


Figura 11. *La expresión estable de la proteína NS4B-DENV2 disminuye la producción de péptidos antimicrobianos y óxido nítrico dependiente de la UPR.* **A)** Las clonas G, L y H fueron tratadas con TM a la misma dosis por 24 h para demostrar la actividad antibacteriana en el sobrenadante, utilizamos el kit de Bac-Titer Glo, que determina la viabilidad bacteriana basada en la cuantificación de luminiscencia al medir la cantidad de ATP. **B)** Las clonas G, L y H fueron tratadas con TM por 24 h para determinar la producción de ON en el sobrenadante mediante el ensayo reacción de Griess. Los datos representan las medias de 3 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ comparadas con la clona G.

Efecto de la expresión de la proteína NS4B-DENV2 en la infección del virus Dengue y en la sobrevivencia en células de insecto sometidas a estrés de RE. Para evaluar la susceptibilidad o resistencia de las clonas previamente descritas a la infección con el DENV, se intentó infectar las clonas sin ningún tratamiento, sin que se encontrara infección en alguna. A continuación las clonas se trataron con TM por 8 h y se infectaron con DENV2. Sólo las células expresan la proteína NS4B-DENV2 y que además se estimularon se infectaron (Fig. 12-A). Una posible explicación del cambio de fenotipo celular de no susceptible a susceptible en las células que expresan la proteína NS4B-DENV2 podría ser que esta proteína evita la lisis de las células infectadas y con ello se incrementara la replicación viral a niveles detectables por el ensayo de RT-PCR que usamos; para probar lo anterior, se diseñó un experimento en el que simulamos el efecto de estrés causado por la infección con DENV exponiendo las células a TM que sabemos que induce UPR, seguida de la exposición a un inductor de apoptosis como el cisplatino a una concentración tal que indujera alrededor del 50% de apoptosis; así pues, como puede verse en la figura 12-B, la sola exposición a TM induce una disminución de la viabilidad en aproximadamente 17% en la clona G mientras que en la clona H no se detecto cambio apreciable en la viabilidad; cuando se expone a TM y cisplatino, el efecto de protección es aún mas claro, pues mientras que la clona G disminuyen en casi 96% la viabilidad, la clona L solo la disminuyen en un 50% y la clona H en aproximadamente un 30%.

Con estos experimentos demostramos que la expresión de la proteína NSB4-DENV2 y el estímulo con TM permiten la replicación viral y que las clonas que la expresan cuentan con cierta protección a la muerte celular comparada con aquellas que no la expresan.

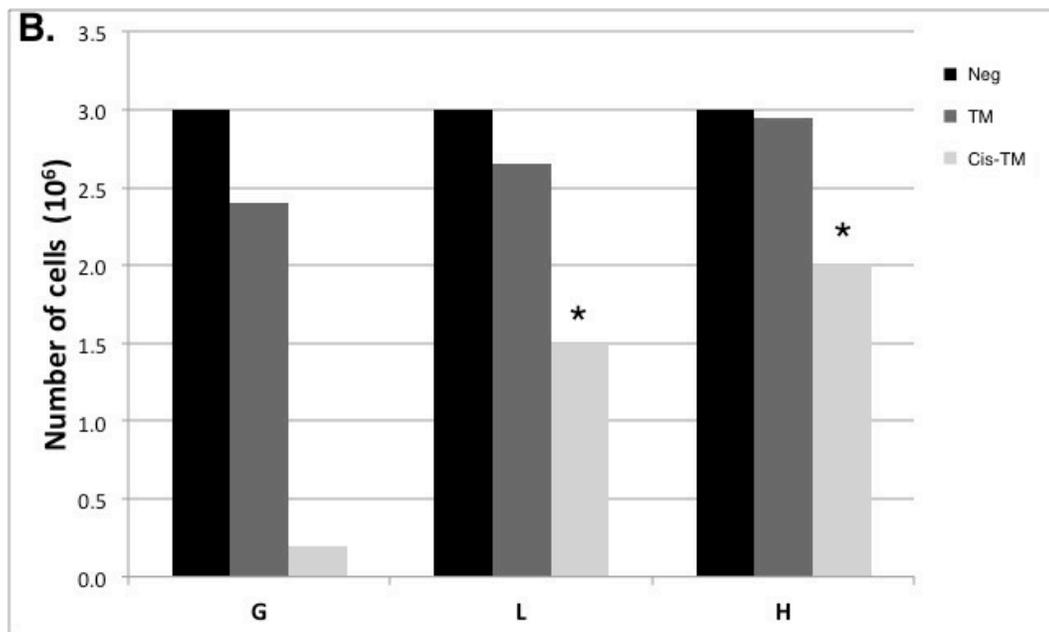
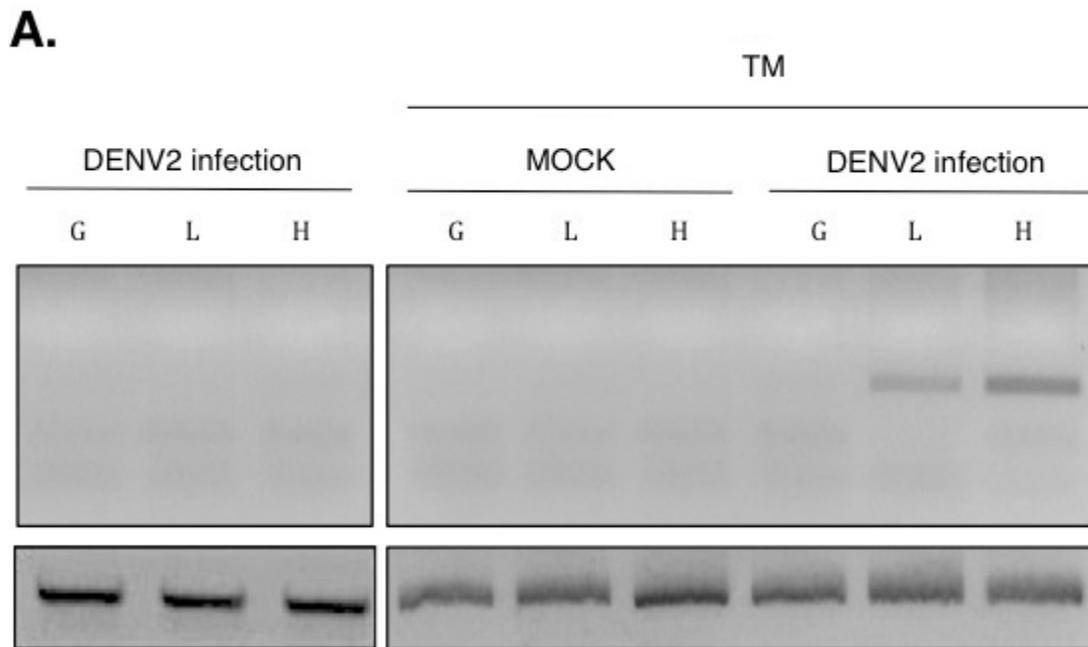
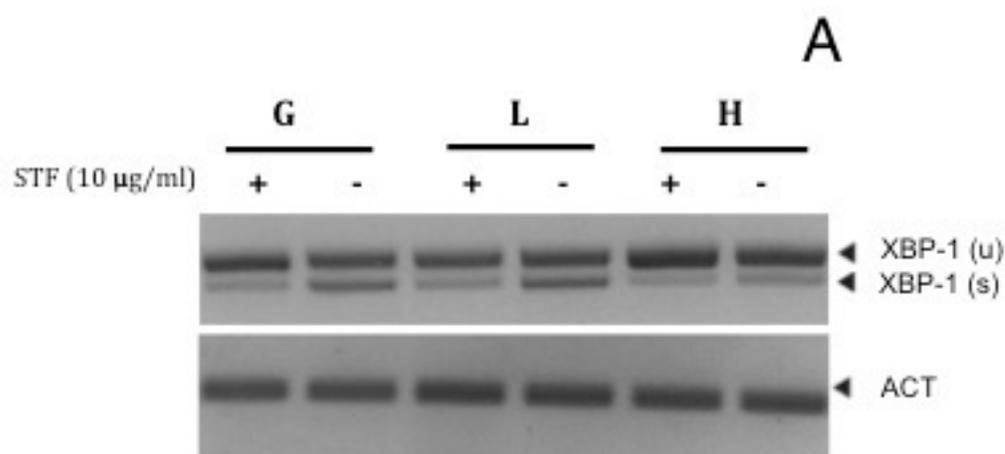


Figura 12. Efecto de la expresión de la proteína NS4B-DENV2 en la infección del mismo virus en las células de insecto bajo estrés de RE. **A)** Las clonas se sometieron a estrés de RE incubándolas con TM (5µg/ml) durante 12 h posteriormente fueron infectadas con DENV2 por 7 días, subsecuentemente fueron analizadas por un RT-PCR anidado para Flavivirus. **B)** Para demostrar la protección dada por la proteína NS4B-DENV2 las clonas se sometieron a la incubación con TM y posteriormente fueron tratadas con cisplatino y después de 3 h se midió la viabilidad celular. Los datos representan las medias de 3 determinaciones independientes. *p < 0.05 comparada con la clona G.

El splicing de XBP1 es principal regulador de la expresión de efectores inmune dependientes de la UPR en células de insecto. El eje IRE1/ XBP1 es el punto donde intersectan las respuestas metabólicas e innatas de la UPR. Para demostrarlo se utilizó STF080310, una droga encargada de bloquear la actividad de endoribonucleasa de IRE1, es decir específicamente bloquea el splicing de XBP1 sin afectar su función de cinasa. En la fig. 14 se muestra que cuando se trató las células con TM junto con el STF-080310 durante 8 h, el splicing de XBP1 disminuye de manera significativa (Fig. 13-A) y al medir la transcripción de genes de la UPR mediante qRT-PCR (Fig. 13-B) se observa una disminución significativa en la expresión de BiP/GRP78 y Edem, sin diferencias en Ero1L. Mientras que en la figura 13-C se muestra el resultado del qRT-PCR de los efectores inmunes, en donde se observa una disminución en la transcripción tanto de defensina como de iNOS en las clonas estimuladas con TM y STF08310. Estos resultados demuestran que el eje de IRE1 es el orquestador de la generación de expresión de efectores inmunes al activarse la UPR en células de insecto.



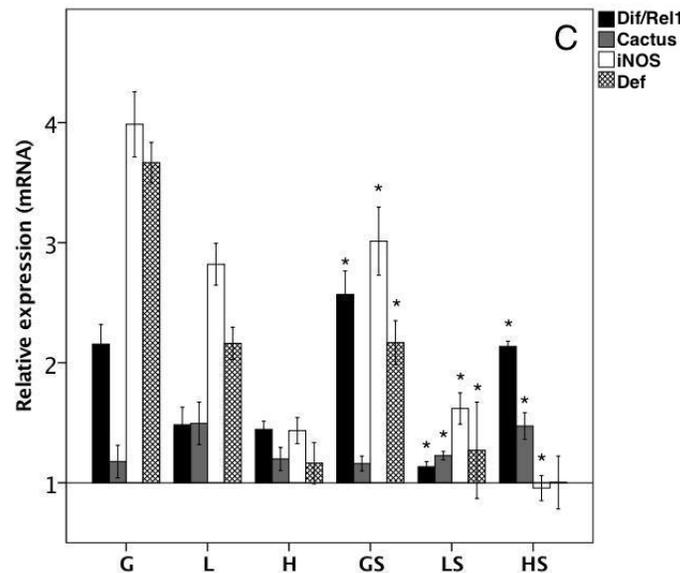
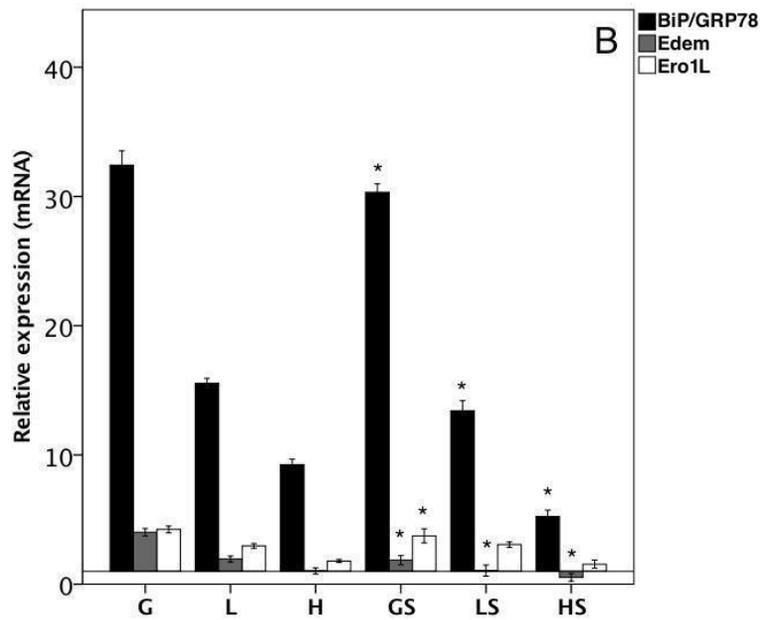
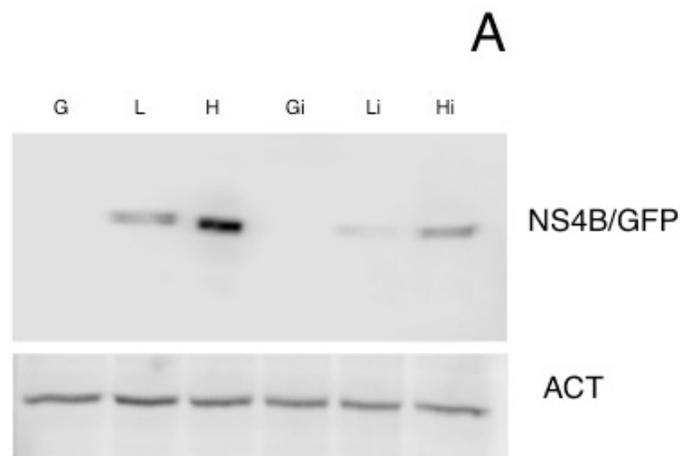
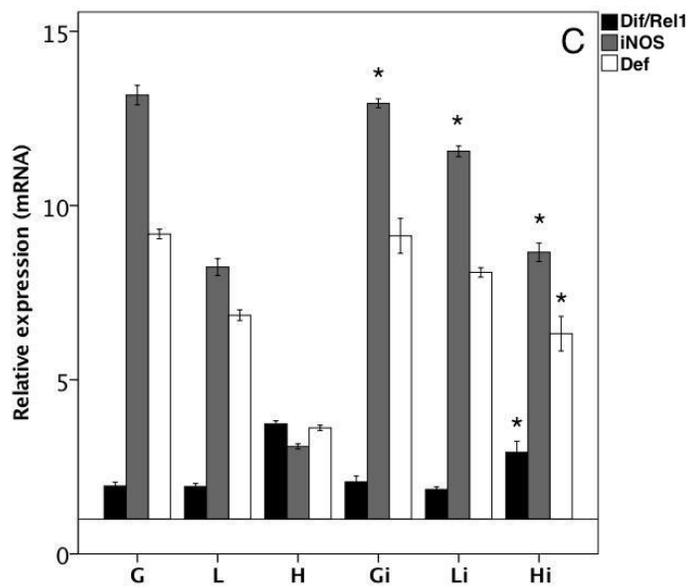
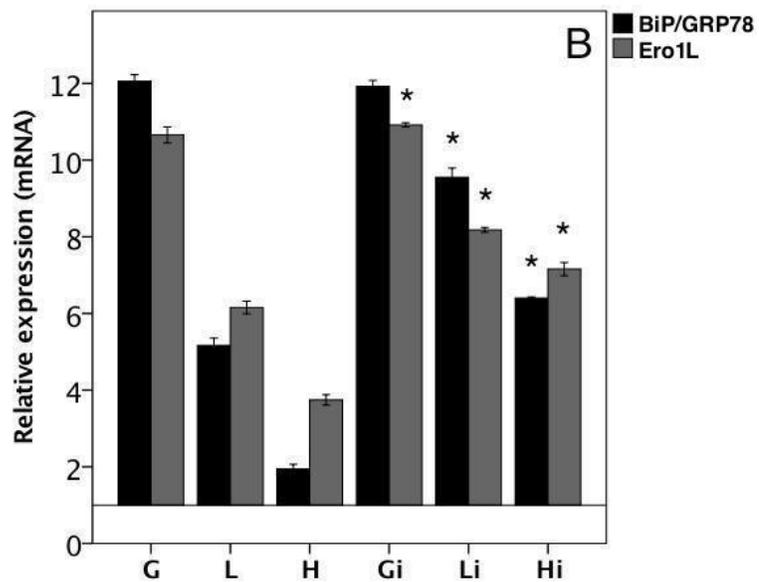


Figura 13. La actividad de RNasa de IRE1 es el regulador principal de la expresión de factores inmunes.

A) Las clonas G, L y H fueron incubadas con TM (5µg/ml) en ausencia o presencia de la droga STF083010 (GS,LS y HS) que inhibe la actividad de endoribonucleasa de IRE1 a una concentración de 30uM B) La expresión de moléculas efectoras de la UPR. C) Efectores inmunes dependientes de la UPR se determinaron cuantitativamente a través de qRT-PCR con la actina como gen estándar. Los datos representan la media de 3 determinaciones independientes. Todos los resultados son expresados como expresión relativa de los genes blancos comparados con actina. Los asteriscos se refieren a una $p < 0.05$ respecto a la clonas G, L y H tratadas sólo con TM.

El silenciamiento postranscripcional de NS4B-DENV2 recupera el fenotipo de los efectores inmunes dependientes de la UPR. Después de demostrar que la expresión de la proteína NS4B-DENV2 es capaz de regular la expresión de efectores inmunes derivados de la activación del eje IRE1/XBP1 se silenció la expresión de la proteína NS4B-DENV2 mediante dsRNA. En la figura 14-A se muestra el WB para medir la expresión de proteína NS4B-DENV2 después de 72 h de transfección del dsRNA en las clonas y se encontró una disminución significativa en su expresión. Posteriormente se midió mediante qRT-PCR algunos de los efectores previamente descritos, y se encontró que al estimular las clonas con TM, ambas recuperan de manera significativa la expresión de BiP/GRP78 y Ero1L al activar la UPR (Fig. 14-B), así como también recuperan la expresión de los efectores inmunes: iNOS y defensina (Fig. 14-C). Finalmente se midió la expresión de péptidos antimicrobianos y óxido nítrico en el sobrenadante de las células en las que se silenció la expresión de la proteína NS4B y encontró que se recuperan la expresión de ambos. Por lo tanto con estos resultados demuestran que la disminución en la expresión de efectores de la UPR depende de la expresión de la proteína NS4B-DENV2.





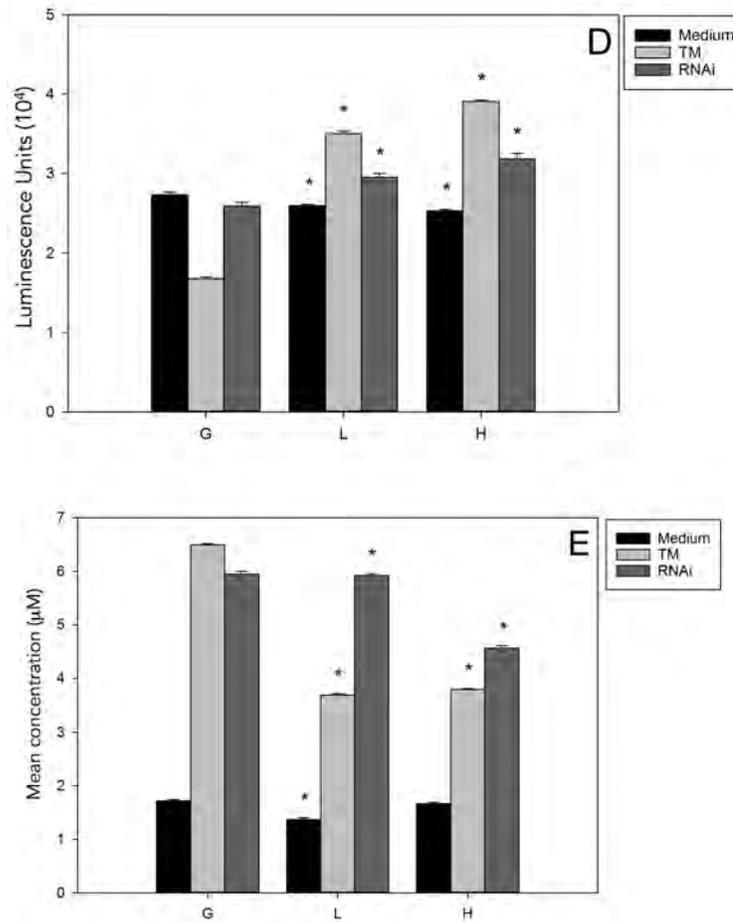


Figura 14. *El silenciamiento postranscripcional de la proteína NS4B-DENV2 recupera el fenotipo de efectores inmunes dependientes de la UPR.* Las clonas fueron transfectadas con el iRNA de NS4B-DENV2 (Gi, Li y Hi) y en **A**) se midió la expresión de la proteína mediante WB, se incubaron con TM durante 24 h posteriormente midió la expresión del RNAm BiP/GRP78 y Ero1L en **B**) y los efectores inmunes en **C**). Se usó el sobrenadante de las clonas silenciadas para medir la actividad antimicrobiana **D**) y finalmente se cuantificó la producción de nitritos y nitratos en **E**). Los datos representan la media de 3 determinaciones independientes. Todos los resultados son expresados como expresión relativa de los genes blancos comparados con actina. Los asteriscos se refieren a una $p < 0.05$ respecto a la clonas G, L y H tratadas sólo con TM.

DISCUSION

El estrés celular que impone la infección por un virus desencadena una serie de sistemas adaptativos que intentarán recuperar la homeostasis y que en el mejor de los casos logran eliminar el virus. La UPR es capaz de recuperar la homeostasis en el RE después de un insulto que genera estrés al interior del mismo, pero también genera un fenotipo pro-inflamatorio en las células capaz de protegerlas de agresiones que constituyen un reto celular diferente. Debido a la plasticidad de esta respuesta, la UPR se ha visto involucrado en enfermedades de tipo neurodegenerativas, metabólicas, y por supuesto del tipo infeccioso. La activación de la UPR secundaria a la infección y la modulación de la misma por las proteínas de los Flavivirus mantiene un balance entre mecanismos provirales y antivirales. Los principales mecanismos provirales son la inducción de la síntesis de membranas internas y la traducción preferencial de proteínas virales que hacen eficaz y potencian la replicación; mientras que los mecanismos antivirales son aquellos que activan la respuesta inmune y finalmente la muerte celular en caso de que la célula no logre adaptarse.

La UPR ayuda a mantener la proteostasis, gracias a una fina regulación transcripcional que se genera por la activación y señalización de sus proteínas sensoras. Algunos de los mecanismos que abordamos en este proyecto fueron, la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α que disminuye la traducción global, y la transcripción directa de proteínas como Edem, y Ero1L las cuales mantienen el ambiente redox y por lo tanto una actividad de plegamiento eficiente en el RE.

Por otro lado las proteínas virales son capaces de hacer más eficiente la replicación viral y de evadir la respuesta inmune de la célula hospedera mediante distintos mecanismos, que se han descubierto a lo largo de los últimos años. En este proyecto, aportamos pruebas que apoyan el papel de la proteína NS4B-DENV2 como un modulador no sólo de la respuesta inmune canónica, como son las vías de Toll, Jak-Stat y la vía de interferencia de RNA sino también de la inmunidad derivada de la activación de la UPR. En insectos específicamente, esta vía podría ser la responsable de la adaptación del mosquito a una infección persistente como la del DENV, que al utilizar el RE como sitio de replicación activa la UPR por la sobrecarga en el mismo.

Los virus pueden activar los diferentes ejes de la UPR a diferentes tiempos una vez establecida la infección, para anular la inhibición de la traducción, prevenir la apoptosis y prolongar el ciclo de vida del virus. El reporte de Peña y Harris demuestra que la infección DENV en células de mamífero activa el eje de PERK a partir de las 6 h pero después se inhibe, a 12 h de la infección se genera el splicing de XBP1 y en la última fase a partir de las 48 h se activa ATF6(Pena and Harris 2011). Nosotros demostramos que en células de insecto, se genera el splicing de XBP1 y la fosforilación de eIF2 α , desde las 4 h de tratamiento con TM. Y en las células que expresan la proteína NS4B, la fosforilación de eIF2 α disminuye, de la misma manera a como pasa con el virus Chikungunya (CHIKV) que induce la modulación de PERK retrasando la fosforilación de eIF2 α hasta después de 24 h. La expresión de la proteína NSP4-CHIKV (RNA-polimerasa dependiente de RNA), contribuyó a la supresión de la fosforilación de eIF2 α , garantizando así la traducción de proteínas víricas(Rathore, Ng et al. 2013).

Además, la expresión de la proteína NS4B-DENV2 puede regular de manera transcripcional el RNA mensajero de Edem y Ero1L. Al disminuir la transcripción de Edem, inhibe la degradación de proteínas virales, mientras que en el caso de Ero1 la inhibición de su transcripción resultaría en la disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno. En consecuencia, podemos inferir que el eje de IRE1 de la UPR se encuentra regulado de manera negativa, además de una modulación a la respuesta proveniente del eje PERK. En el contexto de la infección, este efecto parece beneficioso para la replicación viral porque inhibe la degradación de proteínas inducida por el estrés ER, se disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno y hace que las células sean más resistentes a la muerte, lo que resulta en una mayor replicación viral. Ambrose et al demostraron la manipulación de la señalización de la UPR por el virus West Nile (WNV) en células de mamíferos y sugirieron que la señalización de la UPR puede tener un efecto limitante sobre la replicación del WNV pero sólo en las primeras etapas de replicación cuando el nivel de componentes virales no es suficiente para ejercer efectos significativos sobre los efectores finales (Ambrose and Mackenzie 2011).

Además cada uno de los tres ejes de la UPR puede contribuir a la activación de Dif/Rel1, que regula la expresión de citocinas a través de diferentes mecanismos (Urano, Wang et al. 2000, Zhang, Shen et al. 2006, Smith, Turner et al. 2008, Hasnain, Lourie et al. 2012). Aquí, demostramos que en células de insecto al igual que en mamíferos la UPR entre 8 y 24 h es capaz de promover la transcripción de efectores inmunes como iNOS y defensina. Sin embargo, estas respuestas se atenuaron en células que expresan la proteína NS4B-DENV2, hasta que la proteína NF- κ B comenzó a aumentar (posiblemente como un mecanismo de

defensa de retroalimentación). Es necesario seguir investigando si la UPR es capaz de inducir efectores como Vago, una citocinas que podrían funcionar como el IFN-I en invertebrados y que se ha demostrado que en células de *Drosophila m* y del mosquito *Culex* son capaces de bloquear la replicación de los virus *Drosophila C* y West Nile, respectivamente (Deddouche, Matt et al. 2008, Paradkar, Duchemin et al. 2014).

El óxido nítrico es una molécula que tiene un importante papel como efector inmune, por su capacidad para modificar las proteínas virales con funciones críticas, en el caso de una infección con DENV2, el ON inhibe la replicación viral en la etapa de síntesis de novo del RNA viral por una disminución en la actividad de la replicasa viral (Neves-Souza, Azeredo et al. 2005, Takhampunya, Padmanabhan et al. 2006) Es este estudio demostramos la producción tanto de péptidos antimicrobianos como de ON en el sobrenadante de las células de insecto sometidas a estrés de RE, con una disminución en su expresión en presencia de la expresión de la proteína NS4B-DENV2. Estos hallazgos establecieron que la proteína NS4B-DENV2 podría modular el entrecruzamiento de las vías de señalización de la UPR con la respuesta inmune.

Estudios anteriores demuestran que en células eucariotas la proteína NS4B-DENV2, en el estado estacionario se encuentra localizada en el RE, con una pequeña fracción en la vía secretora y otra fracción en las uniones entre ER y mitocondrias donde pueden interferir con la formación de membranas complejas. Si bien nosotros no demostramos la localización de la proteína, análisis preliminares sugieren que en las células de insecto mantiene la misma localización en la vía secretora. La proteína NS4B-DENV2 además de bloquear la vía del IFN-I, también bloquea la vía de interferencia de RNA, en la que la

proteína NS4B-DENV2 actúa como un supresor inhibiendo directamente el procesamiento de Dicer(Kakumani, Ponia et al. 2013). Es interesante como en este estudio los autores sugieren que la proteína NS4B-DENV2 podría estar interactuando con algunos elementos de la vía para inhibirla y de esa manera potenciar la replicación.

El eje de IRE1, es el más conservado entre las especies y en algunos organismos es capaz de sobrellevar toda la carga y generar los cambios necesarios para regresar la homeostasis al RE. Al inhibir su actividad endoribonucleasa a través del inhibidor farmacológico STF083010, se generó una reducción significativa en la expresión de Ero1L, NF- κ B, iNOS y defensina, lo que nos demuestra la especificidad de la respuesta de estos efectores, pero al alterar los niveles de RNA mensajero de BiP/GRP78 y Edem de manera no significativa comprobamos que su expresión depende de una señalización alterna en células de insecto.

El papel de IRE1 en la activación del eje UPR-inmunidad y la existencia de la cavidad capaz de interactuar con distintas proteínas, nos lleva a especular que IRE1 podría interactuar con la proteína NS4B-DENV2 y, dependiendo de esta interacción y su estado de oligomerización, como en el mecanismo RIDD(Aragon, van Anken et al. 2009, Korennykh, Egea et al. 2009) inclinar la balanza hacia las respuestas pro-virales y modular la activación de PERK, que de lo contrario conduce a la muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, en lugar de tener a IRE1 y PERK trabajando en oposición, se sugiere que dependiendo de la magnitud del estrés detectado, IRE1 ó PERK se someten a una adaptación que promueve la homeostasis y no la muerte celular, dando lugar a una infección persistente, regulado directamente por la proteína NS4B.

Finalmente si la infección en estas células sólo se produce cuando se activa la UPR y además se expresa la proteína NS4B-DENV2, entonces existe una modulación por parte de la proteína NS4B-DENV2 del eje IRE1 de la UPR, que en las células de *Drosophila*, es responsable de la inducción de la mayoría de los genes blanco (Hollien, Lin et al. 2009). Esta modulación podría estar dada en la forma en que IRE1 se activa detectando la "cantidad de estrés" generada por la replicación del virus. De hecho, el equilibrio entre la actividad inmune y la UPR en el vector del virus y los mecanismos de evasión viral son un factor determinante en el mantenimiento de la infección persistente del virus. En conclusión, para los insectos que carecen de la respuesta antiviral elemental del interferón α/β , nuestros hallazgos confirman que la proteína NS4B-DENV2 desempeña un papel importante inhibiendo la respuesta inmune dependiente de la activación de la UPR, como en otras vías de señalización antiviral previamente descritas, lo que conduce a una mejora en la replicación del virus.

Este estudio se realizó en células de *D. melanogaster*, que no son el vector natural del virus. Sin embargo, Sessions et al validaron el uso de *Drosophila* como modelo de estudio para identificar la interacción dengue-huésped dipterana debido a la compleja dinámica espacio-temporal de la infección por DENV en el mosquito, ya que los mosquitos son genéticamente polimórficos y existe una variabilidad inherente en las infecciones con alimentación con sangre (Sessions, Barrows et al. 2009) (Sessions et al., 2009). Se necesitan más investigaciones para descubrir las interacciones que permiten a la proteína NS4B-DENV2 modular estas respuestas y realizar KO de los genes IRE1 y PERK en mosquitos vectores del virus para confirmar los resultados encontrados en este modelo. También es importante desarrollar más estudios para describir el papel de la UPR como una respuesta

adaptativa y de supervivencia en células de insectos que enfrentan un desafío viral que conduce a una infección persistente. Por todo lo anterior se acepta la hipótesis propuesta para este trabajo de investigación.

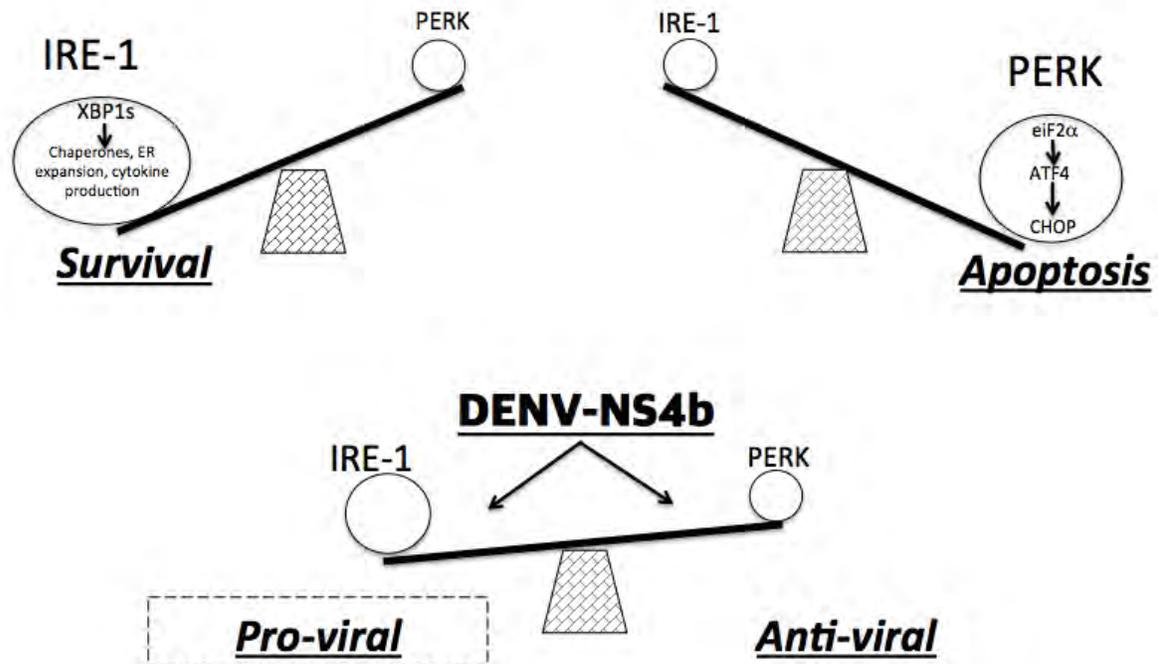


FIGURE 15. La proteína NS4B-DENV2 regula la expresión de los efectores dependientes de la activación de la UPR mediante una posible interacción con IRE1. La proteína NS4B-DENV2 como una de las proteínas con características provirales, está implicada en mecanismos que hacen que la replicación viral sea más eficiente, bloqueando varias de las vías de señalización inmune en mamíferos. Hemos planteado la hipótesis de que la proteína NS4B-DENV2 podría ser la reguladora de los dos ejes de la UPR en beneficio de la replicación del virus que permite por un lado la traducción de proteínas virales y el bloqueo de la muerte celular por apoptosis mediante la disminución de la vía PERK y por otro lado disminuir la activación de los efectores dependientes del splicing XBP1.

CONCLUSIONES

- Las células CME W1 cI.8+ de *Drosophila m* son susceptibles a la activación de la UPR mediante TM.
- En células de *Drosophila m* la inducción después del estrés de RE mediante TM genera la transcripción de efectores inmunes como iNOS y defensina.
- Al igual que en los mamíferos la proteína NS4B-DENV2 es capaz de modular una de las vías de adaptación que la célula tiene ante una infección con *Flavivirus* facilitando de esta manera la replicación viral .
- El eje IRE1 de la UPR es el orquestador principal del entrecruzamiento entre la UPR y la respuesta inmune.

PERSPECTIVAS

- Inmunolocalización de la proteína expresada de manera estable en las clonas L y H con marcadores de compartimentos celulares como RE, Golgi y mitocondria.
- EMSA de los factores de transcripción ATF4 Y ATF6 como parte de la activación de la UPR en estas células.
- Uso de la técnica de FRET para corroborar la interacción entre IRE1 y la proteína NS4B-DENV2.
- KO de IRE1 y PERK en mosquitos *Ae. aegypti* para corroborar los resultados en este modelo y conocer el comportamiento de la UPR en el vector natural del virus.

REFERENCIAS

- (2009). Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva.
- Ambrose, R. L. and J. M. Mackenzie (2011). "West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion." J Virol **85**(6): 2723-2732.
- Aragon, T., E. van Anken, D. Pincus, I. M. Serafimova, A. V. Korennykh, C. A. Rubio and P. Walter (2009). "Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites." Nature **457**(7230): 736-740.
- Bedoya-Perez, L. P., A. Cancino-Rodezno, B. Flores-Escobar, M. Soberon and A. Bravo (2013). "Role of UPR pathway in defense response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*." Int J Mol Sci **14**(4): 8467-8478.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.
- Bork, P. and C. Sander (1993). "A hybrid protein kinase-RNase in an interferon-induced pathway?" FEBS Lett **334**(2): 149-152.
- 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." J Virol **66**(3): 1535-1542.
- Carballar-Lejarazu, R., M. H. Rodriguez, F. de la Cruz Hernandez-Hernandez, J. Ramos-Castaneda, L. D. Possani, M. Zurita-Ortega, E. Reynaud-Garza, R. Hernandez-Rivas, T. Loukeris, G. Lycett and H. Lanz-Mendoza (2008). "Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens." Cell Mol Life Sci **65**(19): 3081-3092.
- Casagrande, R., P. Stern, M. Diehn, C. Shamu, M. Osario, M. Zuniga, P. O. Brown and H. Ploegh (2000). "Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway." Mol Cell **5**(4): 729-735.

Cherbas, L. (January 29, 2016). "Additions to Tissue Culture Medium." Retrieved Protocol, from https://dgrc.bio.indiana.edu/include/file/additions_to_medium.pdf.

Cnop, M., F. Foufelle and L. A. Velloso (2012). "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes." Trends Mol Med **18**(1): 59-68.

Cox, J. S., C. E. Shamu and P. Walter (1993). "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." Cell **73**(6): 1197-1206.

Cox, J. S. and P. Walter (1996). "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response." Cell **87**(3): 391-404.

Credle, J. J., J. S. Finer-Moore, F. R. Papa, R. M. Stroud and P. Walter (2005). "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18773-18784.

Cui, W., J. Li, D. Ron and B. Sha (2011). "The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 5): 423-428.

Deddouche, S., N. Matt, A. Budd, S. Mueller, C. Kemp, D. Galiana-Arnoux, C. Dostert, C. Antoniewski, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2008). "The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila." Nat Immunol **9**(12): 1425-1432.

Deng, J., P. D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R. J. Kaufman, N. Sonenberg, H. P. Harding and D. Ron (2004). "Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2." Mol Cell Biol **24**(23): 10161-10168.

Dey, M., C. Cao, F. Sicheri and T. E. Dever (2007). "Conserved intermolecular salt bridge required for activation of protein kinases PKR, GCN2, and PERK." J Biol Chem **282**(9): 6653-6660.

Dong, B., M. Niwa, P. Walter and R. H. Silverman (2001). "Basis for regulated RNA cleavage by functional analysis of RNase L and Ire1p." RNA **7**(3): 361-373.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.

- Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein and T. Sommer (2000). "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(7): 379-384.
- Gaines, P. J., K. E. Olson, S. Higgs, A. M. Powers, B. J. Beaty and C. D. Blair (1996). "Pathogen-derived resistance to dengue type 2 virus in mosquito cells by expression of the premembrane coding region of the viral genome." J Virol **70**(4): 2132-2137.
- Gardner, B. M. and P. Walter (2011). "Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response." Science **333**(6051): 1891-1894.
- Gillespie, L. K., A. Hoenen, G. Morgan and J. M. Mackenzie (2010). "The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex." J Virol **84**(20): 10438-10447.
- Goldshmidt, H., D. Matas, A. Kabi, S. Carmi, R. Hope and S. Michaeli (2010). "Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*." PLoS Pathog **6**(1): e1000731.
- Gosline, S. J., M. Nascimento, L. I. McCall, D. Zilberstein, D. Y. Thomas, G. Matlashewski and M. Hallett (2011). "Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response." PLoS One **6**(4): e19118.
- Gotoh, T., M. Endo and Y. Oike (2011). "Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases." Int J Inflam **2011**: 259462.
- Grant, D., G. K. Tan, M. Qing, J. K. Ng, A. Yip, G. Zou, X. Xie, Z. Yuan, M. J. Schreiber, W. Schul, P. Y. Shi and S. Alonso (2011). "A single amino acid in nonstructural protein NS4B confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis." J Virol **85**(15): 7775-7787.
- Green, A. M., P. R. Beatty, A. Hadjilaou and E. Harris (2014). "Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses." J Mol Biol **426**(6): 1148-1160.
- Grief, C., R. Galler, L. M. Cortes and O. M. Barth (1997). "Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation." Arch Virol **142**(12): 2347-2357.
- Hanley, K. A., L. R. Manlucu, L. E. Gilmore, J. E. Blaney, Jr., C. T. Hanson, B. R. Murphy and S. S. Whitehead (2003). "A trade-off in replication in mosquito versus mammalian

systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4." Virology **312**(1): 222-232.

Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-1108.

Harding, H. P., Y. Zhang and D. Ron (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-274.

Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-633.

Hasnain, S. Z., R. Lourie, I. Das, A. C. Chen and M. A. McGuckin (2012). "The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation." Immunol Cell Biol **90**(3): 260-270.

Hetz, C. and L. H. Glimcher (2009). "Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome." Mol Cell **35**(5): 551-561.

Hetz, C., F. Martinon, D. Rodriguez and L. H. Glimcher (2011). "The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha." Physiol Rev **91**(4): 1219-1243.

Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-1318.

Hollien, J., J. H. Lin, H. Li, N. Stevens, P. Walter and J. S. Weissman (2009). "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells." J Cell Biol **186**(3): 323-331.

Hollien, J. and J. S. Weissman (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response." Science **313**(5783): 104-107.

Hong, M., S. Luo, P. Baumeister, J. M. Huang, R. K. Gogia, M. Li and A. S. Lee (2004). "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response." J Biol Chem **279**(12): 11354-11363.

Hsieh, S. C., W. Y. Tsai and W. K. Wang (2010). "The length of and nonhydrophobic residues in the transmembrane domain of dengue virus envelope protein are critical for its retention and assembly in the endoplasmic reticulum." J Virol **84**(9): 4782-4797.

Hurtley, S. M. and A. Helenius (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Cell Biol **5**: 277-307.

Ip, Y. T., M. Reach, Y. Engstrom, L. Kadalayil, H. Cai, S. Gonzalez-Crespo, K. Tatei and M. Levine (1993). "Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*." Cell **75**(4): 753-763.

Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-267.

Isaacs, A., J. Lindenmann and R. C. Valentine (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 268-273.

Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H. P. Harding, X. Wang, D. Ron, D. R. Cavener and R. C. Wek (2004). "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response." Mol Cell Biol **24**(3): 1365-1377.

Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. R. Cavener and R. C. Wek (2003). "Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses." Mol Cell Biol **23**(16): 5651-5663.

Junjhon, J., J. G. Pennington, T. J. Edwards, R. Perera, J. Lanman and R. J. Kuhn (2014). "Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells." J Virol **88**(9): 4687-4697.

Kakumani, P. K., S. S. Ponia, R. K. S, V. Sood, M. Chinnappan, A. C. Banerjea, G. R. Medigeshi, P. Malhotra, S. K. Mukherjee and R. K. Bhatnagar (2013). "Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor." J Virol **87**(16): 8870-8883.

Kaufman, R. J. (2002). "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." J Clin Invest **110**(10): 1389-1398.

Kaufusi, P. H., J. F. Kelley, R. Yanagihara and V. R. Nerurkar (2014). "Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B." PLoS One **9**(1): e84040.

- Ke, P. Y. and S. S. Chen (2011). "Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro." J Clin Invest **121**(1): 37-56.
- Kelley, J. F., P. H. Kaufusi, E. M. Volper and V. R. Nerurkar (2011). "Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines." Virology **418**(1): 27-39.
- Kelly, E. P., B. Puri, W. Sun and B. Falgout (2010). "Identification of mutations in a candidate dengue 4 vaccine strain 341750 PDK20 and construction of a full-length cDNA clone of the PDK20 vaccine candidate." Vaccine **28**(17): 3030-3037.
- Kolattukudy, P. E. and J. Niu (2012). "Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway." Circ Res **110**(1): 174-189.
- Korenykh, A. V., P. F. Egea, A. A. Korostelev, J. Finer-Moore, C. Zhang, K. M. Shokat, R. M. Stroud and P. Walter (2009). "The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1." Nature **457**(7230): 687-693.
- Li, H., W. X. Li and S. W. Ding (2002). "Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus." Science **296**(5571): 1319-1321.
- Li, S., L. Kong and X. Yu (2015). "The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis." Crit Rev Microbiol **41**(2): 150-164.
- Luplertlop, N., P. Surasombatpattana, S. Patramool, E. Dumas, L. Wasinpiyamongkol, L. Saune, R. Hamel, E. Bernard, D. Sereno, F. Thomas, D. Piquemal, H. Yssel, L. Briant and D. Misse (2011). "Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus." PLoS Pathog **7**(1): e1001252.
- Ma, Y., J. W. Brewer, J. A. Diehl and L. M. Hendershot (2002). "Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response." J Mol Biol **318**(5): 1351-1365.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "ER chaperone functions during normal and stress conditions." J Chem Neuroanat **28**(1-2): 51-65.

Maguire, J. A., S. Mulugeta and M. F. Beers (2011). "Endoplasmic reticulum stress induced by surfactant protein C BRICHOS mutants promotes proinflammatory signaling by epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **44**(3): 404-414.

Marchette, N. J., S. B. Halstead, W. A. Falkler, Jr., A. Stenhouse and D. Nash (1973). "Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections." J Infect Dis **128**(1): 23-30.

Marciniak, S. J., L. Garcia-Bonilla, J. Hu, H. P. Harding and D. Ron (2006). "Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK." J Cell Biol **172**(2): 201-209.

Martino, F., X. Chen, A. H. Lee and L. H. Glimcher (2010). "TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages." Nat Immunol **11**(5): 411-418.

Miller, S., S. Sparacio and R. Bartenschlager (2006). "Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B." J Biol Chem **281**(13): 8854-8863.

Munoz-Jordan, J. L., M. Laurent-Rolle, J. Ashour, L. Martinez-Sobrido, M. Ashok, W. I. Lipkin and A. Garcia-Sastre (2005). "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses." J Virol **79**(13): 8004-8013.

Nakajima, S., N. Hiramatsu, K. Hayakawa, Y. Saito, H. Kato, T. Huang, J. Yao, A. W. Paton, J. C. Paton and M. Kitamura (2011). "Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF-kappaB through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBPbeta and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt." Mol Cell Biol **31**(8): 1710-1718.

Nallagatla, S. R., R. Toroney and P. C. Bevilacqua (2011). "Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR." Curr Opin Struct Biol **21**(1): 119-127.

Nemesio, H., F. Palomares-Jerez and J. Villalain (2012). "NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions." Biochim Biophys Acta **1818**(11): 2818-2830.

Netherton, C., K. Moffat, E. Brooks and T. Wileman (2007). "A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication." Adv Virus Res **70**: 101-182.

Neves-Souza, P. C., E. L. Azeredo, S. M. Zagne, R. Valls-de-Souza, S. R. Reis, D. I. Cerqueira, R. M. Nogueira and C. F. Kubelka (2005). "Inducible nitric oxide synthase

(iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection." BMC Infect Dis **5**: 64.

Nikawa, J. and S. Yamashita (1992). "IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **6**(11): 1441-1446.

Nixon-Abell, J., C. J. Obara, A. V. Weigel, D. Li, W. R. Legant, C. S. Xu, H. A. Pasolli, K. Harvey, H. F. Hess, E. Betzig, C. Blackstone and J. Lippincott-Schwartz (2016). "Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER." Science **354**(6311).

Novoa, R. R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fontana, H. Granzow and C. Risco (2005). "Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis." Biol Cell **97**(2): 147-172.

Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi and K. Mori (2002). "Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response." Biochem J **366**(Pt 2): 585-594.

Okamura, K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru and K. Kohno (2000). "Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 445-450.

Olson, K. E., S. Higgs, P. J. Gaines, A. M. Powers, B. S. Davis, K. I. Kamrud, J. O. Carlson, C. D. Blair and B. J. Beaty (1996). "Genetically engineered resistance to dengue-2 virus transmission in mosquitoes." Science **272**(5263): 884-886.

Pan, X., G. Zhou, J. Wu, G. Bian, P. Lu, A. S. Raikhel and Z. Xi (2012). "Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(1): E23-31.

Paradkar, P. N., J. B. Duchemin, R. Voysey and P. J. Walker (2014). "Dicer-2-dependent activation of *Culex Vago* occurs via the TRAF-Rel2 signaling pathway." PLoS Negl Trop Dis **8**(4): e2823.

Paradkar, P. N., L. Trinidad, R. Voysey, J. B. Duchemin and P. J. Walker (2012). "Secreted *Vago* restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(46): 18915-18920.

Paul, D. and R. Bartenschlager (2013). "Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories." World J Virol **2**(2): 32-48.

Pena, J. and E. Harris (2011). "Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner." J Biol Chem **286**(16): 14226-14236.

Pincus, D., M. W. Chevalier, T. Aragon, E. van Anken, S. E. Vidal, H. El-Samad and P. Walter (2010). "BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response." PLoS Biol **8**(7): e1000415.

Ramos-Castaneda, J., C. Gonzalez, M. A. Jimenez, J. Duran, S. Hernandez-Martinez, M. H. Rodriguez and H. Lanz-Mendoza (2008). "Effect of nitric oxide on Dengue virus replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*." Intervirology **51**(5): 335-341.

Rathore, A. P., M. L. Ng and S. G. Vasudevan (2013). "Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2alpha phosphorylation." Virol J **10**: 36.

Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravalles, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt and L. H. Glimcher (2001). "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1." Nature **412**(6844): 300-307.

Richardson, C. E., T. Kooistra and D. H. Kim (2010). "An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*." Nature **463**(7284): 1092-1095.

Ron, D. and S. R. Hubbard (2008). "How IRE1 reacts to ER stress." Cell **132**(1): 24-26.

Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.

Rutkowski, D. T., S. M. Arnold, C. N. Miller, J. Wu, J. Li, K. M. Gunnison, K. Mori, A. A. Sadighi Akha, D. Raden and R. J. Kaufman (2006). "Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins." PLoS Biol **4**(11): e374.

Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2004). "A trip to the ER: coping with stress." Trends Cell Biol **14**(1): 20-28.

Salazar, M. I., J. H. Richardson, I. Sanchez-Vargas, K. E. Olson and B. J. Beaty (2007). "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes." BMC Microbiol **7**: 9.

Sanchez-Vargas, I., J. C. Scott, B. K. Poole-Smith, A. W. Franz, V. Barbosa-Solomieu, J. Wilusz, K. E. Olson and C. D. Blair (2009). "Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway." PLoS Pathog **5**(2): e1000299.

Saura, M., C. Zaragoza, A. McMillan, R. A. Quick, C. Hohenadl, J. M. Lowenstein and C. J. Lowenstein (1999). "An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease." Immunity **10**(1): 21-28.

Sessions, O. M., N. J. Barrows, J. A. Souza-Neto, T. J. Robinson, C. L. Hershey, M. A. Rodgers, J. L. Ramirez, G. Dimopoulos, P. L. Yang, J. L. Pearson and M. A. Garcia-Blanco (2009). "Discovery of insect and human dengue virus host factors." Nature **458**(7241): 1047-1050.

Shen, J., X. Chen, L. Hendershot and R. Prywes (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell **3**(1): 99-111.

Shen, X., R. E. Ellis, K. Sakaki and R. J. Kaufman (2005). "Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*." PLoS Genet **1**(3): e37.

Shih, K. M., A. Gerenday and A. M. Fallon (1998). "Culture of mosquito cells in Eagle's medium." In Vitro Cell Dev Biol Anim **34**(8): 629-630.

Sim, S. and G. Dimopoulos (2010). "Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells." PLoS One **5**(5): e10678.

Smith, J. A., M. J. Turner, M. L. DeLay, E. I. Klenk, D. P. Sowders and R. A. Colbert (2008). "Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein 1." Eur J Immunol **38**(5): 1194-1203.

Souza-Neto, J. A., S. Sim and G. Dimopoulos (2009). "An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17841-17846.

St John, A. L., S. N. Abraham and D. J. Gubler (2013). "Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis." Nat Rev Microbiol **11**(6): 420-426.

Stevens, F. J. and Y. Argon (1999). "Protein folding in the ER." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 443-454.

Takhampunya, R., R. Padmanabhan and S. Ubol (2006). "Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication." J Gen Virol **87**(Pt 10): 3003-3011.

Tam, A. B., A. C. Koong and M. Niwa (2014). "Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD." Cell Rep **9**(3): 850-858.

Tam, A. B., E. L. Mercado, A. Hoffmann and M. Niwa (2012). "ER stress activates NF-kappaB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK." PLoS One **7**(10): e45078.

Tirasophon, W., K. Lee, B. Callaghan, A. Welihinda and R. J. Kaufman (2000). "The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response." Genes Dev **14**(21): 2725-2736.

Tirasophon, W., A. A. Welihinda and R. J. Kaufman (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." Genes Dev **12**(12): 1812-1824.

Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman and P. Walter (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." Cell **101**(3): 249-258.

Umareddy, I., A. Chao, A. Sampath, F. Gu and S. G. Vasudevan (2006). "Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA." J Gen Virol **87**(Pt 9): 2605-2614.

Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**(5453): 664-666.

Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R. J. Kaufman and R. Prywes (2000). "Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response." J Biol Chem **275**(35): 27013-27020.

Welsch, S., S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. Bleck, P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager (2009). "Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites." Cell Host Microbe **5**(4): 365-375.

Westaway, E. G., A. A. Khromykh, M. T. Kenney, J. M. Mackenzie and M. K. Jones (1997). "Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus." *Virology* **234**(1): 31-41.

Wickner, S., M. R. Maurizi and S. Gottesman (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* **286**(5446): 1888-1893.

Wilder-Smith, A., K. E. Renhorn, H. Tissera, S. Abu Bakar, L. Alphey, P. Kittayapong, S. Lindsay, J. Logan, C. Hatz, P. Reiter, J. Rocklov, P. Byass, V. R. Louis, Y. Tozan, E. Massad, A. Tenorio, C. Lagneau, G. L'Ambert, D. Brooks, J. Wegerdt and D. Gubler (2012). "DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue." *Glob Health Action* **5**.

Wilson, J. R., P. F. de Sessions, M. A. Leon and F. Scholle (2008). "West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction." *J Virol* **82**(17): 8262-8271.

Xi, Z., J. L. Ramirez and G. Dimopoulos (2008). "The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection." *PLoS Pathog* **4**(7): e1000098.

Yamazaki, H., N. Hiramatsu, K. Hayakawa, Y. Tagawa, M. Okamura, R. Ogata, T. Huang, S. Nakajima, J. Yao, A. W. Paton, J. C. Paton and M. Kitamura (2009). "Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response." *J Immunol* **183**(2): 1480-1487.

Youn, S., T. Li, B. T. McCune, M. A. Edeling, D. H. Fremont, I. M. Cristea and M. S. Diamond (2012). "Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus." *J Virol* **86**(13): 7360-7371.

Yu, I. M., W. Zhang, H. A. Holdaway, L. Li, V. A. Kostyuchenko, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann and J. Chen (2008). "Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation." *Science* **319**(5871): 1834-1837.

Zaragoza, C., C. J. Ocampo, M. Saura, C. Bao, M. Leppo, A. Lafond-Walker, D. R. Thiemann, R. Hruban and C. J. Lowenstein (1999). "Inducible nitric oxide synthase protection against coxsackievirus pancreatitis." *J Immunol* **163**(10): 5497-5504.

Zhang, K., X. Shen, J. Wu, K. Sakaki, T. Saunders, D. T. Rutkowski, S. H. Back and R. J. Kaufman (2006). "Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response." *Cell* **124**(3): 587-599.

Zhang, Y., V. A. Kostyuchenko and M. G. Rossmann (2007). "Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections." J Struct Biol **157**(2): 356-364.

Zhou, J., C. Y. Liu, S. H. Back, R. L. Clark, D. Peisach, Z. Xu and R. J. Kaufman (2006). "The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14343-14348.

Zou, J., X. Xie, T. Lee le, R. Chandrasekaran, A. Reynaud, L. Yap, Q. Y. Wang, H. Dong, C. Kang, Z. Yuan, J. Lescar and P. Y. Shi (2014). "Dimerization of flavivirus NS4B protein." J Virol **88**(6): 3379-3391.