



Estudio del efecto de la proteína no estructural 5 del virus Zika en la producción de IFN de tipo I

Raúl Hernández Cabrera

Tutora Académica: Dra. Judith Estévez Herrera

Co-Tutor: Dr. Agustín Valenzuela Fernández

**Máster Universitario en Investigación y
Diagnóstico de Enfermedades Tropicales
(MIDETROP)**

Curso Académico 2022-23

Índice

1	Abstract	3
2	Introducción	3
3	Objetivos.....	8
4	Material y métodos.....	9
4.1	Células y Bacterias	9
4.2	Plásmidos	10
4.3	Transfección celular.....	10
4.4	Ensayo de la Luciferasa.....	11
4.5	Técnica bioquímica western blot.....	12
4.6	Estadística	14
4.7	Tabla de Reactivos	14
5	Resultados y discusión	15
5.1	El modelo celular HEK293-Lucia es un modelo válido para el estudio de la producción de IFN-I dependiente de la activación de RIG-I por ARN foráneo.....	15
5.2	La proteína viral NS5 reduce la producción de INF-I.....	18
5.3	La eficacia de la proteína viral NS5 para inhibir la producción de INF-I está bajo el control de la actividad autofágica celular.	20
5.4	La promoción de la ubiquitinación y la SUMOilación de proteínas en la célula modificó la función inhibidora de NS5 de la producción del IFN-I inducida por ARN exógeno.	21
5.5	La lisina 330 de NS5 es esencial en el mecanismo de inhibición de la respuesta inmunitaria innata de ZIKV.	24
6	Conclusiones	26
7	Bibliografía.....	26

1 Abstract

The Zika virus (ZIKV) differs from other flaviviruses due to its neurotropism and neurotoxicity, which are associated with the most deleterious effects of the infection, such as Congenital Zika Syndrome (CZS) and Guillain-Barré Syndrome. Both the blood-brain barrier and the placental barrier seem to be disrupted, and the ability of the nonstructural protein 5 (NS5) to interfere with the innate immune response, especially in the production of type I interferon (IFN-I), is crucial in this process. Here, we demonstrate the impact of the ZIKV NS5 viral protein on the innate immune response in HEK-Lucia cells, a reporter cellular model for IFN-I expression. We discovered that promoting post-translational modifications (PTMs) such as ubiquitination, SUMOylation, or blocking autophagy abolishes NS5 ability to inhibit IFN-I. We revealed that Lysine 330 of NS5 directs its capacity to subvert IFN-I expression in response to infection. Our findings demonstrate that PTMs are critical in NS5 suppression of IFN-I. ZIKV utilizes the cellular ubiquitination machinery to facilitate evasion of the immune response. Given the global impact of ZIKV and its potential for a pandemic, understanding this virus better is crucial for developing prevention, control, and potential treatment strategies.

2 Introducción

En el siglo XXI, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado numerosos eventos epidémicos causados por virus emergentes en todo el mundo [1-4]. Estos eventos han llevado a la declaración de emergencias sanitarias y han tenido un gran impacto socio-sanitario y económico, como la reciente pandemia del virus SARS-CoV-2. Los virus emergentes representan un desafío para nuestro sistema inmunológico, ya que evaden nuestra primera línea de defensa. Sin embargo, los hospedadores utilizan sensores sofisticados para detectar y contener la infección inicial, y el sistema del interferón (IFN) [5-8] juega un papel clave en esta respuesta inmunitaria innata. Sin embargo, ciertos virus, como el Zika y el SARS-CoV-2, han desarrollado estrategias para evadir el reconocimiento de su ARN+ [9,10] y debilitar o neutralizar la respuesta del IFN.

El virus del Zika (ZIKV) se transmite principalmente a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, pero también puede transmitirse por vía sexual, transfusión sanguínea y vertical [11,12]. Además de síntomas inespecíficos como fiebre, erupciones cutáneas y dolores articulares, se ha asociado al Zika con complicaciones neurológicas graves, como microcefalia en neonatos y el síndrome de Guillain-Barré [11,12].

Debido a su potencial pandémico y su rápida propagación en varios continentes, se están realizando investigaciones para comprender mejor los mecanismos de transmisión, replicación y evasión del sistema inmunológico por parte del virus del Zika. Estos estudios son fundamentales para desarrollar estrategias de prevención, control, así como posibles tratamientos y vacunas.

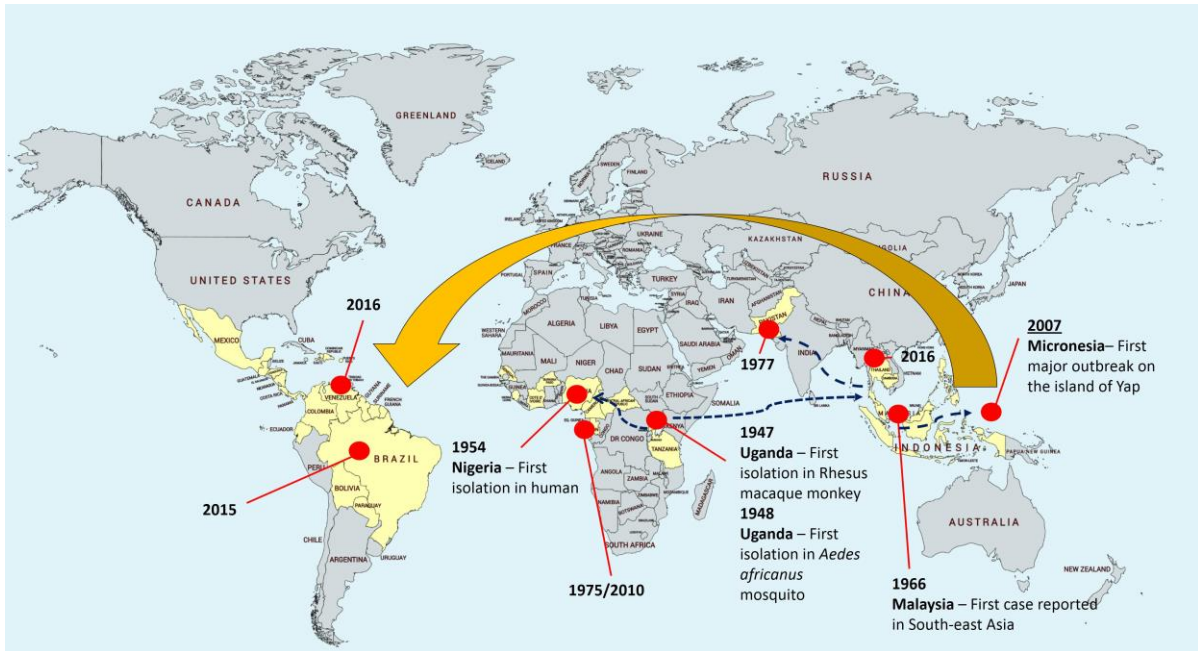


Figura 1: Mapa de la expansión del virus del Zika. El Zika fue descubierto por primera vez en 1947 en el bosque de Zika en Uganda, África. La primera infección humana reportada tuvo lugar en 1954 en Nigeria, y posteriormente se identificó en Uganda entre los años 1962 y 1963. Sin embargo, su diagnóstico ha sido complicado debido a las reacciones cruzadas con otros flavivirus, como el Dengue, lo que dificultó tanto su diagnóstico como su estudio. No fue hasta el año 2007 cuando comenzó a cobrar cierta relevancia con una epidemia en la isla de Yap, en Asia. Entre 2013 y 2014, se produjo otro brote epidémico de Zika en la Polinesia Francesa, en el Pacífico. Sin embargo, fue en 2015, durante una epidemia en Brasil, cuando el Zika se convirtió en una preocupación mundial. Figura extraída de Tham, H. W., Balasubramaniam, V., Ooi, M. K., & Chew, M. F. (2018).

El ZIKV es un virus ARN+, clasificado en el grupo IV de Baltimore, perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Tiene un material genético ARN+ de unas 11 kb que codifica para una poliproteína que es procesada en 10 proteínas [13,14] (Figura 2). La proteína no estructural 5 (NS5; non structural protein 5) es la proteína más conservada en los flavivirus. NS5 cumple funciones importantes, metiltransferasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, pero también antagoniza la producción del INF y la respuesta inmunitaria innata antiviral [8,9,15-22] (Figura 3).

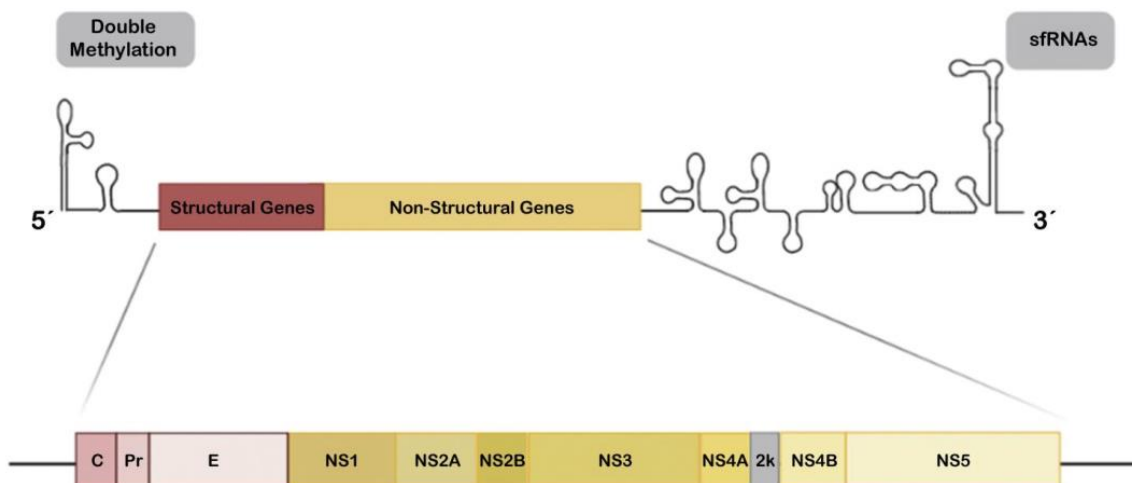


Figura 2: Esquema del genoma del virus del Zika. ARN de cadena simple positiva de aproximadamente 11KB y la poliproteína que codifica. Sobre su extremo 5' UTR "Untranslated region" es susceptible de sufrir metilación que aumenta la estabilidad del material genómico. En su extremo 3' UTR existe una región que forma un subgenoma flavivírico de ARN (sfRNA). Figura extraída de Estévez-Herrera, J., et al. (2021).

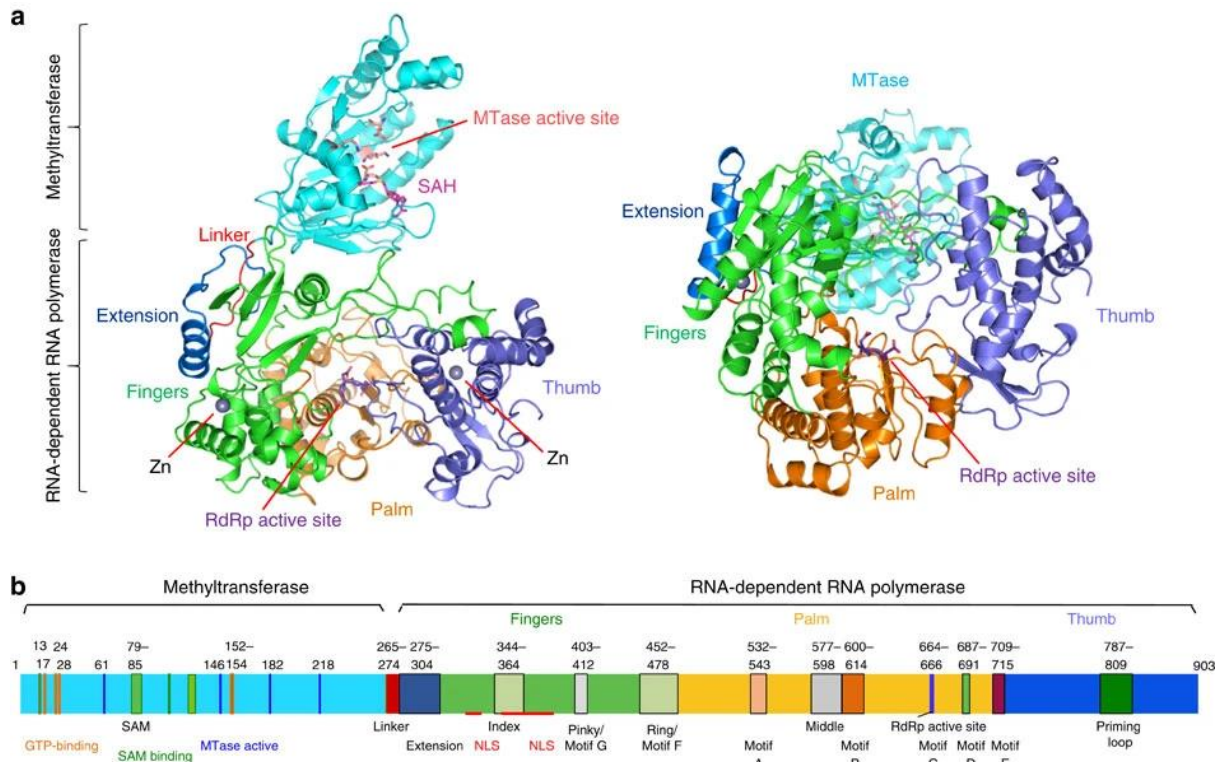


Figura 3: Esquema de la proteína no estructural 5 del virus del Zika. A) Izquierda, Esquema tridimensional NS5 junto a la localización de sus motivos MetilTransferasa (Methyltransferase) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RNA-dependente RNA polymerase). Derecha, Vista superior de NS5. B) Representación lineal de NS5 junto con la localización de algunos residuos de aminoácidos y sus motivos estructurales. Figura extraída de Zhao, B., et al. (2017).

Respecto de la activación de la producción de INF frente a la infección por flavivirus como el ZIKV, el factor celular RIG-I ("retinoic acid-inducible gene-1") es crucial para sensar el genoma viral ARN+ extraño, desde el primer momento que el virus entra en la célula. RIG-I es un receptor citosólico que reconoce la cadena ARN+ viral y dispara la cascada del IFN-I actuando como factor de restricción para este tipo de patógenos [21-24].

Estructuralmente, RIG-I se puede dividir en tres dominios diferentes: un dominio Helicasa y Represor (RD) y dos dominios de reclutamiento de Caspasas (2-CARD) [25]. CARD comienza con la cascada del IFN1 mientras que RD reconoce el ARN. RIG-I, en su forma inactivada, se encuentra fosforilada, por lo que, tras el reconocimiento del ARN+ viral se promueve su desfosforilación y un cambio conformacional para activarse. Esto favorece que RIG-I sufra múltiples modificaciones postraduccionales (PTM en inglés), tales como la desacetilación o ubiquitinación K-63 sobre Lisinas [25-27]. Otras PTM son también fundamentales para la inactivación de este receptor como la ubiquitinación K-48 es una marca para degradación de RIG-I, y su SUMOilación media también en su actividad, uniéndose a Lisinas que antagonizan la degradación K-48 [25] (Figura 4). La relevancia de este proceso en la protección intrínseca de la célula a infecciones por virus de tipo ARN queda reflejada en

la susceptibilidad en modelos murinos [28]. Este es indicativo de que el mecanismo de activación o regulación de la función de RIG-I requiere de un ajuste fino y calculado durante la respuesta inmunitaria [25,26].

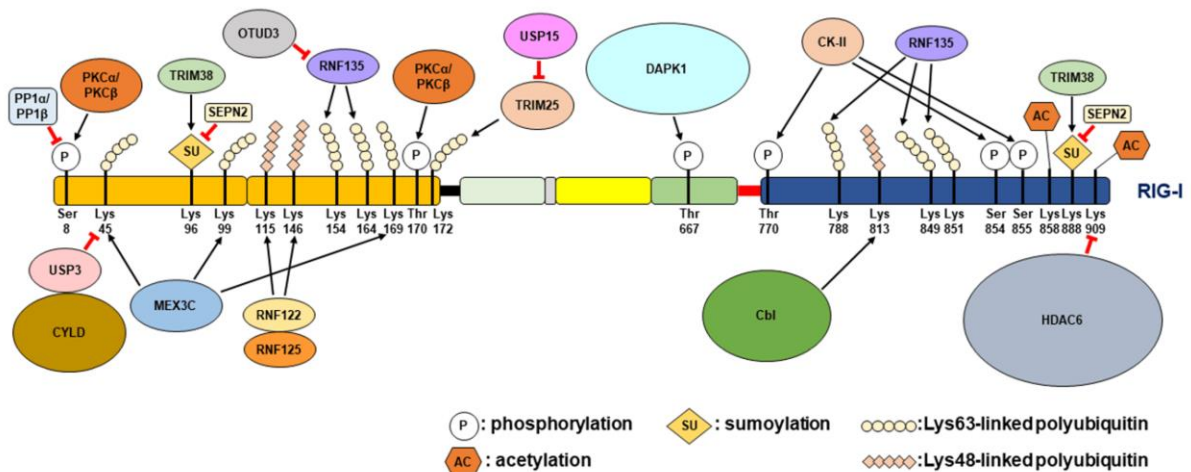


Figura 4: Regiones para Modificaciones postraduccionales en RIG-I, el receptor citosólico para ARN extraño. RIG-I que sufre múltiples modificaciones en su estructura, entre las cuales se encuentra la desacetilación en el residuo de Lisina 909 por la enzima HDAC6. Experimenta ubiquitinaciones múltiples del tipo K-63 en diferentes ubicaciones de la proteína, como las Lisinas K63, 154, K164 y K172, principalmente en sus dominios CARD. Estas modificaciones postraduccionales son esenciales tanto para la activación como para la inactivación de RIG-I. En su estado nativo, RIG-I se encuentra fosforilada, lo que altera su estructura tridimensional y evita el reclutamiento de los efectores que actúan corriente abajo en la señalización. Una forma de inactivar RIG-I es mediante la ubiquitinación de tipo K-48 en los residuos K114 y K146, llevada a cabo por las enzimas E3 ligasas RNF122 y 125, que marcan a la proteína para su degradación. Sin embargo, se ha observado que la desubiquitinasa (DUB) USP4 puede eliminar estas cadenas de ubiquitina K-48, lo que estabiliza a RIG-I y aumenta su actividad, haciéndola más sensible a la infección viral. Figura extraída y modificada de Ke, P. Y. (2023).

En el contexto de la producción de INF de forma RIG-I dependiente, la proteína viral NS5 actúa sobre factores asociados a la ruta RIG-I/INF. Así, se une al Activador de Transcripción 2 (STAT2) cuando se encuentra ubiquitinada en el citosol, marcándolo para degradación para evitar su asociación con STAT1 [29,30]. También bloquea el factor TBK1 [31] (Figura 5). Además, NS5 tiene localización principalmente nuclear, donde su SUMOilación reduce la expresión de los genes estimulados por interferón (ISG) en líneas celulares del endotelio microvascular humano (hB MECs) [17,32,33], y asociándose estos procesos con la neurotoxicidad de NS5 [18,19,34].

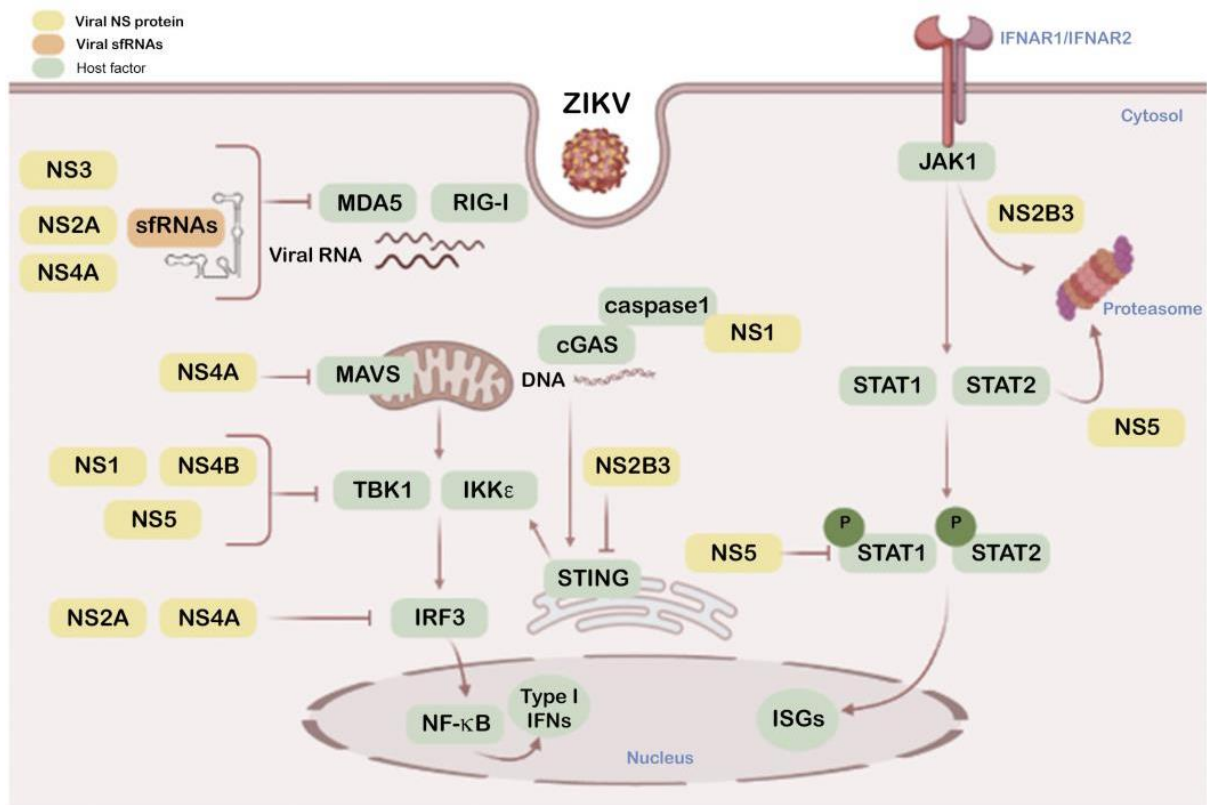


Figura 5: Esquema de las proteínas no estructurales del ZIKA y sfARN como moduladores en todos los ejes en la cascada del IFN-I. Figura extraída de Estévez-Herrera, J., et al. (2021).

Asimismo, NS5 actúa directamente sobre RIG-I [15,16,35], a través de su dominio Metiltransferasa no dependiente de su actividad, sino por impedimento alostérico [18,19,34-36] (Figura 6).

Por tanto, estas proteínas celulares de la ruta del INF y NS5 viral están altamente reguladas por PTM, siendo el equilibrio entre ellas la que mantiene la homeostasis y la correcta activación de la respuesta inmunitaria frente al ZIKV. Además, queremos destacar que la lisina 330 (K330) de NS5 se ha descrito importante para su función viral [37], siendo los residuos de lisina precisamente los susceptibles de sufrir estas modificaciones. Una exacerbación de este sistema de PTMs en estas proteínas celulares puede llevar a un defecto acusado en la producción de INF, incluso, llegando a manifestarse como enfermedades autoinmunes, con un aumento de la susceptibilidad a sufrir infecciones. Así, muchos virus actúan sobre el IFN-I como uno de los mecanismos principales para evadir la respuesta inmunitaria, y es lo que pretendemos abordar en este trabajo fin de máster respecto de la proteína NS5 del ZIKV.

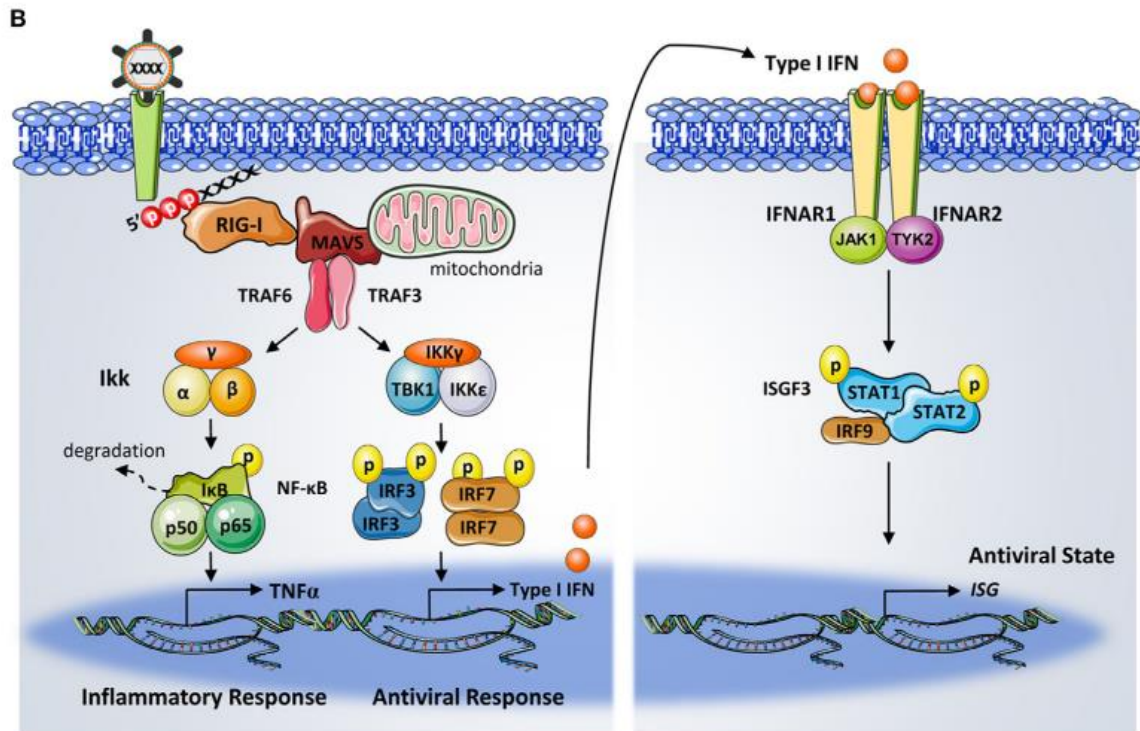


Figura 6: Cascada de producción de Interferón de Tipo 1. Ante una infección viral por ARN, las células poseen una maquinaria de la que deriva la respuesta innata para defenderse de ella. La más conocida y común es la producción de los Interferones, los cuales activan la producción de Genes Estimulados por Interferón (ISG) con los que combatir contra ella. Esta cascada de señales comienza en el citoplasma de la célula, donde los receptores de ARN citosólico como son RIG-I (Retinoic-acid-inducible-gene-1) y MDA5 (Melanoma Differentiation Factor 5), los reconocen para activarse; provocando su oligomerización y posterior reconocimiento por la proteína mitocondrial MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein). A su activación, provoca que se transloque al Retículo Endoplasmático donde se encontrará con los siguientes efectores corrientes abajo. Entre ellos está la proteína TBK1 (Tank-binding kinase) e IKKε. Se forma entonces un complejo Fosforilasa que actúa sobre el efector IRF3 para provocar su dimerización y posterior translocación al núcleo desde el citoplasma para activar directamente la producción de IFN-I. Tras la secreción de manera autocrina y paracrina del interferón; esta quimiocina interactúa en la membrana citoplasmática con el complejo IFNAR1/IFNAR2 (Receptor alpha/Betha de Interferón). Esta unión produce la activación de la proteína JAK (Janus Quinasa), la cual interacciona fosforilando STAT (Transductor de Señal y Activador de Transcripción) que pueden ser también del tipo 1 y 2 para formar un complejo. Ello hace que se transloquen al núcleo, donde formará un complejo con la Proteína de Leucemia Promielocítica (PML) y será el complejo que formen; los que activen los Genes Estimulados por Interferón (ISG) con los que se pondrá a disposición de la célula, toda la maquinaria para combatir la infección vírica. Figura extraída de Liu, Y., Olagnier, D., & Lin, R. (2017).

3 Objetivos

RIG-I y NS5 son proteínas cuya estabilidad y función está determinada por el balance de sus PTM. La regulación que NS5 produce sobre la respuesta inmunitaria no está clara y los mecanismos que subyacen a la baja capacidad de detección de RIG-I de la infección por ZIKV están por determinar. Así, es razonable proponer que tanto su función, inhibir la producción de INF para NS5, como su localización estarán alteradas por el grado de modificaciones PTM que sufran, como, por ejemplo, por ubiquitinación o por SUMOilación.

En este contexto, nuestros objetivos principales de estudio son:

1. Poner a punto un modelo celular (HEK293T-Lucía) de trabajo que permita cuantificar la producción de INF-I por estimulación de RIG-I de forma ARN dependiente.
2. Estudiar el efecto que tiene la proteína NS5 sobre la producción de INF-I, en este modelo de producción de INF-I.
3. Determinar el efecto de diferentes factores sobre la estabilidad de NS5 (como la autofagia celular, su ubiquitinación y su SUMOilación, y la mutación de su Lisina 330 susceptible de sufrir estos cambios), y cómo afecta a su acción sobre la producción de INF-I.

4 Material y métodos

4.1 Células y Bacterias

Se utilizaron células embrionarias de riñón humano (293T HEK-Lucía Luciferasa RIG-I, Invivogen). Se cultivaron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina. Se utilizaron antibióticos para su preservación y selección. Blastidicina 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del cultivo, Normocina 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y Zeocina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Las bacterias en las que se amplificaron los plásmidos para proteínas no virales (*E. coli* DH5 α) y para proteínas virales (*E. coli* One Shot Stbl3 y *E. coli* XL10-Gold) fueron cultivadas en medio LB con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ampicilina como antibiótico de selección.

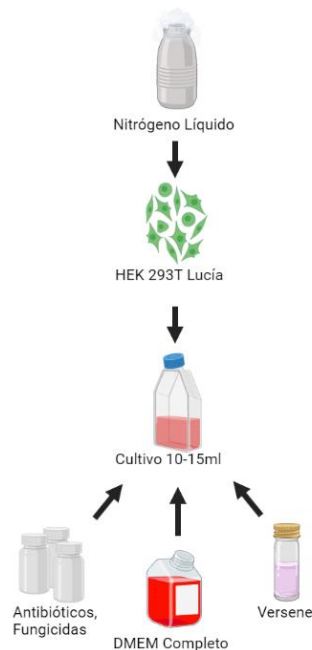


Figura 7: Esquema del cultivo de celular. Descongelamiento en nitrógeno líquido del stock de células HEK 293T-Lucía, usando el medio DMEM completo como sustrato, una batería de antibióticos y Versene para despegar las células en cada fase. Figura creada con BioRender.

4.2 Plásmidos

Para la amplificación de plásmidos, se utilizaron stocks en glicerol de bacterias con plásmidos codificantes para las proteínas usadas en los experimentos. Las bacterias fueron descongeladas (-81°C), preinoculadas y seleccionadas (100 mL de medio LB con 100 µL Ampicilina) e incubadas a 37°C durante 8h. Posteriormente se inocularon en medio de selección con antibióticos, incubando a 37°C “overnight”.

Los plásmidos amplificados fueron extraídos utilizando el kit Plasmid Midiprep (Qiagen) y sus concentraciones medidas por espectrofotometría. Este modelo se basa en la capacidad del ADN para absorber la luz a una longitud de onda de 260 nm, a través de la Ley de Lambert-Beer se establece la relación entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de material genético en la muestra.

Los plásmidos purificados fueron guardados a -21°C para su posterior uso.

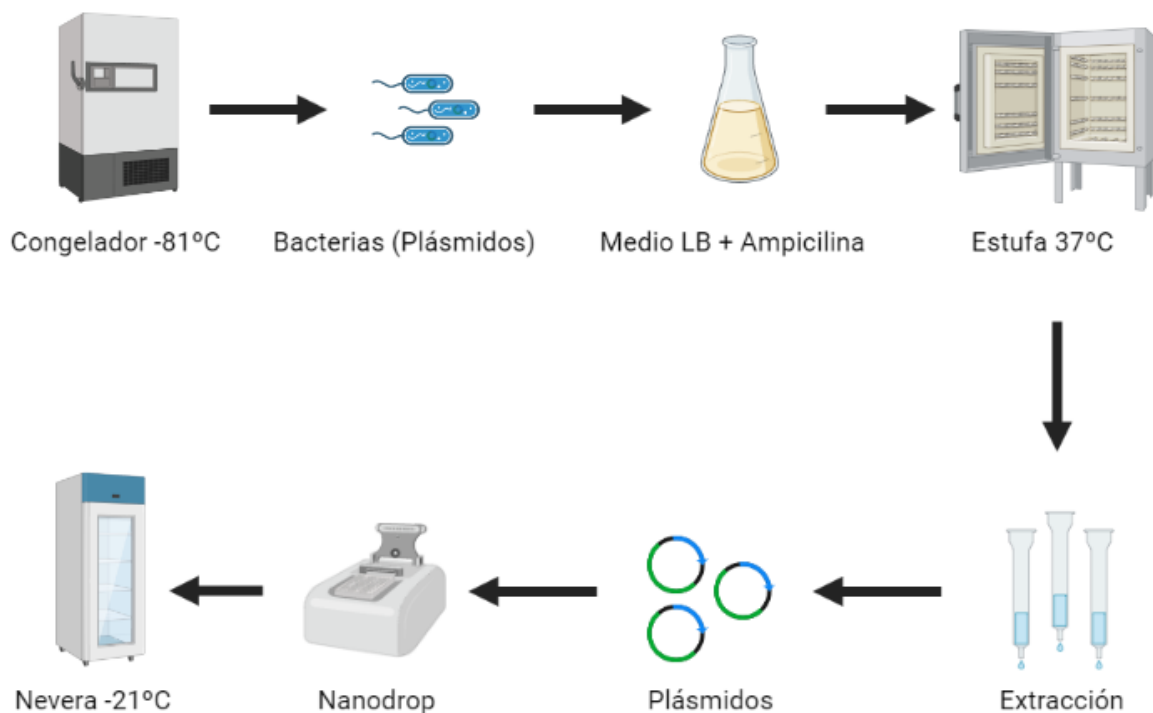


Figura 8: Esquema del Cultivo y Procesamiento del stock de bacterias con plásmidos codificantes. Descongelamiento, cultivo y amplificación en medio LB, selección con Ampicilina y posterior extracción y purificación de los plásmidos codificantes de proteínas utilizados en los experimentos. Figura creada con BioRender.

4.3 Transfección celular

Las células fueron sembradas en cuadruplicados a una densidad de 500.000 células/pocillo con 2 mL de medio DMEM sin antibióticos de selección para una confluencia adecuada del 60-70%.

Tras 24 h, se utilizó el FuGene (Promega) en una relación de 3 μ L de reactivo por cada 1 μ g de plásmido. Las células fueron incubadas a 37°C durante 48 h para asegurar la expresión en abundancia de las proteínas de interés.

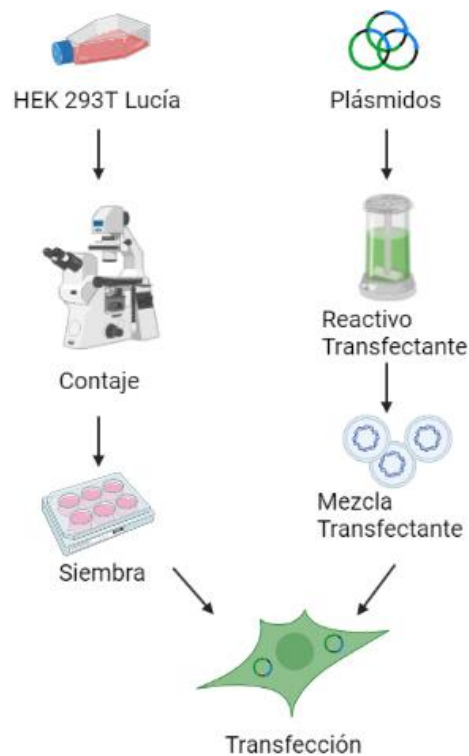


Figura 9: Esquema del proceso de transfección. Por un lado, el contaje y la siembra de las células, por el otro lado el tratamiento de los plásmidos con un reactivo transfectante. Figura creada con BioRender.

4.4 Ensayo de la Luciferasa

Se realizaron transfecciones de células como se explicó previamente. Tras 48 h, se retiró el medio y se recogieron las células usando Versene (Gibco) y DMEM completo. Una parte de las células se utilizó para hacer un Western Blot, mientras que el resto se volvió a sembrar en una placa de 96 pocillos a una concentración de 100.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L de medio de cultivo por sextuplicado.

Dependiendo de la condición experimental, algunas células fueron tratadas con PBS como control o con 3-metiladenina (3-MA) a 200 mM durante 5 h, inhibidor de la autofagia.

Se preparó el inductor de RIG-I usando 100 μ L LyoVec (Invivogen) y 3p-hpRNA (Invivogen), y añadiéndose 20 μ L/pocillo. Se dejó “overnight” para asegurar una adecuada inducción.

Al día siguiente, se recogieron 20 μ L del sobrenadante donde se encontraba la Luciferasa, cuya expresión depende de la activación de los promotores del IFN-I. El sobrenadante se transfirió a otra placa de 96 pocillos con fondo blanco para medir la señal del interferón. Simultáneamente, se preparó el reactivo Quanti-Luc Gold™, que contiene coelenteracina y permite medir la señal de Luciferasa.

Se utilizó un luminómetro para medir la luminiscencia, obteniendo los datos de RLU (Relative Light Units) para cada condición. Para estandarizar estas medidas, se relacionaron con la concentración de proteínas, utilizando el kit BCA Protein Assay.

Los datos de producción de interferón se calcularon dividiendo los RLU por las concentraciones de proteínas.

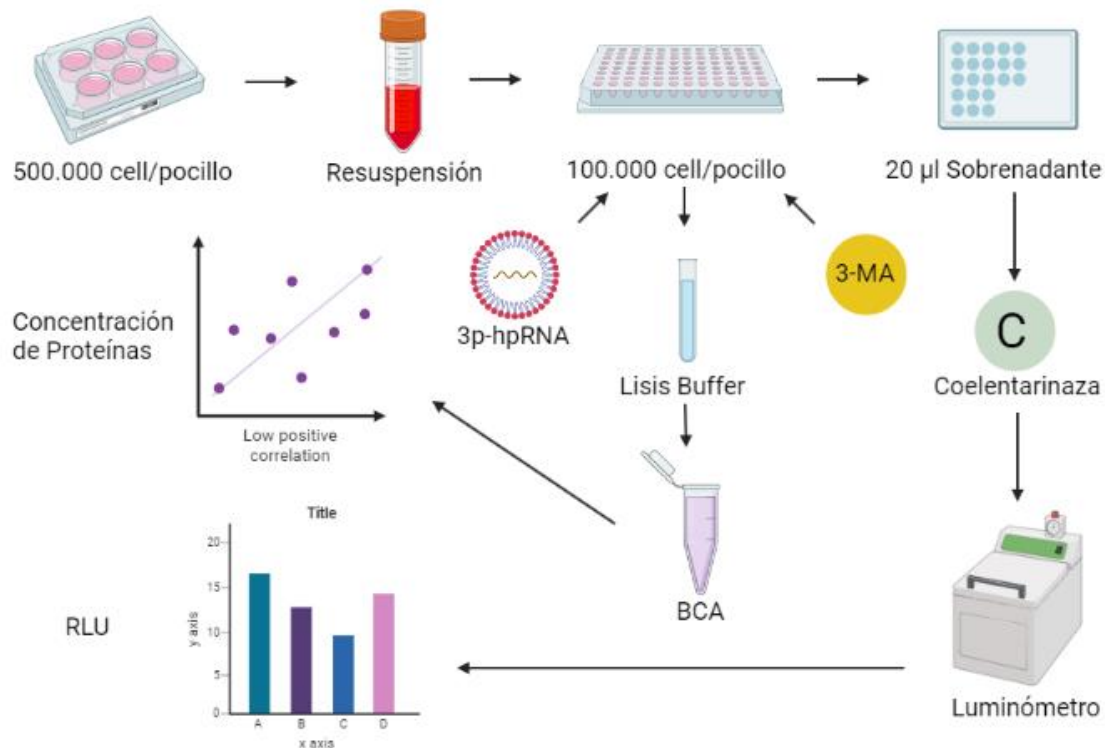


Figura 10: Esquema del Ensayo de la Luciferasa. La siembra en placas de 96 pocillos donde se hará por sextuplicado cada condición, con su posterior recogida del sobrenadante donde se encuentra la Luciferasa para cuantificar la luz producida, además del esquema del proceso de cuantificación de proteínas. Las Unidades de Luminiscencia Relativas (RLU) y la Concentración de Proteínas (C.P) serán utilizadas como la medida de la producción del IFN-I. Figura creada con BioRender.

4.5 Técnica bioquímica western blot

Las células fueron despegadas con PBSx1 y centrifugadas a 2.500 rpm durante 5 min a +4°C. El pellet fue resuspendido en 40 µL de buffer de lisado LB e incubado en hielo durante 30 min.

Utilizando un sonicador se ayudó a la lisis celular, seguido de otra centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Las muestras fueron resuspendidas buffer de carga Laemmli4x y puestas a 95°C durante 5 min; 40 µL de las muestras se cargaron en cada pocillo de un gel de acrilamida-bisacrilamida y se usó una solución rica en electrolitos que facilita el movimiento de proteínas durante la electroforesis como el SDS/Page (Running Buffer) a 35 mA por gel durante 1 h. Se usó el tampón de Transferencia de Towbin para transferir las proteínas en el gel a una membrana de nitrocelulosa activada en metanol 15 seg, H₂O MiliQ

2 min y bloqueadas en 5% de leche en TBS-T durante 30 min. Tanto la membrana como el gel fueron colocadas en un TransBlot Turbo (Biorad) con un amperaje de 1,3 A durante 1 h.

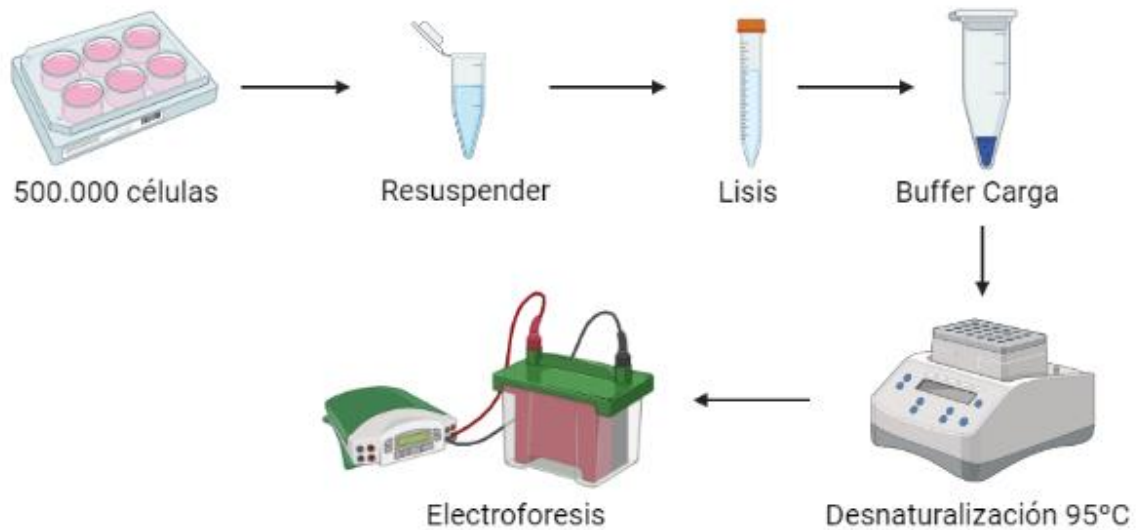


Figura 11: Esquema del Western Blot, parte 1. Desde la resuspensión de las células, su tratamiento para lisarlas y posterior adición del Buffer de Carga Laemmli, con la desnaturalización y finalmente electroforesis. Figura creada con BioRender.

Tras la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana con 5% de leche en TBS-T durante 1h y se incubó con el anticuerpo “overnight”. Al día siguiente, la membrana fue lavada con TBS-T y se incubó con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima peroxidasa durante 1-2 h.

Tras otros lavados con TBS-T, se le añadieron los sustratos de la peroxidasa del Kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) y llevados a una cámara ChemiDoc para su revelación.

Una vez adquiridos los resultados, la membrana fue llevada a una Solución de Stripping que promueve la separación de los anticuerpos, incubándose en agitación durante 30 min y ayudado por lavados NaCl 50 mM. Con un lavado final de PBS-T, se puede volver a activar utilizando el método descrito y marcar con otro anticuerpo primario.

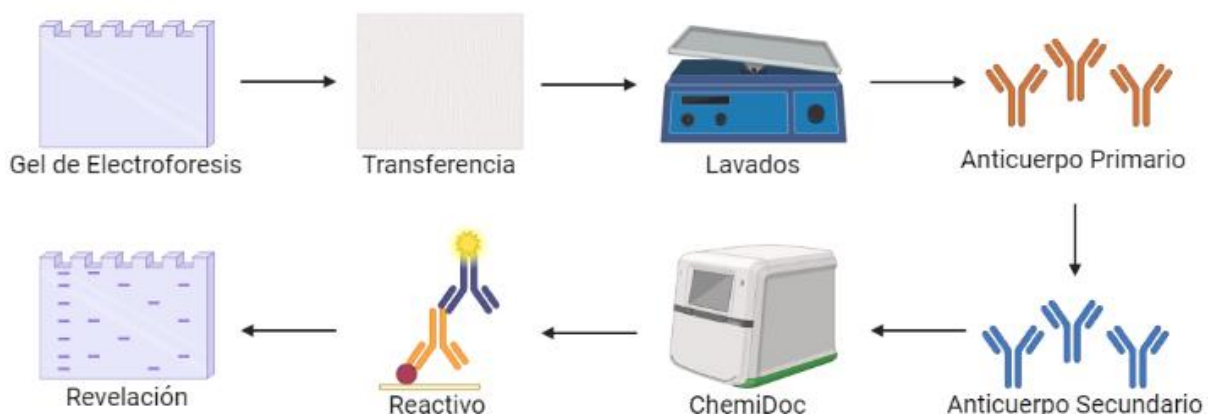


Figura 12: Esquema del Western Blot, parte 2. Transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana, posterior lavados e incubación de anticuerpos primario y secundario. Adición de los reactivos en el ChemiDoc y posterior revelación de los datos. Figura creada con BioRender.

4.6 Estadística

Se utilizó el programa SPSS (licencia ULL) para calcular las medias y desviaciones estándar. Se verificó la normalidad de los datos utilizando el test de Shapiro-Wilk ($n=6$). Se realizaron pruebas de T-Test para comparar las medias de los diferentes pares de condiciones. En los ANOVA se comprobó la homocedasticidad utilizando el test de Levene y se asegura la independencia de las muestras, ya que los experimentos se llevaron a cabo en muestras independientes seleccionadas aleatoriamente.

4.7 Tabla de Reactivos

TBS 10X (1 L)	Tris-HCL	63,5 g
	Tris-Base	11,8 g
	NaCl	87,66 g
	pH	7,5
	H ₂ O miliQ	1 L
Tris-Glicina 10X (1 L)	Tris-Base	30,25 g
	Glicina	144 g
	H ₂ O miliQ	1 L
TBS-T (5 L)	TBS 10X	500 mL
	H ₂ O miliQ	4,5 L
	Tween-20	20 mL
SDS-PAGE	Tris-Glicina 10X	500 mL
	H ₂ O miliQ	4,5 L
	SDS 10%	50 mL
PBS 10X (1 L)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	NA ₂ HPO ₄	2,4 g
	H ₂ O miliQ	1 L
Glicina (1 M)	Glicina	15 g
	H ₂ O miliQ	200 mL
Towbin Transfer Buffer (1 L)	Metanol	200 mL
	Glicina 1M	192ml
	Tris-Base (1M)	25 mL
	H ₂ O miliQ	582 mL
Buffer Lisis LB	Tris-HCl (1M)	500 µL
	NaCl (5M)	300 µL

	Deoxyciclato sódico	
	10%	500 μ L
	Inh. Protesa 25X	400 μ L
	Tritón H ₂ O miliQ 10%	1 mL
	H ₂ O miliQ	csp (10 mL)
Buffer Laemmli 4x (5 mL)	Tris-HCl, pH 6,80	1,25 mL
	SDS 10%	0,4 g
	Glicerol 100%	2 mL
	B-Mercaptoetanol	1 mL
	Azul de Bromofenol	0,002 g
	H ₂ O miliQ	0,75 mL
Lower Buffer (200 mL)	Tris-Base	36,34 g
	SDS 10%	8 mL
	pH	8,8
	H ₂ O miliQ	(Csp 200 mL)
Lower Buffer (200 ml)	Tris-Base	12,12 g
	SDS 10%	8 mL
	pH	8,8
	H ₂ O miliQ	(Csp 200 mL)
Ig primario (WB) [1/200]	α lg	2 μ L
	TBS-T	1 mL
Ig secundario (WB) [1/5.000]	α lg	10 μ L
	TBS-T	50 mL
NaCl Striping	NaCl	1,46 g
	H ₂ O miliQ	500 mL
Solución de Striping	Glicina	15 g
	SDS	1 g
	Tween-20	10 mL
	pH	2,2
	H ₂ O miliQ	(Csp 1 L)

Tabla 1: Tabla esquemática de los reactivos utilizados y cómo prepararlos.

5 Resultados y discusión

5.1 El modelo celular HEK293-Lucia es un modelo válido para el estudio de la producción de IFN-I dependiente de la activación de RIG-I por ARN foráneo.

El modelo celular HEK293-Lucia ha sido diseñado para medir la producción de interferón tipo I (IFN-I) que es RIG-I dependiente en respuesta a la estimulación con ácido nucleico extraño, como el ARN (3p-hpRNA). Para facilitar la captación de este estímulo de ARN, se utilizó el agente transfectante LyoVec, que tiene una parte catiónica capaz de unirse al material

genético y una parte sin carga que ayuda a desestabilizar la membrana de las células. (Figura 13).

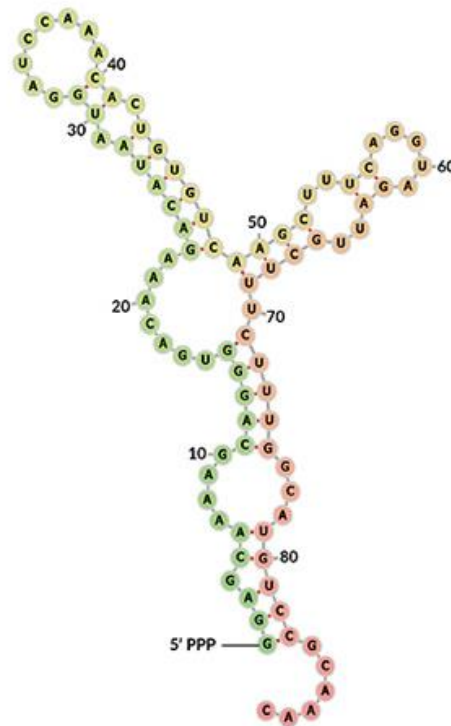


Figura 13: Estructura del agonista de RIG-I, 3p-hpRNA. Este ligando posee un triple grupo fosfato en su extremo 5' y fue diseñado para tener una secuencia que forme una estructura secundaria que simula el RNA viral y que es diferente al de mamíferos. Tanto su extremo 5' libre como esta estructura los convierten en un potente agonista de RIG-I. Figura extraída y modificada de InvivoGen. (s. f.). 3p-hpRNA. <https://www.invivogen.com/3p-hpma>

El modelo celular HEK293-Lucía contiene un plásmido con el gen reportador Luciferasa, controlado por un promotor de IFN-I y regulado por un complejo multimérico ISRE. La expresión de Luciferasa es una medida indirecta de la producción de IFN-I y depende de la activación de RIG-I.

Se quiso validar el modelo para ser utilizado en la medición de la producción de IFN-I. Para ello, se le expuso a una simulación de infección viral por ARN usando el 3p-hpRNA y así comprobar que existía una diferencia entre el estado basal y uno inducido.

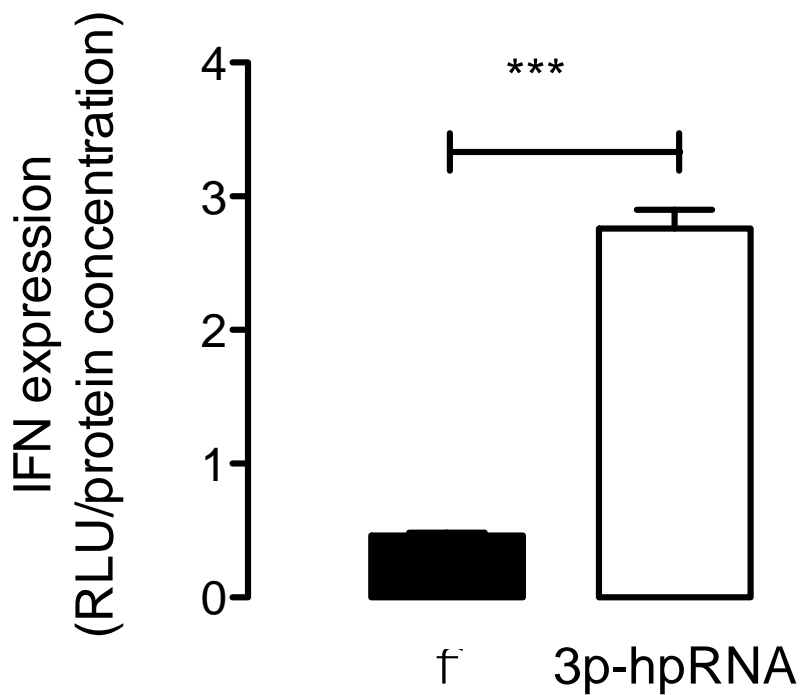


Figura 14: Expresión de IFN-I normalizado ante la inducción por ARN exógeno. El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminiscence Units) normalizado por la Concentración de Proteínas (C.P) para una muestra Control sin inducción (Izquierda, 0,4631 ± 0,0538 RLU/C.P) y una muestra problema con inducción (Derecha, 2,760 ± 0,3377 RLU/C.P). El p-valor la prueba T-Student: *** < 0,001. Figura creada con GraphPad Prism.

Se comprueba que la producción del interferón es dependiente de un ARN foráneo como es el 3p-hpRNA y este a su vez también es RIG-I dependiente (Figura 14). Por tanto, las HEK293-Lucía son un buen modelo para poder estudiar la producción del Interferón (Figura 15).

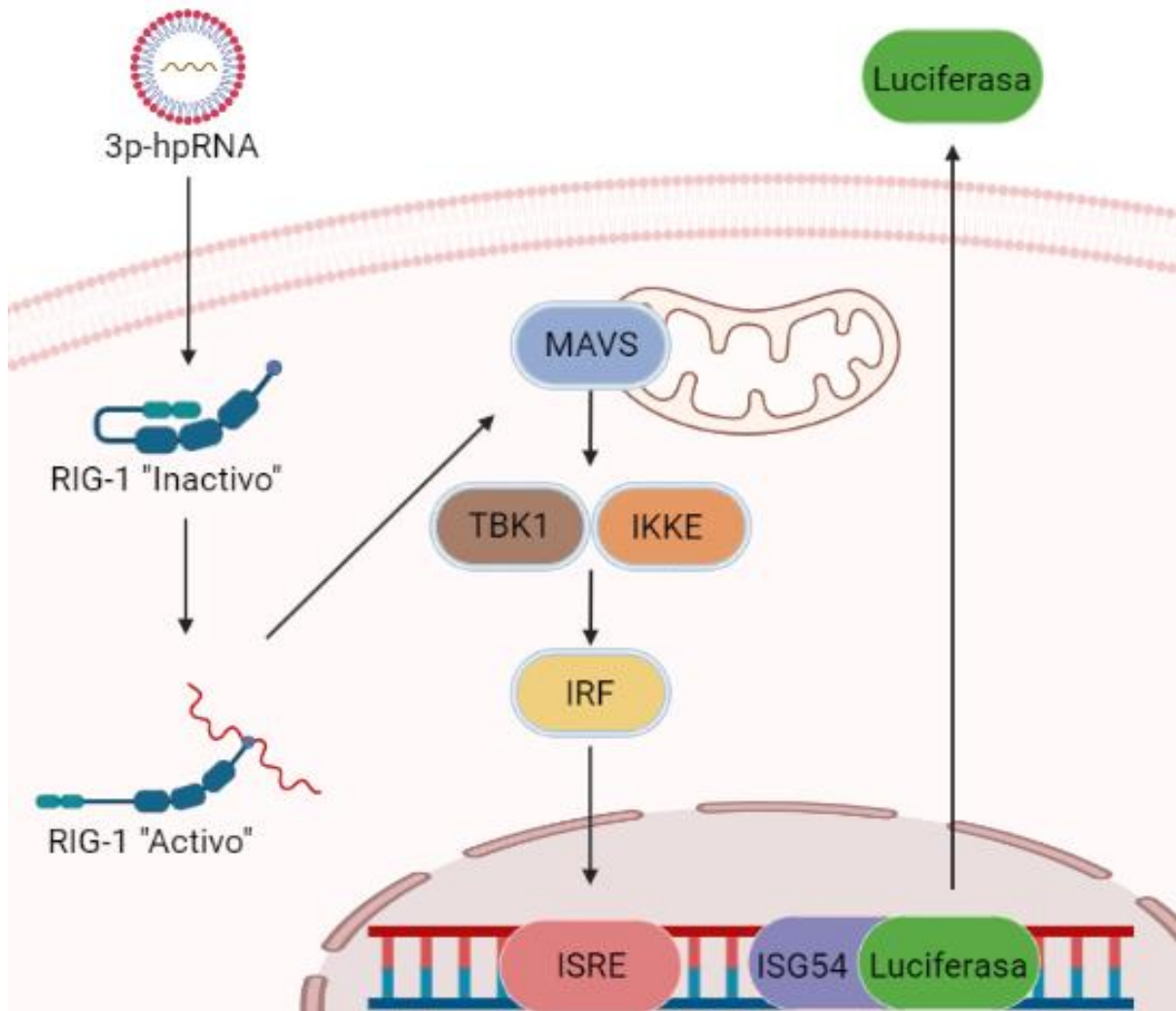


Figura 15: Expresión de Luciferasa por las células HEK293T Lucía Luciferasa. Ante una estimulación por ARN foráneo, RIG-I es activado y comienza una cascada de transducción de señales que culmina con la activación de los elementos ISRE en el núcleo. Uno de ellos forma parte de un plásmido integrado en el núcleo y que gobierna sobre el gen reportador de Luciferasa que será usado como una medida de producción de IFN-I de manera RIG-I dependiente. Figura creada con BioRender.

5.2 La proteína viral NS5 reduce la producción de INF-I.

NS5 puede bloquear la producción del INF-I, lo que permite al virus continuar su ciclo infeccioso y escapar de la respuesta inmunitaria. Para poner de manifiesto esta actividad, se transfectaron células HEK293-Lucia con plásmidos codificantes para NS5, y comparado los resultados obtenidos con células control usando un plásmido vacío (pcDNA3.1).

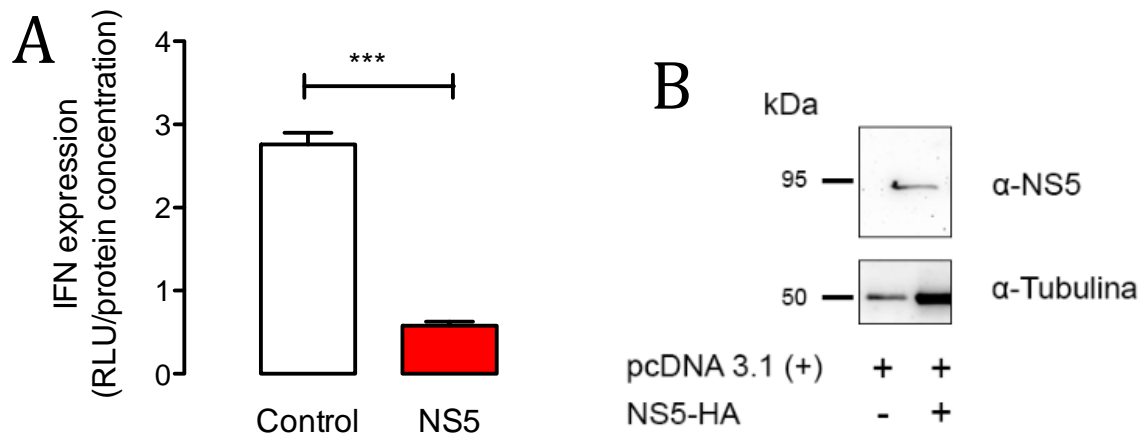


Figura 16: Expresión de IFN-I normalizado ante la presencia de NS5. A), El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminescence Units) normalizado por la Concentración de Proteínas (C.P) para una muestra Control sin NS5 (Izquierda, $2,760 \pm 0,3377$ RLU/C.P) y una muestra problema con NS5 (Derecha, $0,5768 \pm 0,1285$ RLU/C.P). El p-valor la prueba T-Student: $*** < 0,001$. B), Western Blot utilizando la proteína alfa-tubulina como el control de carga de proteína total y demostrando la presencia de NS5 en la condición problema. Figura A creada con GraphPad Prism.

Este experimento evidencia el efecto directo y tan llamativo que la proteína NS5 tiene sobre la producción de IFN-I (Figura 16 A y 16B) en las células ante esta simulación de una infección por virus ZIKV (Figura 17).

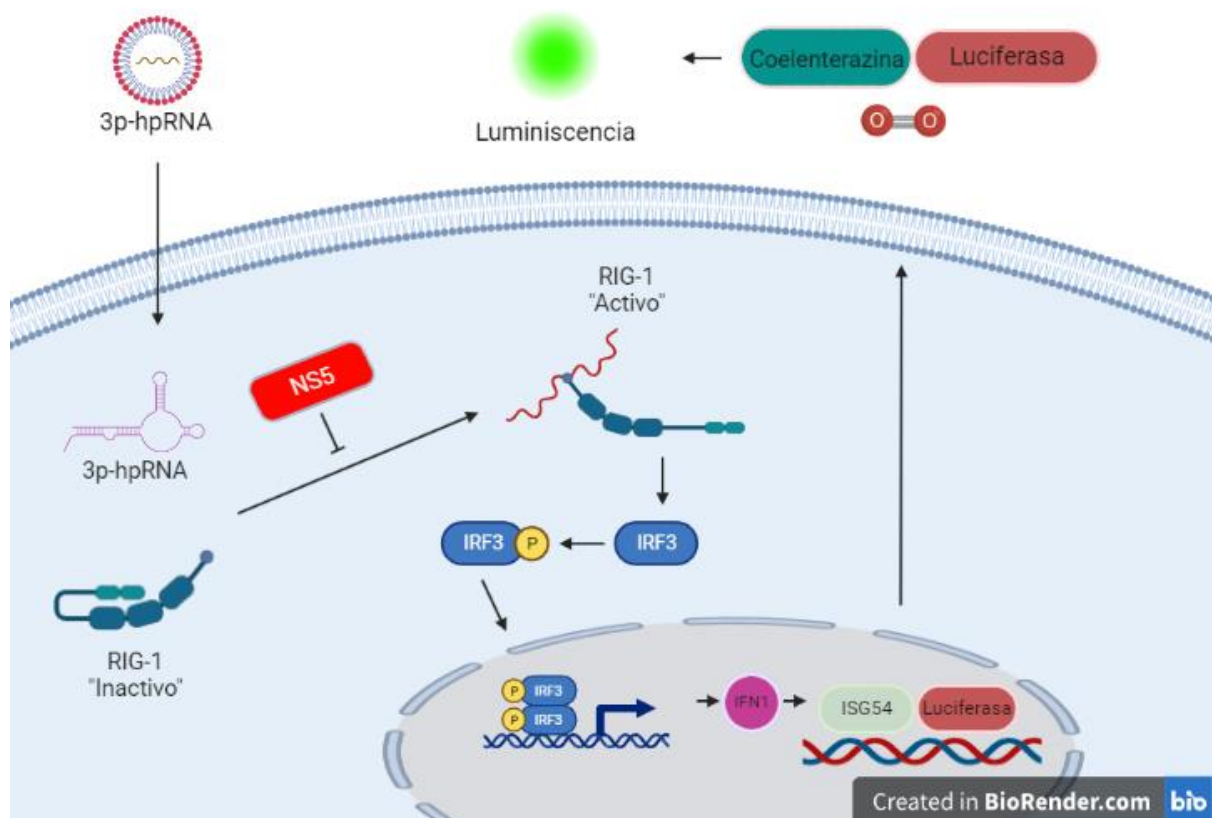


Figura 17: Modelo simplificado de la inducción de la respuesta de IFN-I en las células HEK293-Lucia y el efecto de NS5 sobre ella. El tratamiento con el agonista de RIG-I 3p-hpRNA induce la cascada de activación de factores de transcripción que promueven la expresión de genes de interferón. El promotor ISG54 en pauta de

lectura con Lucia es activado y la proteína es secretada al medio extracelular. La adición del sustrato coelenterazina permite generar una reacción bioluminiscente que es medida para determinar la expresión de genes de IFN-I. Figura creada con Biorender.

5.3 La eficacia de la proteína viral NS5 para inhibir la producción de INF-I está bajo el control de la actividad autofágica celular.

La autofagia celular desempeña un papel fundamental en la degradación, reciclaje y eliminación de proteínas celulares tóxicas o mal conformadas, así como en la eliminación de agentes patógenos. Existe una estrecha relación entre la autofagia y la respuesta inmunitaria, ya que esta vía participa en la degradación de las proteínas efectoras de la respuesta inmunitaria [21,41] (Figura 18)

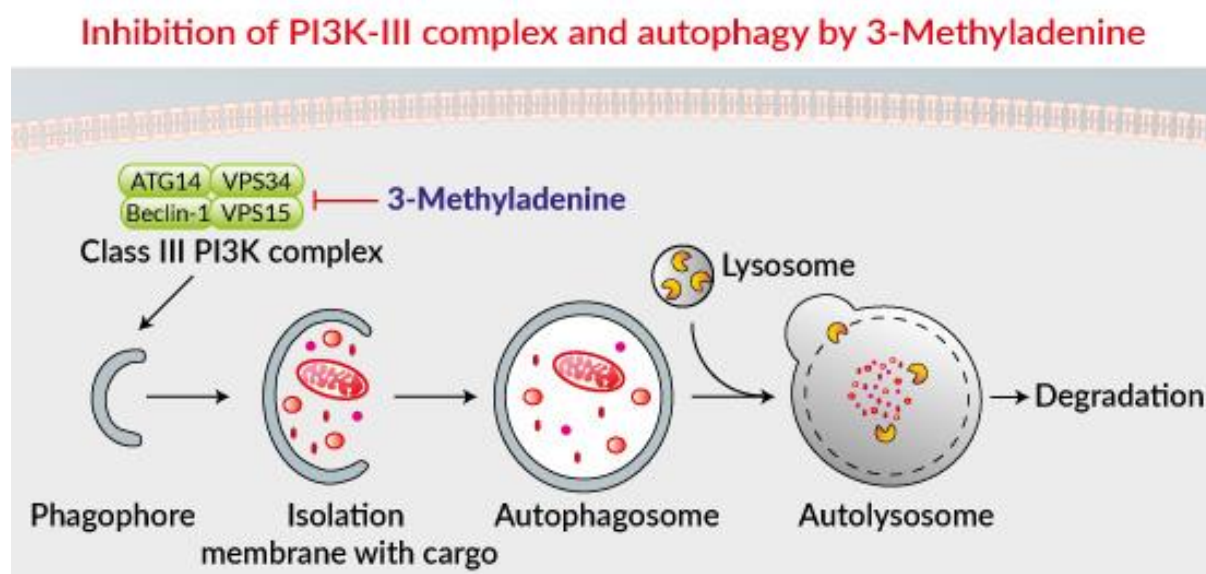


Figura 18. Efecto de la 3-MA en la inhibición de la autofagia en la fase de la formación del fagóforo. 1. La 3-MA es un bloqueante del fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) que es un regulador clave. Este fármaco es capaz de bloquear la formación del autofagosoma en los estadios tempranos de su formación, evitando que se recluten en su interior las proteínas a degradar por autofagia. Figura extraída de <https://www.invivogen.com/3-methyladenine>.

Así, se hizo previamente el tratamiento celular control (PBS) o por 3-MA, antes de la estimulación de la ruta RIG-I por 3p-hpRNA.

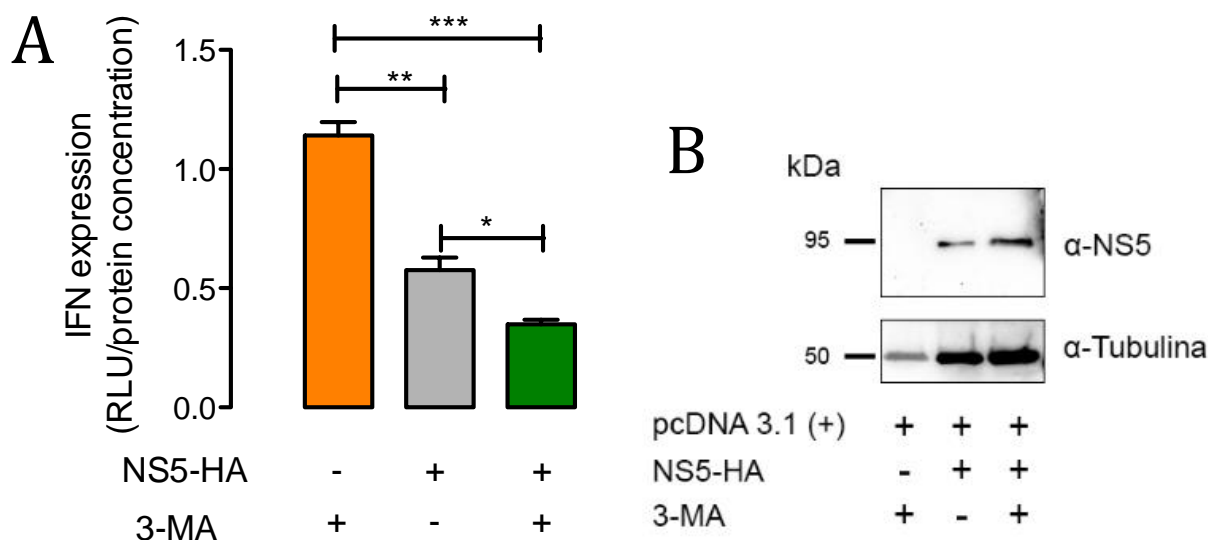


Figura 19: Expresión de IFN-I normalizado ante la presencia de NS5 y tratamiento con 3-metiladenina. A), El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminiscence Units) normalizado por la Concentración de Proteínas (C.P) para una muestra Control sin NS5 con tratamiento (Izquierda, $1,141 \pm 0,1411$ RLU/C.P), una muestra control con NS5 (Centro, $0,5768 \pm 0,1285$ RLU/C.P) y una muestra problema con NS5 y Tratamiento (Derecha, $0,3495 \pm 0,04506$ RLU/C.P). El p-valor la prueba T-Student: *** < 0,001, ** < 0,001, * < 0,001. B), Western Blot utilizando alfa-tubulina como carga de proteína total control, para demostrar la presencia de NS5 en las diferentes condiciones descritas. Figura A creada con GraphPad Prism.

Los datos obtenidos indican una reducción significativa en la producción del IFN-I, al ser inhibida la ruta de la autofagia por 3-MA, y estando en presencia de NS5 (Figura 19A).

El resultado del análisis estadístico por test ANOVA (p -valor < 0,001) muestra que tanto el tratamiento como la presencia de NS5 son determinantes en la producción de IFN-I. El alto valor del coeficiente, R^2 ajustado (0,9), indica una fuerte asociación entre la producción de IFN-I y la autofagia en presencia de NS5.

El análisis bioquímico por western blot mostró un aumento visual en la intensidad de la banda correspondiente a NS5 en las células tratadas con 3-MA (Figura 19B, derecha). Esto podría explicarse por la estabilización de NS5 que no se estaría degradando por la autofagia.

5.4 La promoción de la ubiquitinación y la SUMOilación de proteínas en la célula modificó la función inhibidora de NS5 de la producción del IFN-I inducida por ARN exógeno.

Para inducir modificaciones PTM en las proteínas RIG-I y NS5, se utilizaron plásmidos codificantes para estas proteínas, y sobreexpresándolos junto a plásmidos codificantes para las proteínas ubiquitina y SUMO. La estrategia consiste en que, al haber más acceso a estas etiquetas celulares, se promoverá su asociación con residuos clave (lisinas) en las proteínas RIG-I y NS5 [18], estudiando así su efecto funcional y estabilizador.

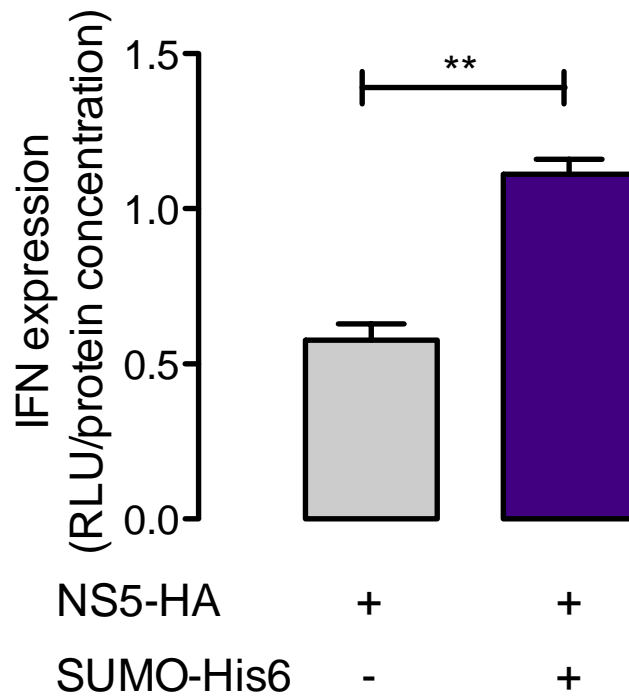


Figura 20: Expresión de IFN-I normalizado ante la presencia de NS5 y sobreexpresión de SUMO. El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminiscence Units) normalizado por la Concentración de Proteínas (C.P) para una muestra Control con NS5 (Izquierda, $0,5768 \pm 0,1285$ RLU/C.P) y una muestra problema con NS5 junto a SUMO (Derecha, $1,112 \pm 0,112$ RLU/P). El p-valor la prueba T-Student: $** < 0,0012$. Figura creada con GraphPad Prism.

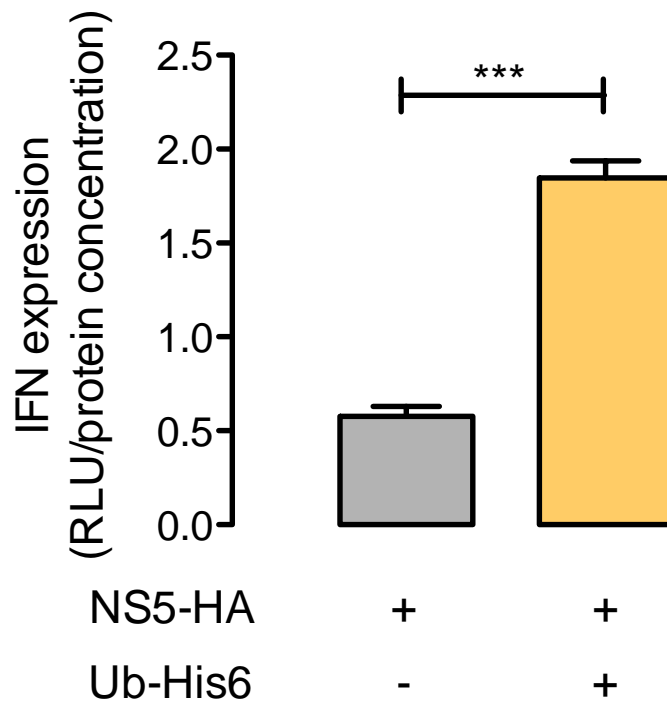


Figura 21: Expresión de IFN-I normalizado ante la presencia de NS5 y sobreexpresión de Ubiquitina. El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminescence Units) normalizado por la Concentración de Proteínas (C.P) para una muestra Control con NS5 (Izquierda, $0,5768 \pm 0,1285$ RLU/C.P) y una muestra problema con NS5 junto a Ubiquitina (Derecha, $1,845 \pm 0,2302$ RLU/C.P). El p-valor la prueba T-Student: $*** < 0,001$. creada con GraphPad Prism.

Las modificaciones PTM como Ubiquitinación y SUMOilación parecen restablecer la respuesta del IFN-I, RIG-I dependiente. Esto se podría explicar por modificaciones tanto en RIG-I como en NS5, modulando activación y/o degradación (Figura 20 y 21).

La SUMOilación estabiliza a RIG-I, evitando su degradación y promoviendo su activación [25], mientras que NS5 requiere de esta modificación para su actividad inmunosupresora [33,34], evidenciándose un equilibrio entre activación e inhibición.

La ubiquitinación K-63 es necesaria para activar RIG-I [18,26], mientras que la ubiquitinación K-48 marca las proteínas para degradación por el proteasoma [25]. La sobreexpresión de ubiquitina aumenta la producción de IFN-I, posiblemente al degradar NS5. La acumulación de NS5 y su inhibición de la autofagia pueden estar relacionadas con el restablecimiento exacerbado de IFN-I, sugiriendo una posible unión de cadenas de ubiquitina K-63 a NS5 [39] para eliminación por autofagia (Figura 22).

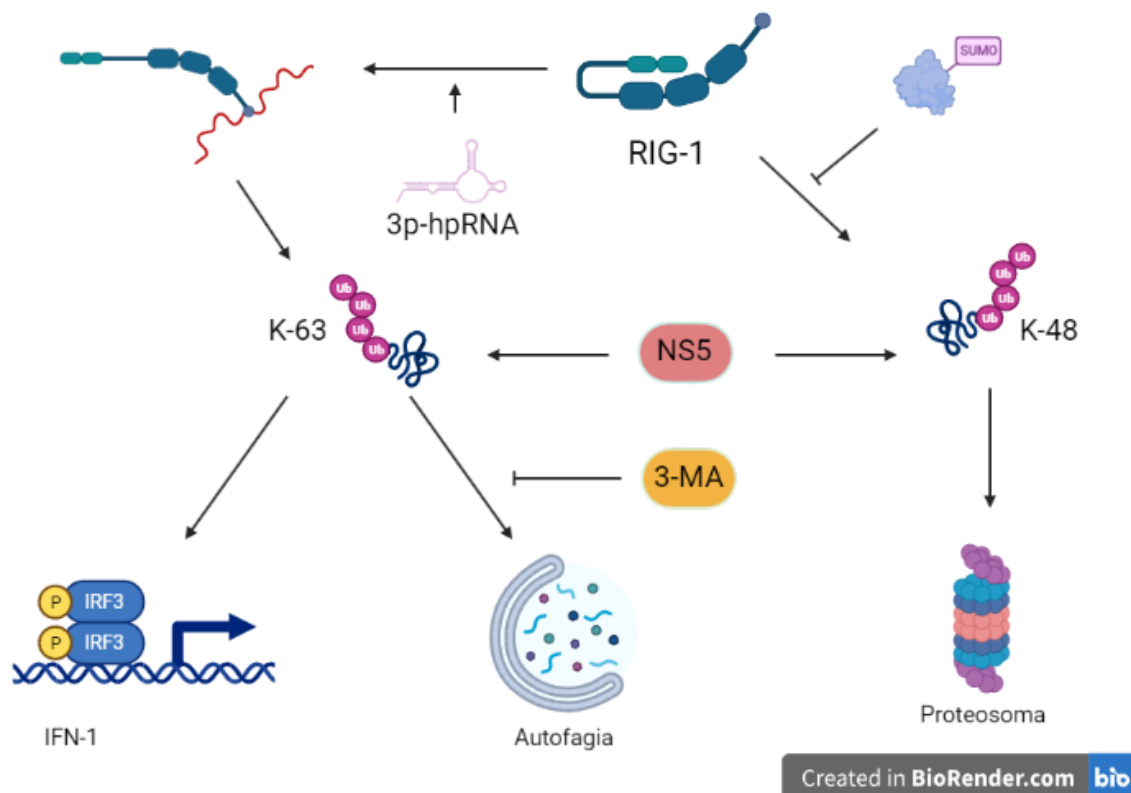


Figura 22: Esquema de las modificaciones postraduccionales que RIG-I y NS5 pueden sufrir. La Ubiquitinación K-48 de RIG-I marca a la degradación por el proteasoma y la SUMOilación evita esta ruta para estabilizar la proteína aumentando la cantidad de interferón. RIG-I necesita unión a cadenas de Ubiquitina K-63 para activarse, siendo también marcaje su degradación por autofagia. Al mismo tiempo NS5 puede estar ubiquitinándose para ser marcado tanto por la degradación Proteasómica y/o Autofágica. Finalmente, el tratamiento con 3-MA inhibe la degradación autofágica, provocando una aparente acumulación de NS5 y un descenso más acusado en la producción de IFN-I. Figura creada con BioRender

5.5 La lisina 330 de NS5 es esencial en el mecanismo de inhibición de la respuesta inmunitaria innata de ZIKV.

NS5 tiene una baja tasa de replicación, formando un complejo replicador junto a la proteína NS3 con actividad helicasa en el virus del Dengue [41]. Debido a que NS5 es la proteína más conservada de todas las proteínas de los flavivirus, podemos postular que algo similar podría ocurrir con ZIKV. La Lisina 330 es un residuo implicado en la asociación con NS3 [37], susceptible de sufrir PTM, por lo que se quiso poner de manifiesto cómo esta lisina, su modificación afectaría a la capacidad de NS5 para inhibir la producción de IFN-I.

Para ello, se mutó el residuo 330 para hacer un intercambio por alanina, formando el mutante NS5-K330A y, además, sometiéndolo a una sobreexpresión de ubiquitina.

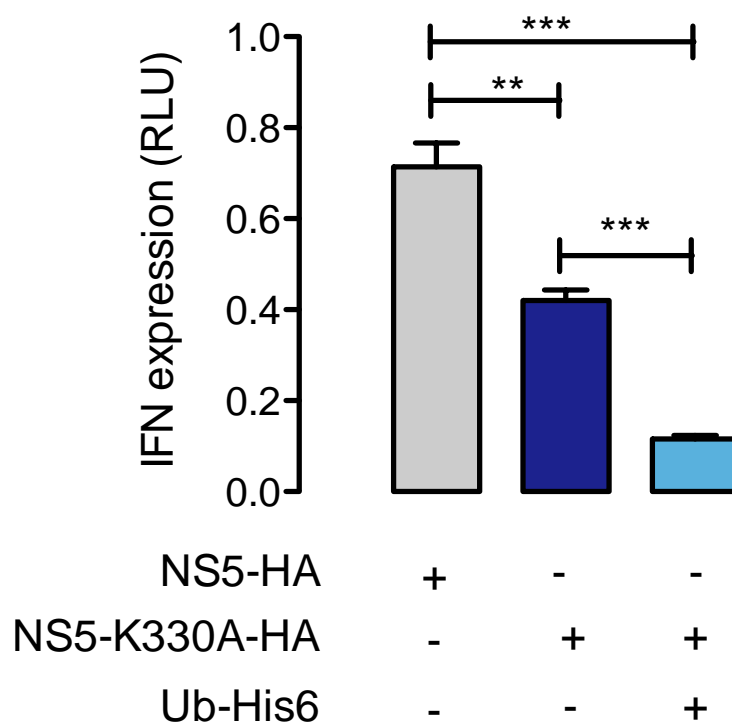


Figura 23: Expresión de IFN-I del mutante NS5-K330A. El IFN-I expresado como RLU (Relative Luminescence Units) sin normalizar para el constructo NS5 parental (NS5-HA) (Izquierda, 0,714450 ± 0,12788 RLU), una muestra problema con el mutante (Centro, 0,4199 ± 0,0235 RLU) y una muestra problema con el mutante y sobreexpresión de ubiquitina (Derecha, 0,1159 ± 0,0077 RLU). El p-valor la prueba T-Student: ** = 0,001, *** < 0,001. Figura creada con GraphPad Prism.

Tanto NS5 como el mutante K330A suprimen la producción de IFN-I (Figura 23), siendo más eficaz la inhibición con el mutante NS5-K330A (Figura 23). Esto sugiere que la modificación del residuo K330 en NS5 afecta su función anti-IFN-I, mostrando una mayor potencia inhibidora en el mutante. A su vez, La ubiquitinación de NS5-K330A provoca un drástico descenso en la producción de IFN-I, posiblemente debido a la falta de estimulación adecuada de RIG-I, mostrando más eficacia inhibitoria (Figura 23). No se puede excluir que otros residuos del mutante NS5-K330A se ubiquitinen, pero sería lógico observar una pérdida de

la función inhibidora de NS5 en estas condiciones, ya que sería una etiqueta de degradación de NS5, y vemos mayor potencia inhibidora del mutante K330A en estas condiciones experimentales.

El análisis estadístico por test de ANOVA (p -valor < 0,001) indica que el mutante NS5-K330A y la expresión de ubiquitina son determinantes a la hora de medir la producción de IFN-I. El coeficiente R^2 ajustado (0,903) muestra una fuerte asociación entre la producción IFN-I y la lisina 330.

Estos datos indican que el mutante NS5-K330A puede bloquear la producción de IFN-I con máxima eficacia. Esto podría estar arrojando luz sobre un mecanismo de degradación de NS5 mediado por ubiquitinación del residuo K330 y activación de su degradación por la ruta autofágica (Figura 24). NS5-K330A no podría ubiquitinarse en esta posición mutada y sería estable en la célula, actuando plenamente en la inhibición de la producción de IFN-I.

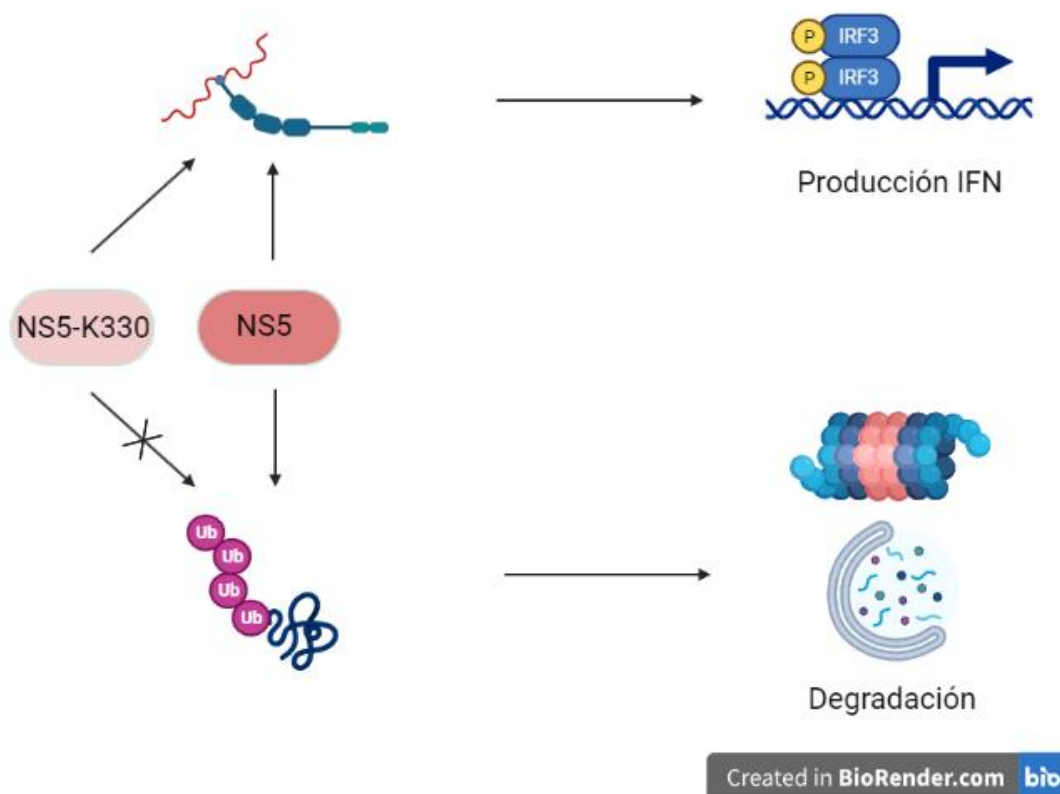


Figura 24: Esquema de la importancia de la lisina 330 de NS5. Tanto el WT como el mutante son capaces de inhibir la producción de IFN-I al no requerirse esa lisina específica para su interacción con RIG-I, no obstante, la pérdida de esta lisina provoca la aparente acumulación de NS5 y podría estar siendo fundamental para su estabilidad en la célula. Figura creada con BioRender.

En resumen, en este Trabajo Final de Máster, se ha validado un modelo celular y de trabajo que muestra sensibilidad en la detección de ARN foráneo (3p-hpRNA), simulando la infección viral para estudiar la respuesta inmunitaria innata, RIG-I dependiente sobre la producción de IFN-I. También hemos observado que la proteína NS5 suprime la respuesta inmunitaria a este

nivel y que las PTMs regularían su función anti-IFN-I y la estabilidad de la proteína viral, como vemos con el mutante NS5-K330A y la inhibición de la autofagia por 3-MA.

La ubiquitinación y la SUMOilación, son cruciales para el equilibrio y homeostasis celular, pero los virus han desarrollado la capacidad de utilizar estas modificaciones para su beneficio. La relación entre la activación, degradación y PTM es estrecha. En el caso de NS5, la sobreexposición a ubiquitina y a SUMOilación parece revertir su actividad represora y reactivar la respuesta inmunitaria innata.

Se ha determinado que la lisina específica en la posición 330 de NS5 podría estar implicada en su degradación por autofagia, lo que podría tener un impacto en la supresión del IFN-I, como demuestra que NS5 sea mejor inhibidor de la producción de IFN-I cuando se inhibe la ruta o al mutar una posición sensible a ubiquitinación. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar esta relación de causa y efecto, incluyendo la repetición de las pruebas y la investigación de las proteínas celulares involucradas en esta posible vía degradativa.

Además, se plantea una estrategia terapéutica novedosa, donde no se busca neutralizar directamente la proteína infecciosa NS5 con anticuerpos o inhibiendo sus dominios catalíticos [20,42-44], sino alterando las modificaciones postraduccionales que pudiera sufrir NS5 en residuos clave como K330, para así modificar la función y estabilidad y permitir que la maquinaria celular pueda enfrentarse a la infección de manera natural, desarrollando la respuesta innata, IFN-I dependiente, correctamente.

6 Conclusiones

1. Las células HEK293T-Lucia son un buen modelo para el estudio de la producción de IFN-I de forma RIG-I dependiente.
2. La proteína viral NS5 interfiere con la producción de IFN-I de forma RIG-I dependiente.
3. La eficiencia de NS5 a inhibir la producción de IFN-I, RIG-I dependiente, está bajo el control de su estabilidad por la ruta de la autofagia, estando asociado, a su vez, a las modificaciones postraduccionales que puede sufrir NS5, como la ubiquitinación o la SUMOilación.
4. El residuo aminoacídico de lisina K330 en NS5 modula la potencia de NS5 para inhibir la producción de IFN-I, de forma RIG-I dependiente, al condicionar, a su vez, la estabilidad de la proteína NS5.

7 Bibliografía

1. Coronavirus Disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update. 2020. Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/> (accessed on 29 December 2020).
2. Statement on the 1st Meeting of the ihr Emergency Committee on the 2014 Ebola Outbreak in West Africa. 2014. Available online: <https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/en/> (accessed on 8 August 2014).
3. Who Statement on the First Meeting of the International Health Regulations (2005) (ihr 2005) Emergency Committee on Zika Virus and Observed Increa2se in

- Neurological Disorders and Neonatal Malformations. 2016. Available online: [https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations) (accessed on 1 February 2016).
4. Janeway, C.A., Jr.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 197–216.
 5. Meylan, E.; Tschopp, J.; Karin, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006, 442, 39–44.
 6. Suthar, M. S., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2013). Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003541.
 7. Serman, T.M.; Gack, M.U. Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the zika virus. *Viruses* 2019, 11, 970.
 8. Ngono, A.E.; Shresta, S. Immune response to dengue and zika. *Annu. Rev. Immunol.* 2018, 36, 279–308.
 9. Tonnerre, P.; Melgaço, J.G.; Torres-Cornejo, A.; Pinto, M.A.; Yue, C.; Blümel, J.; de Sousa, P.S.F.; de Mello, V.D.M.; Moran, J.; de Filippis, A.M.B.; et al. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute zika virus infection. *Nat. Microbiol.* 2020, 5, 76–83.
 10. García-Sastre, A. (2017). Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell host & microbe*, 22(2), 176-184.
 11. Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 487-524.
 12. Lowe, R., Barcellos, C., Brasil, P., Cruz, O. G., Honório, N. A., Kuper, H., & Carvalho, M. S. (2018). The Zika virus epidemic in Brazil: from discovery to future implications. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 96.
 13. Kuno, G., & Chang, G. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*, 152, 687-696.
 14. Cao, X., Li, Y., Jin, X., Li, Y., Guo, F., & Jin, T. (2016). Molecular mechanism of divalent-metal-induced activation of NS3 helicase and insights into Zika virus inhibitor design. *Nucleic acids research*, 44(21), 10505–10514.
 15. Liu, Y., Olagnier, D., & Lin, R. (2017). Host and viral modulation of RIG-I-mediated antiviral immunity. *Frontiers in immunology*, 7, 662.
 16. Laurent-Rolle, M., Morrison, J., Rajsbaum, R., Macleod, J. M. L., Pisanelli, G., Pham, A., ... & García-Sastre, A. (2014). The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell host & microbe*, 16(3), 314-327.
 17. Zhu, Z., Chu, H., Wen, L., Yuan, S., Chik, K. K. H., Yuen, T. T. T., ... & Chan, J. F. W. (2019). Targeting SUMO modification of the non-structural protein 5 of Zika virus as a host-targeting antiviral strategy. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 392.
 18. Jiang, X., Kinch, L. N., Brautigam, C. A., Chen, X., Du, F., Grishin, N. V., & Chen, Z. J. (2012). Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity*, 36(6), 959-973.
 19. Su, C. I., Tseng, C. H., Yu, C. Y., & Lai, M. M. (2016). SUMO modification stabilizes dengue virus nonstructural protein 5 to support virus replication. *Journal of virology*, 90(9), 4308-4319.
 20. Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and molecular life sciences*, 75, 1723-1736.
 21. Estevez-Herrera, J., Pérez-Yanes, S., Cabrera-Rodríguez, R., Márquez-Arce, D., Trujillo-González, R., Machado, J. D., ... & Valenzuela-Fernandez, A. (2021). Zika virus pathogenesis: a battle for immune evasion. *Vaccines*, 9(3), 294.

22. Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and molecular life sciences*, 75, 1723-1736.
23. Tan, M. J. A., Chan, K. W. K., Ng, I. H., Kong, S. Y. Z., Gwee, C. P., Watanabe, S., & Vasudevan, S. G. (2019). The potential role of the ZIKV NS5 nuclear spherical-shell structures in cell type-specific host immune modulation during ZIKV infection. *Cells*, 8(12), 1519.
24. Elshahawi, H., Syed Hassan, S., & Balasubramaniam, V. (2019). Importance of Zika virus NS5 protein for viral replication. *Pathogens*, 8(4), 169.
25. Deng, Y., Wang, Y., Li, L., Miao, E. A., & Liu, P. (2022). Post-Translational Modifications of Proteins in Cytosolic Nucleic Acid Sensing Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 2933.
26. Sun, X., Xian, H., Tian, S., Sun, T., Qin, Y., Zhang, S., & Cui, J. (2016). A hierarchical mechanism of RIG-I ubiquitination provides sensitivity, robustness and synergy in antiviral immune responses. *Scientific Reports*, 6(1), 29263.
27. Kimura, Y., & Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *The journal of biochemistry*, 147(6), 793-798.
28. Liu, H. M., Jiang, F., Loo, Y. M., Hsu, S., Hsiang, T. Y., Marcotrigiano, J., & Gale, M. (2016). Regulation of retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) activation by the histone deacetylase 6. *EBioMedicine*, 9, 195-206.
29. Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ... & García-Sastre, A. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell host & microbe*, 19(6), 882-890.
30. Laurent-Rolle, M., & Morrison, J. (2019). The role of NS5 protein in determination of host cell range for yellow fever virus. *DNA and cell biology*, 38(12), 1414-1417.
31. Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J. D., Ma, Z., Yang, L., ... & Zhang, Y. J. (2019). Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology*, 527, 180-187.
32. Ng, I. H., Chan, K. W. K., Tan, M. J. A., Gwee, C. P., Smith, K. M., Jeffress, S. J., ... & Vasudevan, S. G. (2019). Zika virus NS5 forms supramolecular nuclear bodies that sequester importin- α and modulate the host Immune and pro-inflammatory response in neuronal cells. *ACS infectious diseases*, 5(6), 932-948.
33. Conde, J. N., Schutt, W. R., Mladinich, M., Sohn, S. Y., Hearing, P., & Mackow, E. R. (2020). NS5 sumoylation directs nuclear responses that permit zika virus to persistently infect human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Virology*, 94(19), e01086-20.
34. Zhao, Z., Tao, M., Han, W., Fan, Z., Imran, M., Cao, S., & Ye, J. (2021). Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *The Journal of general virology*, 102(3).
35. Li, A., Wang, W., Wang, Y., Chen, K., Xiao, F., Hu, D., ... & Wu, J. (2020). NS5 conservative site is required for Zika virus to restrict the RIG-I signaling. *Frontiers in immunology*, 11, 51.
36. Hay-McCullough, E., & Morrison, J. (2021). Contributions of Ubiquitin and Ubiquitination to Flaviviral Antagonism of Type I IFN. *Viruses*, 13(5), 763.
37. Tay, M. Y., Saw, W. G., Zhao, Y., Chan, K. W., Singh, D., Chong, Y., ... & Vasudevan, S. G. (2015). The C-terminal 50 amino acid residues of dengue NS3 protein are important for NS3-NS5 interaction and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2379-2394.
38. InvivoGen. (s. f.). 3p-hpRNA. <https://www.invivogen.com/3p-hprna>
39. Ke, P. Y. (2023). Crosstalk between Autophagy and RLR Signaling. *Cells*, 12(6), 956.
40. InvivoGen. (s. f.). 3-Methyladenine. <https://www.invivogen.com/3-methyladenine>
41. Tay, M. Y., & Vasudevan, S. G. (2018). The transactions of NS3 and NS5 in flaviviral RNA replication. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*, 147-163.

42. Ferreira, A. C., Zaverucha-do-Valle, C., Reis, P. A., Barbosa-Lima, G., Vieira, Y. R., Mattos, M., ... & Souza, T. M. L. (2017). Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short-and long-term sequelae. *Scientific reports*, 7(1), 9409.
43. Zmurko, J., Marques, R. E., Schols, D., Verbeken, E., Kaptein, S. J., & Neyts, J. (2016). The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004695.
44. Deng, Y. Q., Zhang, N. N., Li, C. F., Tian, M., Hao, J. N., Xie, X. P., ... & Qin, C. F. (2016). Adenosine analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 3, No. 4, p. ofw175). Oxford University Press.