

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

ROL DE LA CADENA PESADA DE LA MIOSINA NO MUSCULAR IIA EN LA INFECCIÓN VIRAL

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Matías Ponce – 209558

Tutor: Nicolás Sarute

2023

Declaración de autoría

Yo, Matías Ponce, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que: - La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo final de carrera de ingeniería en biotecnología; - Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad; - Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía; - En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas; - Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí; - Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' and 'P' intertwined within a circular shape.

Matías Ponce

13/3/23

Resumen

La miosina no muscular IIA (NM2) es una proteína de unión a actina con propiedades motoras y contráctiles, que participa en procesos celulares que requieren la generación de fuerza y motilidad celular, como ser la fagocitosis. Nuestro grupo recientemente mostró que la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA), un inhibidor de la fagocitosis limita la internalización de virus envueltos a células humanas. SIRPA es una glicoproteína transmembrana cuya señalización celular regula negativamente la fagocitosis dependiente de actina filamentosa debido a la desfosforilación de distintos sustratos proteicos, incluyendo la cadena pesada (MYH9) de NM2 en los residuos de tirosina (Y) 277 y 1805. La fosforilación de MYH9 en dichos residuos es indispensable para su activación y función motora durante la ingestión fagocítica.

En la presente Tesis, demostramos que MYH9 aumenta los niveles de infección/internalización de los arnavirus Tacaribe y virus de la coriomeningitis linfocítica, mediante técnicas de silenciamiento genético mediado por ARN de interferencia, sobreexpresión de constructos plasmídicos, e inhibición farmacológica de su actividad ATPasa. Además, mostramos que la fosforilación en los residuos 277/1805Y es esencial para su función en la entrada viral y que la familia de quinasas de tirosina no receptoras (NRTyrK) Src sería responsable de dicha fosforilación. La identificación de las quinasas responsables de fosforilar y activar MYH9 durante la entrada viral, ofrece nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias antivirales de amplio espectro.

Palabras clave: MYH9; entrada viral; quinasas de tirosina no receptoras.

Índice

1.	Introducción.....	6
2.	Objetivos	12
3.	Materiales y métodos	13
3.1	Cultivo celular	13
3.2	Clonación molecular en bacterias E. coli quimiocompetentes	13
3.3	Extracción de ADN plasmídico y secuenciación	13
3.4	Extracción de ARN y retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)	13
3.5	Silenciamiento (knockdown) de MYH9 endógeno y evaluación por RT-qPCR.....	15
3.7	Análisis de infección viral por RT-qPCR.....	16
3.8	Ensayo de inhibición de la actividad ATPasa de MYH9 con blebbistatin.....	16
3.9	Ensayos de adsorción e internalización viral.....	16
3.10	Ensayo de internalización viral utilizando inhibidores de quinasas Src y Syk.....	16
3.11	Ensayo de internalización viral con silenciamiento de MYH9 e inhibidores de quinasas Src ..	17
4.	Resultados	18
4.1	El fármaco blebbistatin reduce la infección de TCRV y LCMV	18
4.2	Silenciamiento de MYH9 mediante ARN de interferencia y sobreexpresión de MYH9-WT y mutantes.....	18
4.3	MYH9 no participa en la adsorción viral a nivel de la membrana plasmática	19
4.4	MYH9 facilita la internalización de TCRV y LCMV	20
4.5	Análisis de sobreexpresión de los constructos por microscopía de epifluorescencia y western blot.....	20
4.6	La sobreexpresión de MYH9 WT aumenta los niveles de infección viral respecto a los mutantes 2F, 277F y 1805F	22
4.7	El inhibidor de quinasas Scr PP1 reduce los niveles de internalización viral	22
4.8	Los residuos 277Y/1805Y de MYH9 podrían ser fosforilados por quinasas de tirosina no receptoras de la familia Src.....	23
5.	Discusión.....	24
6.	Conclusiones.....	28
7.	Referencias bibliográficas	29
8.	Anexos	32

8.1	Anexo 1: Constructos plasmídicos	32
8.2	Anexo 2: Protocolos.....	32
	A. Aislamiento de ADN plasmidico total de bacterias E. coli con el kit Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB):.....	32
	B. Aislamiento de RNA total de células con el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek):	33
	C. Silenciamiento del gen de MYH9 mediante un ARN pequeño de interferencia (siRNA)..	33
	D. Transfección de constructos plasmídicos de MYH9-WT, 2F, 3A, 277F y 1805F fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP)	34
	E. Infección de células con TCRV y LCMV por 24 horas.....	34

1. Introducción

La miosina no muscular IIA (NM2) es una proteína citoplasmática de unión a actina, ampliamente expresada en distintos tipos celulares y tejidos que participa en procesos celulares que requieren la generación de fuerza quimio-mecánica intracelular y la translocación del citoesqueleto de actina (Fig. 1). Las funciones de NM2 están reguladas por la fosforilación de sus cadenas ligeras (esencial y regulatoria), de su cadena pesada (MYH9) y por interacciones con otras proteínas. La fosforilación de los residuos de serina 19 y treonina 18 de MYH9 favorece la formación de los filamentos de actina (1-3).

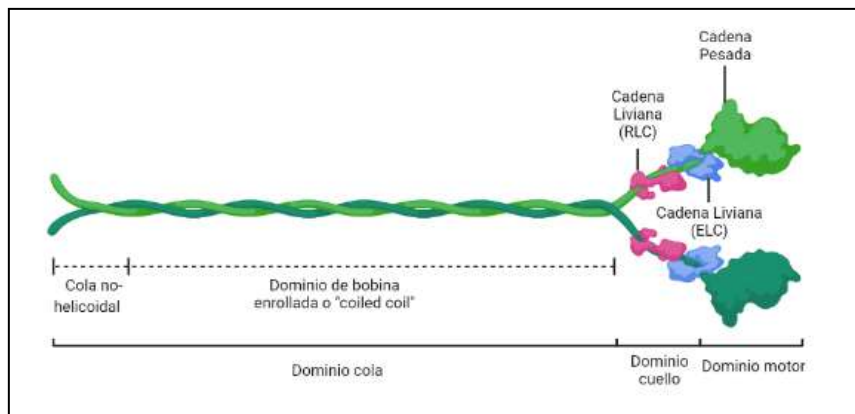


Figura 1. Estructura de la miosina no muscular IIA (NM2). NM2 es un hexámero compuesto por dos cadenas pesadas (verde) y cuatro cadenas ligeras: dos reguladoras (RLC, rosa) y dos cadenas ligeras esenciales (ELC, azul). El complejo NM2 se puede dividir estructuralmente en tres regiones: el dominio motor, el dominio cuello y el dominio cola (compuesto por el dominio "coiled-coil" o de bobina enrollada y el dominio de cola no helicoidal). El dominio motor de la cadena pesada incluye los sitios de unión de ATP y actina. Las cadenas ligeras se asocian con las cadenas pesadas en el dominio cuello. Creado con Biorender.

Resultados preliminares de nuestro grupo muestran que MYH9 favorece la infección de los virus endocíticos Tacaribe (TCRV), virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV), virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) y virus Zika (ZIKV) en células humanas, mientras que su actividad no influye en la infección del virus de la leucemia del ratón (MLV), un retrovirus que fusiona su membrana a nivel de la membrana plasmática celular (Fig. 2).

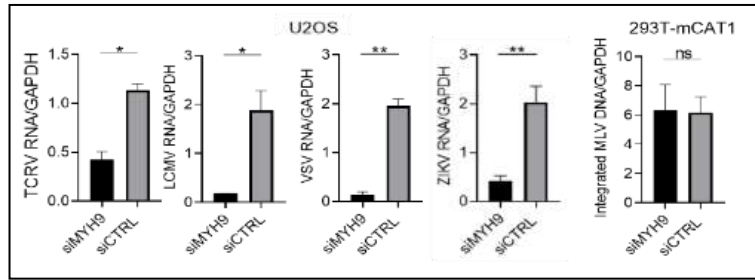


Figura 2. El silenciamiento de la expresión de MYH9 disminuye los niveles de infección de virus endocíticos. Células U2OS y 293T-mCAT1 se transflectaron con un ARN pequeño de interferencia (siRNA) para silenciar la expresión de MYH9 (siMYH9) y un siRNA control (siCTRL), y se infectaron con los virus indicados 48 hs después de la transfección. Los niveles de ARN/ADN viral fueron cuantificados por RT-qPCR. Se muestra el promedio y la desviación estándar (DE) \pm de 5 experimentos independientes.

A su vez, nuestro equipo demostró que la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA), un regulador negativo de la fagocitosis dependiente de actina filamentosa, limita la internalización de virus envueltos a células humanas (4). SIRPA es una glicoproteína transmembrana cuya señalización celular inhibe la fagocitosis, debido a la defosforilación de MYH9 y otros sustratos proteicos. La fosforilación de MYH9 en los residuos 277/1805Y es indispensable para su activación y función motora durante la ingestión fagocítica (Fig. 3) (5-9).

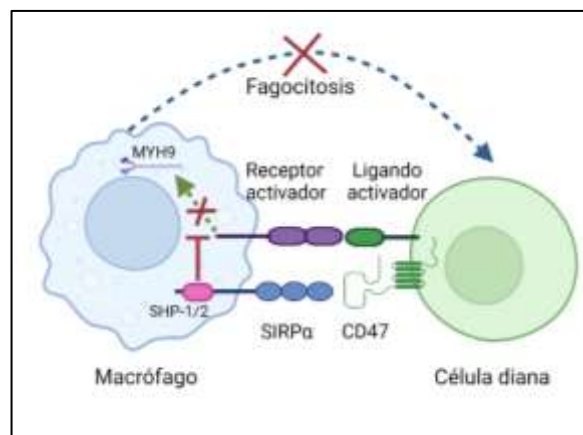


Figura 3. Rol de MYH9 y SIRPA en la fagocitosis. SIRPA posee dos inmunorreceptores con motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM)-1 y -2 en su dominio citoplasmático. La fosforilación de tirosina de los ITIMs de SIRPA mediada por su interacción con la proteína CD47 en células diana, proporciona sitios de acoplamiento para el reclutamiento y la activación de las fosfatasas citosólicas SHP-1 y 2, iniciando una cascada de señalización que conduce a la defosforilación de diferentes sustratos, incluyendo MYH9, bloqueando finalmente la fagocitosis dependiente de actina filamentosa. Creado con Biorender.

En este proyecto, profundizaremos en el análisis del rol de MYH9 en la infección por los arenavirus Tacaribe (TCRV) y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y como su modulación farmacológica influye sobre los niveles de infección.

Los arenavirus son una familia de virus envueltos con genoma de ARN de cadena negativa y bi-segmentado, que se dividen en dos grandes serogrupos: arenavirus del Viejo Mundo (OWA) y del Nuevo Mundo (NWA). Los OWA son nativos de África, como el virus Lassa y LCMV, mientras que los NWA, como TCRV y el virus Junín, se distribuyen en las Américas. Todos los arenavirus patogénicos humanos conocidos son zoonóticos. La transmisión zoonótica de arenavirus se produce principalmente a través de la inhalación de excreciones, abrasiones en la piel e ingestión de productos contaminados provenientes de roedores silvestres (10, 11). Los arenavirus patogénicos causan fiebre hemorrágica severa en humanos, por lo tanto, el trabajo con estas cepas se restringe a laboratorios con niveles de bioseguridad (BSL, por sus siglas en inglés)-4. Debido a ello, se han desarrollado varios sistemas sustitutos, como pseudovirus o "virus-like particles" para analizar etapas específicas del ciclo infeccioso, o se utilizan arenavirus de baja patogenicidad o no patogénicos para humanos, como ser LCMV y TCRV, para el trabajo en cultivo celular y con modelos animales (12, 13).

Dentro de los OWA, LCMV es el único que tiene una distribución mundial. El reservorio natural de LCMV es el ratón doméstico, por lo cual este virus es un modelo de virología experimental e inmunología ampliamente utilizado *in vivo*. Si bien LCMV no es un patógeno relevante para adultos inmunocompetentes, puede causar complicaciones en individuos trasplantados o cuando ocurren infecciones prenatales (12, 14). LCMV está estrechamente relacionado con el virus Lassa (LASV) dentro del mismo grupo filogenético. LASV es endémico de África occidental y es el agente causal de la fiebre hemorrágica Lassa. Se estima que ocurren más de 300.000 casos de infección por LASV por año, con altas tasas de fatalidad en pacientes hospitalizados (14).

El receptor celular de LCMV es la proteína α -dístroglicano (α -DG), un receptor de superficie para proteínas de la matriz extracelular. Tras la adsorción inicial mediada por α -DG, LCMV es internalizado a la célula diana a través de vesículas de paredes lisas no recubiertas por clatrina. Después de la internalización, las vesículas conteniendo partículas virales se acidifican a medida que trafican por la vía endosomal. La fusión de la membrana viral con la membrana endosomal ocurre cuando el pH decae a 5.3-5.5, correspondiente al pH de endosomas tardíos. La reducción del pH desencadena cambios conformacionales en la glicoproteína (GP) de LCMV, exponiendo un péptido de fusión que media la fusión de las membranas viral y celular (14). (Figura 6)

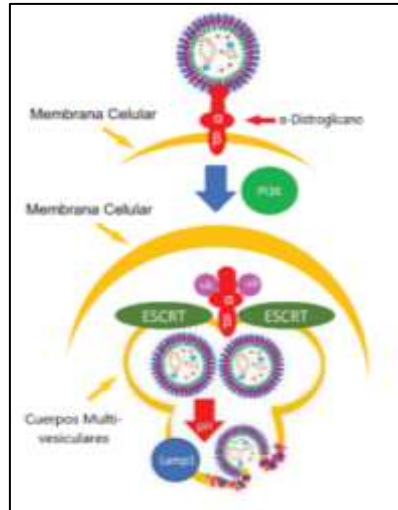


Figura 4. Esquema de las etapas de adsorción e internalización de OWA.
Modificado de Brisse y Ly, 2019.

Los NWA, por su parte, se dividen en cuatro clados filogenéticos (A-D), donde los NWA causantes de fiebres hemorrágicas, como Junín y Machupo, se agrupan en el clado B. Curiosamente este clado también incluye NWA no patogénicos como Amaparí, Cupixi y TCRV (11). La mayoría de los reservorios naturales de los NWA del clado B son roedores de la subfamilia *Sigmodontinae*, con excepción de TCRV que es transmitido por el murciélago de la fruta (15).

Los NWA del clado B utilizan el receptor de transferrina 1 (TfR1) de su huésped natural como receptor celular, y se especula que los NWA patogénicos de este clado adquirieron incidentalmente la capacidad de unirse a TfR1 humano y causar zoonosis. Por lo tanto, la capacidad de un NWA de usar TfR1 humano es predictivo de su capacidad patogénica y de causar fiebre hemorrágica. Por ejemplo, los NWA no patogénicos Amapari y TCRV pueden infectar y replicarse en células humanas, pero lo hacen independientemente del receptor TfR1 (11, 13). A diferencia de los OWA, los NWA ingresan a la célula por endocitosis mediada por clatrina, luego de su unión al receptor celular (TfR1 u otra proteína). (Figura 5)

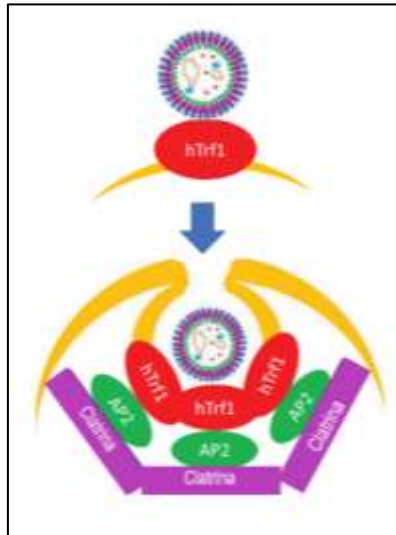


Figura 5. Esquema de las etapas de adsorción e internalización de NWA.
Modificado de Morgan Brisse y Ly, 2019.

Tomando como base los resultados obtenidos mediante silenciamiento de MYH9 (Fig. 2), en este proyecto profundizaremos en el análisis de la función de MYH9 en la infección viral. Para ello, determinaremos que etapa del ciclo viral está modulada por la actividad de MYH9, si la fosforilación de los residuos 277/1805Y es relevante para dicha actividad, y si la inhibición de la función de MYH9 en la infección viral podría considerarse para el desarrollo de nuevas terapias antivirales basadas en pequeñas moléculas o biofármacos. Debido a las funciones fundamentales que tiene MYH9 a nivel celular, no es posible depletar su expresión con fines terapéuticos. Por lo tanto, la inhibición/silenciamiento de moléculas capaces de activar a MYH9, cómo ser quinasas celulares, aparece como una estrategia adecuada para reducir su actividad proviral.

La mayoría de las moléculas antivirales aprobadas en la actualidad, actúan específicamente sobre componentes virales (proteínas estructurales, enzimas, etc). Estos inhibidores además de tener un espectro de acción reducido favorecen el desarrollo de resistencia. Una alternativa explotada en las últimas décadas es el uso de fármacos (agentes químicos y biomoléculas) que actúan sobre proteínas del huésped, entre ellas distintos tipos de quinasas (16). Las quinasas representan un grupo de blancos terapéuticos involucrados en la progresión de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, artritis reumatoide, Alzheimer, e infecciones virales. Dado que existe una variedad de inhibidores de quinasa efectivos en modelos clínicos y preclínicos para el tratamiento de infecciones virales, como ser baricitinib (SARS-CoV-2), sunitinib (virus de la Hepatitis C) y dasatinib (virus de la Inmunodeficiencia Humana) (16, 17), la posibilidad de inhibir y/o modular la actividad de la(s) quinasa(s) de tirosina responsables de fosforilar y activar MYH9 durante la infección viral, representa una estrategia racional para limitar infecciones virales.

La quinasa de tirosina responsable de fosforilar los residuos 277/1805Y debe ser del tipo no receptora ya que estas quinasas participan en la transducción de señales a nivel intracelular de estímulos que se originan en un receptor extracelular. Las tirosina quinasas no receptoras en mamíferos se clasifican en 9 subfamilias según las similitudes de secuencia, principalmente dentro de los dominios de quinasa. Estas quinasas incluyen las familias Abl, FES, JAK, ACK, SYK, TEC, FAK, Src y CSK (18). En este proyecto, se analizarán en primer lugar las quinasas Src debido a que Almeida y cols (2015) demostraron que estas quinasas son responsables de fosforilar el residuo 158Y de MYH9 durante la invasión de la bacteria *Listeria monocytogenes* (Almeida et al., 2015). Las Src están implicadas en procesos fisiológicos como motilidad celular, diferenciación y progresión del ciclo celular (19). También se estudiará la quinasa spleen tyrosine kinases (SYK), debido a su función moduladora en la señalización mediada por receptores activadores Fcγ (20).

2. Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es analizar el rol de MYH9 en el ciclo infectivo de LCMV y TCRV, mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar si la expresión ectópica de MYH9 aumenta los niveles de infección de LCMV y TCRV.
2. Determinar en qué etapa del ciclo viral actúa MYH9.
3. Determinar si la fosforilación de los residuos 277/1805Y modula la actividad de MYH9 en la infección viral y, en caso afirmativo, analizar cómo la inhibición de dicho proceso afecta los niveles de infección viral.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivo celular

Se cultivaron células A549 (adenocarcinoma de pulmón) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37°C y 5% CO₂. Las células se mantuvieron mediante pasajes 1:5 cada 72-96 hs.

3.2 Clonación molecular en bacterias *E. coli* quimiocompetentes

Se transformaron bacterias *E. coli* 5-alpha (New England Biolabs; NEB #C2987H) con los plásmidos CMV-GFP-NMHC II-A (#11347) (Anexo 1A) y pEGFP-NMHC-IIA-3xA (#101041) (Anexo 1B) adquiridos de Addgene, que expresan la secuencia codificante de MYH9 *wild-type* (WT) y de MYH9 con las mutaciones S1915A, S1916A, S1943A (3A), respectivamente. Los mutantes Y1805F (1805F), Y227F (277F) y un doble mutante Y277F-Y1805F (2F) se encontraban disponibles previamente en el laboratorio.

3.3 Extracción de ADN plasmídico y secuenciación

Se plaquearon las bacterias transformadas en placas LB agar con kanamicina 50 µg/ml a 37 °C por 16 hs. Posteriormente, se picaron 3 clones y se pasaron a tubos con 3 ml de medio LB líquido con kanamicina 50 µg/ml y se incubaron por 16 hs a 37 °C y agitación a 300 rpm. Se extrajo el ADN plasmídico de cada cultivo bacteriano utilizando el kit Monarch® Plasmid Miniprep (NEB #T1010S) según se detalla en el Anexo 2A y se envió a secuenciar el ADN al servicio de secuenciación de la unidad de biología molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.4 Extracción de ARN y retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN total fue aislado de las células con el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek #17270) según se detalla en el Anexo 2B. La retrotranscripción (RT) del ARN fue realizada con la enzima SuperScript II (SS II; Invitrogen #18064-022) utilizando los reactivos que se muestran en la Tabla 1 y el programa que se detalla en la Figura 6 en el termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700. El ADN complementario (ADNc) obtenido se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo #4367659) (Tabla 3) y cebadores específicos (primers) para la amplificación de las nucleoproteínas (NP) virales y del gen *housekeeping* GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) utilizado como referencia (Tabla 2).

La reacción de qPCR se realizó en el termociclador Applied Biosystems, QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System con el programa detallado en la Figura 7.

Tabla 1. Reactivos utilizados en la reacción de retrotranscripción (RT)

	Reactivo	Volumen (µl)
Mix 1	Hexámeros al azar (50 ng)	1
	dNTPs (10 mM)	1
	ARN (50-100 ng)	5
	ddH2O	5
Mix 2	5X First-Strand Buffer	4
	DTT (0.1M)	2
Mix 3	Retrotranscriptasa SS II	0,5

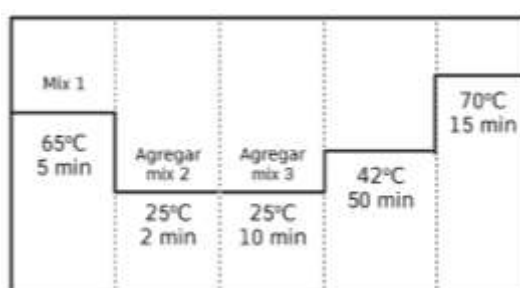


Figura 6. Programa utilizado para la reacción RT. Se indica la temperatura y el tiempo de incubación de cada paso.

Tabla 2. Listado de primers específicos utilizados durante ensayos de qPCR.

Gen	Primer Forward	Primer reverse
<i>MYH9</i>	5'-CCT TCC GAC AAG AGT GGC TTT-3'	5'-GAG TAG TAA CGC TCC TTG AGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCC CTT CAT TGA CCT CAA CTA CA-3'	5'-CGC TGG AGG ATG GTG AT-3'
<i>LCMV-NP</i>	5'-AGA ATC CAG GTG GTT ATT GCC-3'	5'-GTT GTA GTC AAT TAG TCG CAG C-3'
<i>TCRV-NP</i>	5'-TCG GTC ACA GAT GGG ACC AGG-3'	5'-CAG GGT TCT TCA CGT CCT CTG-3'

Tabla 3. Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Reactivo	Volumen (1 tubo)
Master mix (SYBR green) (2X)	5 µl
Primer Forward (10µM)	0.2 µl
Primer Reverse (10µM)	0.2 µl
cDNA (100-250 ng/µl)	2 µl
ddH2O	2.6 µl
	Vf = 10 µl

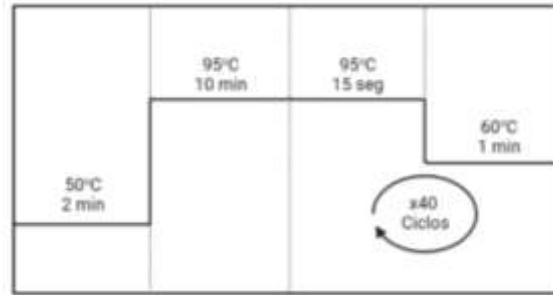


Figura 7. Programa utilizado para qPCR. Se indica la temperatura, el tiempo y el número de ciclos de cada paso

3.5 Silenciamiento (knockdown) de MYH9 endógeno y evaluación por RT-qPCR

Se realizó el silenciamiento de MYH9 endógeno en células A549 utilizando el reagente MISSION® siRNA Transfection Reagent (Sigma Aldrich # S1452), siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 2C). Para ello se utilizó un ARN de interferencia pequeño (siRNA) que hibrida con la secuencia codificante de MYH9 (siMYH9) (Invitrogen #4427037) y un siRNA control que no hibrida con ningún mRNA celular conocido (siCtrl) (Invitrogen #AM4611). 48 hs post-transfección, se aisló el ARN total de las células y se cuantificó el ARN viral por RT-qPCR.

3.6 Sobreexpresión de MYH9-GFP WT y mutantes en células A549 y análisis por microscopía de epifluorescencia y western blot

Se sembraron 5×10^5 células A549 por pocillo en una placa de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C hasta llegar a una confluencia de 80-90%. Luego se transfectaron con los constructos MYH9-GFP WT, MYH9-GFP 2F, MYH9-GFP 277F, MYH9-GFP 1805F, MYH9-GFP 3A (control negativo) y pcDNA (vector vacío), utilizando Lipofectamine 3000 (Invitrogen™ #L3000001) según el protocolo descrito por el fabricante (Anexo 2D). En primera instancia, se observó la eficiencia de la transfección por microscopía de epifluorescencia en un microscopio invertido Olympus IX81, ya que las secuencias codificantes de MYH9 WT y mutantes están fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP). Dichas células fueron posteriormente lisadas utilizando buffer RIPA suplementado con el inhibidor de proteasas Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo #1862209), sonicator, clarificado por centrifugación a 13.000 rpm para analizar la expresión de MYH9 por western blot. En breve, los extractos proteicos se corrieron en gel de poli(acrilamida) al 10% y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). La expresión de MYH9 endógeno fue detectada utilizando un anticuerpo anti-MYH9 (Proteintech), mientras que las versiones sobreexpresadas se detectaron con un anticuerpo anti-GFP (Cell Signalling Technology; CST). Como referencia se analizó la expresión endógena de GAPDH utilizando un anti-GAPDH (CST).

3.7 Análisis de infección viral por RT-qPCR

Se transfectaron los constructos de en células *A549* como se detalló y 30 horas post-transfección se infectaron con LCMV o TCRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 partículas virales/célula (Anexo 2E). Se realizó el aislamiento de ARN total y la síntesis de ADNc 24 hs post-infección y se analizaron los niveles de infección por RT-qPCR (cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta CT$ utilizando la expresión de GAPDH como referencia) como fue descrito en punto 3.4.

3.8 Ensayo de inhibición de la actividad ATPasa de MYH9 con blebbistatin

Se sembraron 7×10^4 células U2OS en placas de 24 pocillos y 24 hs más tarde fueron tratadas con el fármaco blebbistatin 25 μM (Cayman Chemical), un inhibidor de la actividad ATPasa de MYH9, o dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo, previamente (1 h) y durante la infección con TCRV y LCMV por 1 h a 37 °C. Los niveles de infección viral se determinaron 24 hs post-infección por RT-qPCR como fue descrito en el punto 3.4.

3.9 Ensayos de adsorción e internalización viral

Ensayo de adsorción: se sembraron 7×10^4 células *A549* en placa de 24 pocillos y luego de 24 horas se infectaron con LCMV o TCRV a un MOI de 5 por 1 h en hielo, para favorecer la unión de las partículas virales a las proteínas de superficie celulares y para prevenir la internalización viral. Luego de esta incubación, se lavaron las células con 1X PBS frío tres veces, y se prosiguió con el aislamiento de ARN y el análisis por RT-qPCR como fue descrito en el punto 3.4.

Ensayo de internalización: luego de la incubación viral en hielo y el lavado con 1X PBS descrito en el ensayo anterior, las células fueron suplementadas con medio DMEM con SFB 10% y se incubaron a 37 °C por 45 minutos para que las partículas virales sean endocitadas. Una vez concluido este período, las células se lavaron con 1X PBS frío 3 veces y se incubaron en hielo con proteinasa K 1mg/ml (Gibco) por 45 min. Se prosiguió removiendo la proteinasa K y agregando fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5 minutos y se prosiguió con el aislamiento de ARN y la RT-qPCR como fue descrito en el punto 3.4.

3.10 Ensayo de internalización viral utilizando inhibidores de quinasas Src y Syk

Se sembraron células *A549* en placa de 24 pocillos y luego de 24 hs se incubaron con el inhibidor de quinasas Src PP1 (Thermo #539571) o el inhibidor de quinasa Syk piceatannol (Sigma #10083-24-6) a una concentración de 50 μM por 30 min y a 37 °C o DMSO como vehículo como se describió previamente en Almeida et. Al (19). Luego se prosiguió al ensayo de internalización viral con el inoculo

diluido en DMEM 2% FBS conteniendo los inhibidores a la concentración utilizada en el pretratamiento de las células.

3.11 Ensayo de internalización viral con silenciamiento de MYH9 e inhibidores de quinasas Src

Se sembraron 5×10^4 células A549 en placa de 24 pocillos y al alcanzar una confluencia de 60-70% se silenció la expresión de MYH9 mediante un siMYH9 y se utilizó un siCtrl como control. 48 hs post-silenciamiento se realizó un ensayo de internalización con el inhibidor PP1 a $50 \mu\text{M}$ en los pocillos transfectados con siMYH9 y siCTRL, utilizando DMSO (vehículo) como control.

4. Resultados

4.1 El fármaco blebbistatin reduce la infección de TCRV y LCMV

En la Figura 8 se observa que el tratamiento de células *U2OS* con el inhibidor de la actividad ATPasa de MYH9 blebbistatin, previamente y durante la infección con TCRV y LCMV, reduce los niveles de infección para ambos virus. Estos resultados confirman nuestras observaciones iniciales donde el silenciamiento de MYH9 mediado por siRNA disminuye los niveles de infección y sugiere que la actividad motora de MYH9 es relevante para su función durante la infección viral.

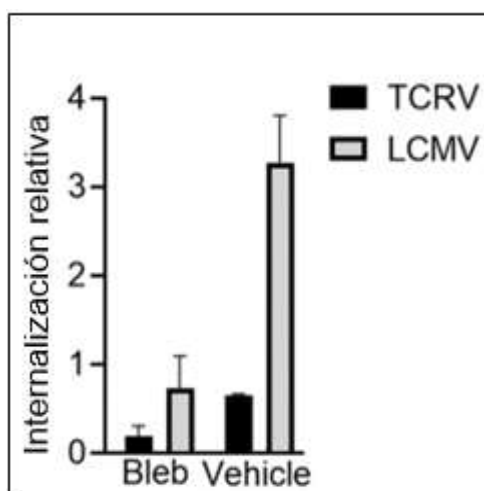


Figura 8. El fármaco blebbistatin reduce los niveles de infección viral de TCRV y LCMV. Se trataron células *U2OS* con el fármaco blebbistatin y se realizó un ensayo de internalización con un MOI de 5 para TCRV y LCMV. El ARN viral fue cuantificado por RT-Qpcr (Utilizando el vehículo como control negativo y GAPDH como gen de referencia).

4.2 Silenciamiento de MYH9 mediante ARN de interferencia

Se realizó un knockdown de MYH9 en células *A549* para posteriormente sobreexpresar los constructos plasmídicos de MYH9 WT y mutantes con el fin de analizar niveles de infección viral. El análisis por RT-qPCR de las células donde se realizó el knockdown de MYH9 muestra una disminución significativa en la expresión del mRNA de MYH9 en comparación con las células transfectadas con el siCTRL (control negativo) (Figura 9).

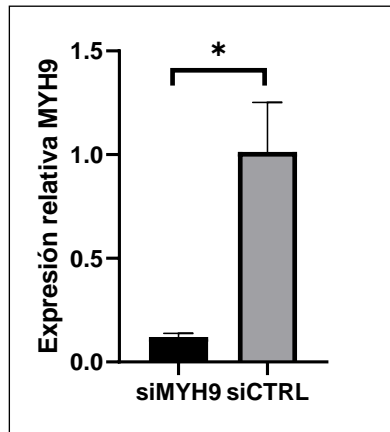


Figura 9. Knockdown de *MYH9* endógeno. Se silenció la expresión de *MYH9* en células *A549* por 48hs y se analizó su expresión mediante RT-qPCR respecto a un siCTRL. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 experimentos donde se utilizó unpaired T-test para determinar la significancia. *; $P \leq 0,05$ calculado con GraphPad.

4.3 *MYH9* no participa en la adsorción viral a nivel de la membrana plasmática

Al analizar por RT-qPCR el ensayo de adsorción viral, se observa que no hay una diferencia significativa entre la unión de partículas virales a las células transfectadas con siMYH9 o siCTRL, tanto para TCRV como para LCMV (Figura 10), sugiriendo que *MYH9* no participa directamente en la adsorción viral a nivel de la membrana plasmática.

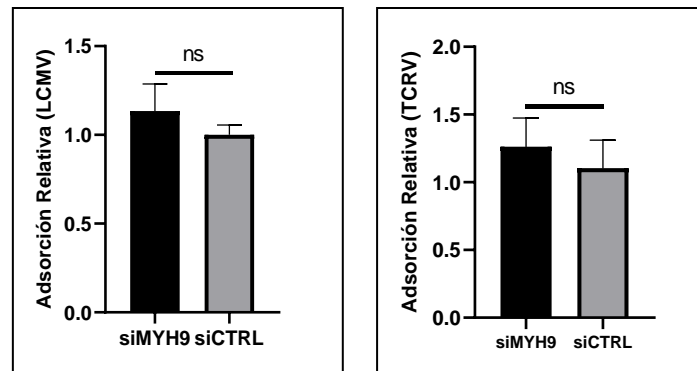


Figura 10. Los niveles de expresión de *MYH9* no influyen sobre la adsorción de LCMV y TCRV a células *A549*. Se silenció *MYH9* en células *A549* con ARN interferente siMYH9 por 72 hs y se realizó un ensayo de adsorción infectando a un MOI de 5. El ARN viral fue cuantificado por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 experimentos independientes. Se utilizó el análisis estadístico One-way ANOVA para determinar la significancia. ns; no significativo calculado con GraphPad.

4.4 MYH9 facilita la internalización de TCRV y LCMV

En la Figura 11 se observa que el silenciamiento de la expresión de MYH9 en células A549, mediante un ARN de interferencia siMYH9, reduce los niveles de internalización tanto para TCRV como para LCMV. Estos resultados indican que MYH9 estaría actuando en una etapa posterior a la adsorción de las partículas virales a las células y favoreciendo su internalización, semejante a su rol activo en la ingestión fagocítica.

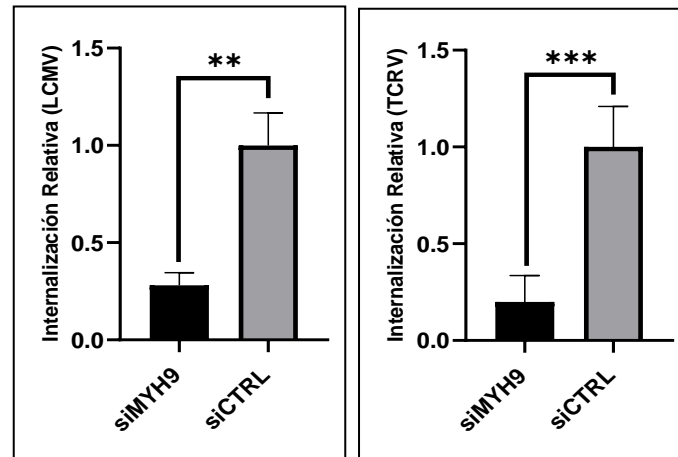


Figura 11. Los niveles de expresión de MYH9 modulan la internalización de LCMV y TCRV a células A549. Se silenció MYH9 en células A549 con un ARN interferente siMYH9 por 72 hs y se realizó un ensayo de internalización infectando a un MOI de 5. Los ácidos nucleicos virales fueron medidos por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2-3 experimentos donde se utilizó el unpaired T-test para determinar la significancia. **, $P \leq 0,001$, ***, $P \leq 0,0001$ calculado con GraphPad.

4.5 Análisis de sobreexpresión de los constructos por microscopía de epifluorescencia y western blot

Para analizar la contribución de la expresión ectópica de MYH9 WT y mutantes en la internalización viral, en primer lugar, evaluamos la posibilidad de silenciar la expresión endógena de MYH9 previamente a la transfección de los constructos plasmídicos. Para ello, realizamos el knockdown de MYH9 por un período de 96 hs para reducir los niveles de expresión de MYH9 celular y favorecer la dilución del siRNA mediante las sucesivas replicaciones celulares al momento de la sobreexpresión, y posteriormente transfectamos los constructos de MYH9 WT y mutantes por 24 hs para analizar la expresión de GFP mediante microscopía de epifluorescencia. En las células donde se realizó el knockdown de MYH9 previamente a la sobreexpresión de los constructos, se observa una expresión muy reducida de GFP, similar a la obtenida para aquellas células transfectadas con un vector vacío control (EV) (Figura 12A). Sin embargo, en aquellas células tratadas con un siCTRL se observa un alto porcentaje de células fluorescentes (Figura 12B). Debido a estos resultados, nuestros estudios posteriores de infección viral se realizaron en células transfectadas con constructos de MYH9 expresando niveles endógenos de la proteína (ensayos de ganancia de función).

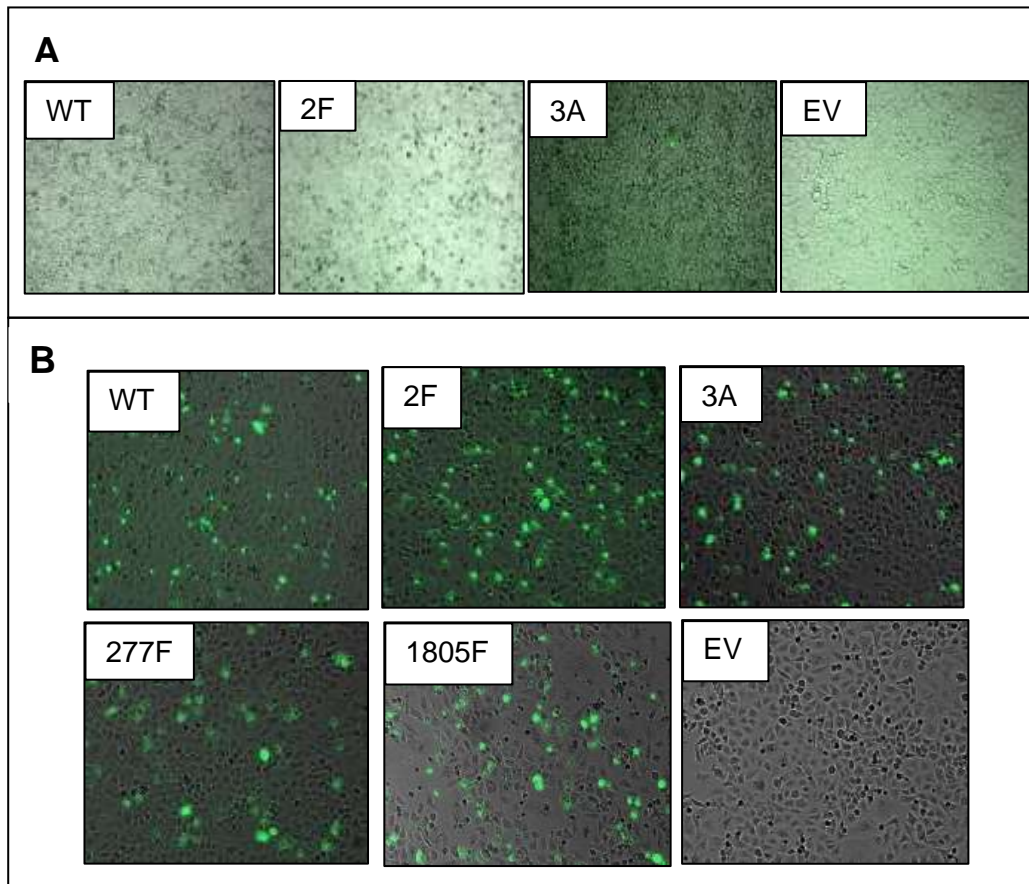


Figura 12. Microscopía de epifluorescencia de células A549 sobreexpresando los diferentes constructos MYH9-GFP con aumento 10X. A) Knockdown de MYH9 endógeno por 96 hs previo a la sobreexpresión de los constructos detallados en la figura. B) Transfección de un siCTRL previamente a la sobreexpresión de los constructos indicados.

Además de observar la sobreexpresión de los constructos por microscopía, también se analizó por medio de western blot. En la Fig. 13 se observa una banda a la altura de 226 kDa, correspondiente a la expresión de MYH9 endógeno, y por encima de dicha banda otra de tamaño superior (253 kDa), correspondiente a la expresión de los constructos + GFP en dos constructos representativos de MYH9 (WT y 2F) (Figura 13).

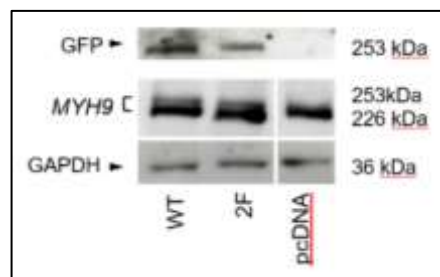


Figura 13. Western Blot de MYH9 endógeno y de los constructos WT y 2F sobreexpresados en células A549. La expresión de MYH9 endógeno fue detectado utilizando un anticuerpo anti-MYH9 (Proteintech), mientras que las versiones sobreexpresadas se detectaron con un anticuerpo anti-GFP (CST). Como referencia se analizó la expresión endógena de GAPDH utilizando un anti-GAPDH (CST).

4.6 La sobreexpresión de MYH9 WT aumenta los niveles de infección viral respecto a los mutantes 2F, 277F y 1805F

El análisis de los niveles de infección de LCMV y TCRV en células A549 sobreexpresando MYH9-GFP WT, muestra niveles de infección significativamente más elevados en comparación con el vector vacío pcDNA (ganancia de función) (Figura 14). Esta tendencia también se observó en células sobreexpresando el constructo MYH9-GFP 3A, el cual posee sustituciones de alanina en lugar de serina en tres residuos que no están involucrados en la actividad motora de MYH9 (1). Sin embargo, en aquellas células donde se sobreexpresaron los constructos MYH9-GFP 2F, MYH9-GFP 277F y MYH9-GFP 1805F, se observa que los niveles de infección de ambos virus no presentan diferencias significativas en comparación con las células transfectadas con el vector vacío control (Figura 14). Por lo tanto, estas versiones mutantes de MYH9 no aumentan los niveles de infección respecto a MYH9 endógeno, sugiriendo que la fosforilación de ambos residuos (277/1805Y) es relevante para la función de MYH9 en la entrada viral.

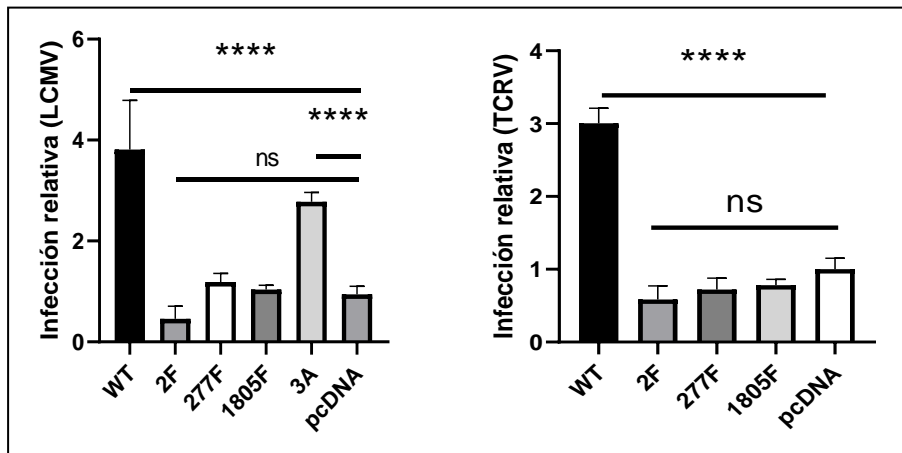


Figura 14. La expresión ectópica de MYH9 WT aumenta los niveles de infección viral respecto a los mutantes 2F, 277F y 1805F. Se transfectaron células A549 con los constructos plasmídicos WT, 2F, 277F, 1805F, 3A y pcDNA por 24hs y se infectaron con LCMV y TCRV a un MOI de 0.5 por 24hs. Los ácidos nucleicos virales fueron medidos por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 experimentos independientes. Se utilizó el análisis estadístico One-way ANOVA para determinar la significancia. ****; $P \leq 0,0001$, ns; no significativo calculado con GraphPad.

4.7 El inhibidor de quinasas Src PP1 reduce los niveles de internalización viral

En la Figura 15 se observan niveles de internalización viral inferiores en células tratadas con el inhibidor PP1 en comparación con el vehículo (DMSO) tanto para LCMV y TCRV. Estos resultados no se observaron para las células tratadas con piceattanol (PICE), las cuales presentaron niveles de internalización similares al vehículo para ambos virus, aunque aproximadamente un 20% mayor para LCMV. Estos resultados sugieren que las quinasas Src fosforilan proteínas involucradas en favorecer la entrada viral, entre las que podría incluirse MYH9.

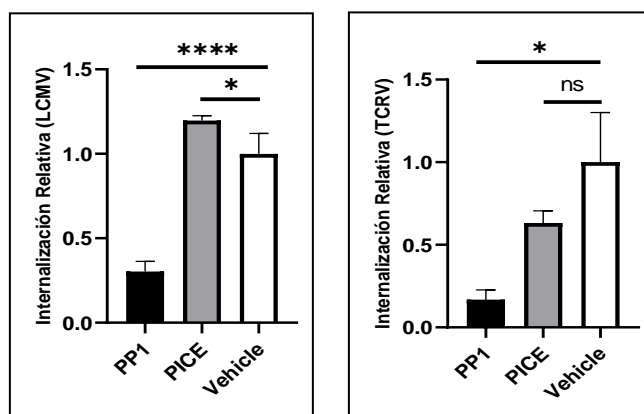


Figura 15. La inhibición de la familia de quinasas Src reduce los niveles de internalización viral. Se incubaron células A549 con PP1 y PICE a 37 C por 30 minutos y se realizó un ensayo de internalización viral con LCMV y TCRV. Los ácidos nucleicos virales se midieron por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2-3 experimentos independientes. Se utilizó el análisis estadístico One-way ANOVA para determinar la significancia. ****, $P \leq 0,0001$; *, $P \leq 0,05$; ns; no significativo calculado con GraphPad.

4.8 Los residuos 277Y/1805Y de MYH9 podrían ser fosforilados por quinasas de tirosina no receptoras de la familia Src

En la Figura 16 se observa que los niveles de internalización viral se reducen marcadamente en aquellas células donde se silenció la expresión de MYH9, aunque no se aprecian diferencias significativas entre las células tratadas con el inhibidor PP1 y el vehículo en estas condiciones. Es decir, no se observa un efecto aditivo en la reducción de los niveles de infección viral cuando tratamos con PP1 a las células transfectadas con un siMYH9, sugiriendo que la familia de quinasas no receptoras Src podría fosforilar los residuos 277Y y 1805Y.

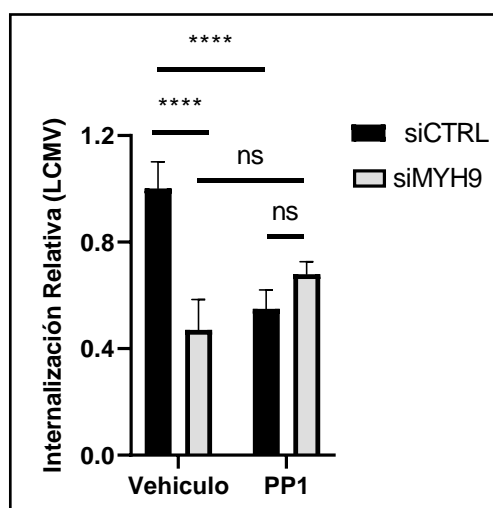


Figura 16. La familia de quinasas de tirosina no receptoras Src es responsable de la fosforilación de los residuos 277Y/1805Y de MYH9. Se trataron células A549 con ARN de interferencia siMYH9 y siCTRL y 48 hs después de realizar un ensayo de internalización con el inhibidor PP1 a un MOI de 5. Los ácidos nucleicos virales fueron medidos por RT-qPCR. Se muestra la desviación estándar (DE) \pm promedio de 2 experimentos independientes. Se utilizó el análisis estadístico One-way ANOVA para determinar la significancia. ****, $P \leq 0,0001$; ns; no significativo calculado con GraphPad.

5. Discusión

El primer paso en la entrada viral es el reconocimiento de las células huésped a través de receptores de membrana. Después de la unión a la superficie celular, los virus son internalizados mediante dos mecanismos principales: fusión directa a con la membrana plasmática o endocitosis mediada por receptor (EMR) (21). En la EMR, los virus explotan mecanismos endocíticos para transportarse a través de la vía endolisosomal y liberar su genoma en el citosol mediante el proceso de fusión. Después de la penetración, los virus explotan los sistemas de transporte citoplásmico de la célula, dirigiéndose a sitios de replicación específicos dentro del citosol o el núcleo (22).

La identificación de proteínas de la célula huésped que juegan un papel crítico en la entrada viral es un prometedor enfoque para el desarrollo de novedosas terapias antivirales. Se han descrito numerosas proteínas intracelulares capaces de promover la entrada viral, como ser las proteínas clatrina y dinamina que son esenciales para la endocitosis mediada por clatrina (22), la ubiquitina ligasa E3 ITCH que es fundamental para la liberación del virus de influenza de los endosomas tardíos (23), y la 7-deshidrocolesterol reductasa que facilita la infección por el virus Zika (24), entre otras. Otra proteína relevante para la entrada viral es la actina filamentosa, ya que la remodelación del citoesqueleto de actina es necesaria para el proceso de fusión virus-célula (25).

Dado el rol del citoesqueleto de actina en la entrada viral, las proteínas responsables de su activación podrían actuar como promotores de la internalización viral. NM2 es una proteína que participa en procesos celulares que requieren fuerza quimio-mecánica intracelular y translocación del citoesqueleto de actina, por lo cual podría tener un rol en la entrada viral. En este proyecto, analizamos si MYH9 tiene una función activa durante la infección viral y, de ser así, en qué etapa del ciclo viral participa.

En primer lugar, realizamos ensayos de inhibición de la actividad ATPasa de MYH9, utilizando el fármaco blebbistatin, observando que dicha inhibición redujo los niveles de infección de TCRV y LCMV, sugiriendo que MYH9 no solo tiene un rol proviral sino que éste estaría asociado a su actividad motora.

Mediante los ensayos de adsorción e internalización viral determinamos que la actividad de MYH9 favorece la internalización de TCRV Y LCMV, pero no su adsorción a células humanas. Estos resultados contrastan con estudios previos donde se identificó que MYH9 es un receptor celular que promueve la entrada del virus herpes simplex tipo 1 a células humanas, mediante la interacción directa con la glicoproteína de envoltura B del virus (26). En nuestro trabajo identificamos que MYH9 participa en la entrada viral en un paso posterior a la adsorción, lo cual podría asociarse a su rol en procesos celulares que requieren la organización espacio-temporal del andamiaje del citoesqueleto como endocitosis y exocitosis (27).

Luego de establecer que MYH9 favorece la internalización de TCRV y LCMV, evaluamos la posibilidad de modular los niveles de expresión celular de MYH9 con fines terapéuticos. MYH9 se expresa en altos niveles en la mayoría de los tipos celulares, y se ha demostrado que la delección de MYH9 es letal durante el desarrollo embrionario en ratones. Por lo tanto, no es posible inhibir completamente su

función *in vivo*, ni contar con células o animales *knockout* de MYH9 para estudiar su rol en la infección viral. Como alternativa, analizamos cuales residuos aminoacídicos son fosforilados durante la activación de MYH9 en los procesos que requieren fuerza motora/contráctil, con el objetivo de inhibir las quinasas responsables de dicho proceso. Tsai y Discher (2008) describieron que la fosforilación de los residuos de tirosina 277Y/1805Y de MYH9 es necesaria para su función en la ingestión fagocítica. Por lo tanto, analizamos el rol de dichas modificaciones en la infección por TCRV y LCMV utilizando constructos de MYH9 con sustituciones de F en 277/1805Y. En primera instancia realizamos un knockdown de MYH9 en células A549 por 4-5 días, para luego sobreexpresar los constructos de MYH9-WT y los mutantes con reemplazos de F en los residuos 277/1805. Sin embargo, como se observa en la Figura 12, el análisis por microscopia de epifluorescencia de aquellas células donde se realizó un knockdown de MYH9 previo a la sobreexpresión de los constructos plasmídicos, se observó una proporción mínima de células expresando GFP, en comparación con las células donde se transfectó un siCTRL previamente a la sobreexpresión. Concluimos entonces que el siMYH9 es capaz de silenciar la expresión de los constructos, incluso 4-5 días post-transfección del siRNA. Debido a esto, analizamos el efecto de los distintos constructos de MYH9 en los niveles de infección viral en células expresando niveles endógenos de dicha proteína, a través de ensayos de “ganancia de función” de MYH9 expresada ectópicamente.

Mediante los ensayos de ganancia de función, establecimos que la fosforilación de los residuos 277Y y 1805Y es esencial para facilitar la internalización de los virus endocíticos TCRV Y LCMV en células humanas, así como fue descrito para el proceso de fagocitosis (9). Si bien nuestros estudios se limitaron al análisis de TCRV y LCMV, es probable que estos residuos también deban ser fosforilados para que MYH9 participe activamente en la entrada de otros virus. Cómo se muestra en la Figura 2, el silenciamiento de MYH9 también disminuye los niveles de infección del flavivirus Zika y el rhabdovirus VSV. Por lo tanto, nuestro grupo tiene como objetivo expandir el análisis de la función de MYH9 en la infección por otras familias virales.

Dado el rol de los residuos 277/1805Y en la internalización viral, se consideró identificar a la quinasa(s) responsable de su fosforilación, lo cual podría representar un novedoso blanco para el tratamiento de infecciones virales. La desregulación de la señalización mediada por quinasas es un blanco terapéutico relevante para distintas áreas de la medicina, como ser cáncer y enfermedades inmunológicas, inflamatorias, degenerativas, metabólicas, cardiovasculares e infecciosas. Por lo tanto, las quinasas han sido intensivamente investigadas para el desarrollo de fármacos con diversas aplicaciones (28). En este trabajo, realizamos la inhibición farmacológica de las quinasas Src y Syk con las pequeñas moléculas PP1 y piceatannol, respectivamente, observando que solamente en las células tratadas con PP1 hubo una reducción en los niveles de infección de TCRV y LCMV. Un estudio previo demostró que las quinasas Src son responsables de fosforilar el residuo 158Y de MYH9 en infecciones bacterianas (19), por lo cual hipotetizamos en primera instancia que estas quinasas también podrían fosforilar los residuos 277/1805Y durante la entrada viral. En este sentido, se ha demostrado que la quinasa celular c-Src, perteneciente a la familia homónima, es esencial para el ensamblaje y la secreción del virus Dengue (DENV), y que los inhibidores de la familia Src dasatinib y saracatinib

inhiben el ensamblaje de viriones de DENV (29). Estos resultados, junto a los obtenidos en nuestro trabajo, sugieren que la familia de tirosina quinasas Src puede ser una diana terapéutica para combatir infecciones virales a través de la inhibición de distintas etapas del ciclo infeccioso.

Los ensayos de internalización viral con los inhibidores de quinasas PP1 y piceatannol sugieren que al menos un miembro de la familia Src promueve la internalización de ambos virus analizados a través de la fosforilación de uno o más sustratos proteicos. En el caso de las células tratadas con piceatannol e infectadas con LCMV, se observaron niveles de infección levemente superiores en comparación con el vehículo, lo cual puede asociarse a que la quinasa Syk podría fosforilar alguna proteína con efecto antiviral para LCMV. Para evaluar si algún miembro(s) de la familia Src es responsable de la fosforilación de los residuos 277/1805Y de MYH9, se realizó un nuevo ensayo de internalización donde se silenció MYH9 previamente al tratamiento con PP1. En estos ensayos se esperaba que el tratamiento con PP1 de células transfectadas con un siMYH9, redujera marcadamente los niveles de internalización viral pues puede haber otras proteínas blanco de las quinasas Src que participen en el proceso de internalización. Sin embargo, en la Figura 16 se observa que cuando realizamos el knockdown de MYH9 en presencia del inhibidor PP1 los niveles de infección no cambian significativamente respecto a las células tratadas con DMSO (vehículo). Este experimento muestra que no habría un efecto aditivo en los niveles de internalización viral cuando tratamos a las células con un siMYH9 y el inhibidor PP1, sugiriendo que la familia de quinasas no receptoras Src podría fosforilar los residuos 277Y y 1805Y. Estos resultados pueden sentar las bases para análisis posteriores que contribuyan al desarrollo de nuevas terapias antivirales dirigidas a la modulación de la actividad de MYH9.

Dentro de las posibles opciones terapéuticas, se incluye el uso de pequeñas moléculas inhibitorias activas contra la(s) quinasa(s) de la familia Src responsable de fosforilar 277/1805Y. Para ello, es necesario determinar previamente cual quinasa(s) es responsable de fosforilar MYH9 específicamente en el contexto de infección viral, y si otras tirosina quinasas no receptoras como Abl, FES, JAK, ACK, TEC, FAK y CSK estarían involucradas en el proceso. Otra posibilidad para explotar la actividad de MYH9 en la entrada viral con fines terapéuticos, es el desarrollo de biofármacos activos contra la quinasa(s) de tirosina responsable de su activación durante la infección una vez identificada. Por ejemplo, podría producirse un siARN que disminuya transitoriamente la expresión de la tirosina quinasa identificada y utilizarse en animales de experimentación para evaluar su potencial antiviral *in vivo*. Para ello, es necesario diseñar/utilizar un sistema de *delivery* que permita que la molécula administrada alcance su sitio blanco en el organismo. La entrega intracelular de moléculas biológicamente activas ha sido una de las limitantes principales de la biofarmacéutica, debido a que las membranas celulares lipofílicas restringen el ingreso directo de compuestos desde el medio extracelular, o bien son dirigidos a la vía endolisosomal donde serán degradados cuando ingresan a las células mediante endocitosis mediada por receptores. Como resultado, solamente una pequeña fracción del compuesto administrado será capaz de alcanzar su sitio blanco (citoplasma en el caso de siRNA) y realizar su función inhibitoria (30, 31). Para superar esta limitante, se han desarrollado distintos sistemas de *carrier*, como ser liposomas sensibles al pH, que permiten la liberación controlada del fármaco en el

citoplasma (32). Esta estrategia podría entonces emplearse para modular transitoriamente la activación de MYH9 durante infecciones virales y limitar su actividad proviral *in vivo*.

En resumen, en el presente trabajo de Tesis hemos demostrado que MYH9 es un factor celular proviral que promueve la internalización de TCRV Y LCMV, pero no así su adsorción a células humanas. Además, establecimos que la fosforilación de los residuos 277/1805Y es esencial para la función motora de MYH9 durante la entrada viral y que la familia de quinasas Src sería responsable de realizar dichas modificaciones en el contexto de infección viral. Como perspectivas, proponemos diseñar y sintetizar un constructo de MYH9 “resistente” al silenciamiento mediado por el siMYH9 utilizado, mediante la introducción de sustituciones sinónimas en la región de homología con el siRNA, con el objetivo de analizar la función de MYH9 expresado ectópicamente en células con expresión reducida de la MYH9 endógena. Por otro lado, profundizaremos en el análisis de la familia de quinasas Src para identificar cual miembro es responsable de fosforilar MYH9 durante la internalización viral, y si otras tirosina quinasas no receptoras también participan del proceso, con el fin de aportar elementos para el diseño y testeo biofármacos antivirales *in-vivo*.

6. Conclusiones

La cadena pesada de NM2, MYH9, posee propiedades motoras y contráctiles que contribuye a la internalización de los virus endocíticos LCMV y TCRV a células humanas. A su vez, los residuos de tirosina 277Y y 1805Y son esenciales para que MYH9 cumpla esta función en la entrada viral. Finalmente, concluimos que la familia de quinasas Scr sería responsable de fosforilar dichos residuos, lo que puede llevar al desarrollo biotecnológico de terapias antivirales capaces de inhibir estas quinasas.

7. Referencias bibliográficas

1. Rai V, Thomas DG, Beach JR, Egelhoff TT. Myosin IIA heavy chain phosphorylation mediates adhesion maturation and protrusion in three dimensions. *The journal of biological chemistry*. 2017;292(8):3099–3111. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m116.733402>.
2. Brito C, Sousa S. Non-muscle myosin 2A (NM2A): Structure, regulation and function. *Cells (Basel, Switzerland)*. 2020;9(7):1590. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9071590>.
3. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2009;10(11):778–790. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2786>.
4. Sarute N, Cheng H, Yan Z, Salas-Briceno K, Richner J, Rong L, Ross SR. Signal-regulatory protein alpha is an anti-viral entry factor targeting viruses using endocytic pathways. *PLoS pathogens*. 2021;17(6):e1009662. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009662>.
5. Barclay AN. Signal regulatory protein alpha (SIRP α)/CD47 interaction and function. *Current opinion in immunology*. 2009;21(1):47–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.008>.
6. Morrissey MA, Kern N, Vale RD. CD47 ligation repositions the inhibitory receptor SIRPA to suppress integrin activation and phagocytosis. *Immunity*. 2020;53(2):290-302.e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.008>.
7. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annual review of immunology*. 2014;32(1):25–50. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120142>.
8. Qu CK. The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell research*. 2000;10(4):279–288. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cr.7290055>.
9. Tsai RK, Discher DE. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *The journal of cell biology*. 2008;180(5):989–1003. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708043>.
10. Fedeli C, Moreno H, Kunz S. Novel insights into cell entry of emerging human pathogenic arenaviruses. *Journal of molecular biology*. 2018;430(13):1839–1852. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.026>.
11. Sarute N, Ross SR. New World Arenavirus biology. *Annual review of virology*. 2017;4(1):141–158. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-042001>.
12. Bonthius DJ. Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Seminars in pediatric neurology*. 2012;19(3):89–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2012.02.002>.

13. Roldán JS, Martínez MG, Forlenza MB, Whittaker GR, Candurra NA. Human transferrin receptor triggers an alternative Tacaribe virus internalization pathway. *Archives of virology*. 2016;161(2):353–363. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2652-3>.
14. Rojek JM, Perez M, Kunz S. Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology*. 2008;82(3):1505–1517. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01331-07>.
15. Holzerland J, Leske A, Fénéant L, Garcin D, Kolakofsky D, Groseth A. Complete genome sequence of Tacaribe virus. *Archives of virology*. 2020;165(8):1899–1903. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-020-04681-9>.
16. Raghuvanshi R, Bharate SB. Recent developments in the use of kinase inhibitors for management of viral infections. *Journal of medicinal chemistry*. 2022;65(2):893–921. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01467>.
17. García-Cárceles J, Caballero E, Gil C, Martínez A. Kinase inhibitors as underexplored antiviral agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2022;65(2):935–954. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00302>.
18. Siveen KS, Prabhu KS, Achkar IW, Kuttikrishnan S, Shyam S, Khan AQ, Merhi M, Dermime S, Uddin S. Role of non receptor tyrosine kinases in hematological malignances and its targeting by natural products. *Molecular cancer*. 2018;17(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-018-0788-y>.
19. Almeida MT, Mesquita FS, Cruz R, Osório H, Custódio R, Brito C, Vingadassalom D, Martins M, Leong JM, Holden DW, et al. Src-dependent tyrosine phosphorylation of non-muscle myosin heavy chain-IIA restricts *Listeria monocytogenes* cellular infection. *The journal of biological chemistry*. 2015;290(13):8383–8395. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.591313>.
20. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature reviews. Immunology*. 2010;10(6):387–402. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2765>.
21. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Viral entry. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005;285:1–23. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26764-6_1.
22. Yamauchi Y, Helenius A. Virus entry at a glance. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 6):1289–1295. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.119685>.
23. Chen J, Liu J, Chen Z, Feng D, Zhu C, Fan J, Zhang S, Zhang X, Xu J. Nonmuscle myosin IIA promotes the internalization of influenza A virus and regulates viral polymerase activity through interacting with nucleoprotein in human pulmonary cells. *Virologica sinica*. 2023;38(1):128–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virs.2022.12.002>.
24. Chen W, Li Y, Yu X, Wang Z, Wang W, Rao M, Li Y, Luo Z, Zhang Q, Liu J, et al. Zika virus non-structural protein 4B interacts with DHCR7 to facilitate viral infection. *Virologica sinica*. 2023;38(1):23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virs.2022.09.009>. doi:10.1016/j.virs.2022.09.009

25. Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature reviews. Microbiology*. 2011;9(6):427–439. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2574>.
26. Arii J, Goto H, Suenaga T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Imai T, Minowa A, Akashi H, Arase H, Kawaoka Y, et al. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature*. 2010;467(7317):859–862. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09420>.
27. Heissler SM, Manstein DJ. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2013;70(1):1–21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1002-9>.
28. Xie Z, Yang X, Duan Y, Han J, Liao C. Small-molecule kinase inhibitors for the treatment of nononcologic diseases. *Journal of medicinal chemistry*. 2021;64(3):1283–1345. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01511>.
29. Vincetti P, Caporuscio F, Kaptein S, Gioiello A, Mancino V, Suzuki Y, Yamamoto N, Crespan E, Lossani A, Maga G, et al. Discovery of multitarget antivirals acting on both the dengue virus NS5-NS3 interaction and the host Src/Fyn kinases. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(12):4964–4975. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00108>.
30. Hymel D, Peterson BR. Synthetic cell surface receptors for delivery of therapeutics and probes. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(9):797–810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.007>.
31. Torchilin V. Next step in drug delivery: Getting to individual organelles. *Drug delivery and translational research*. 2012;2(6):415–417. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-012-0102-2>.
32. Koren E, Torchilin VP. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(7):385–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012>.

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Constructos plasmídicos

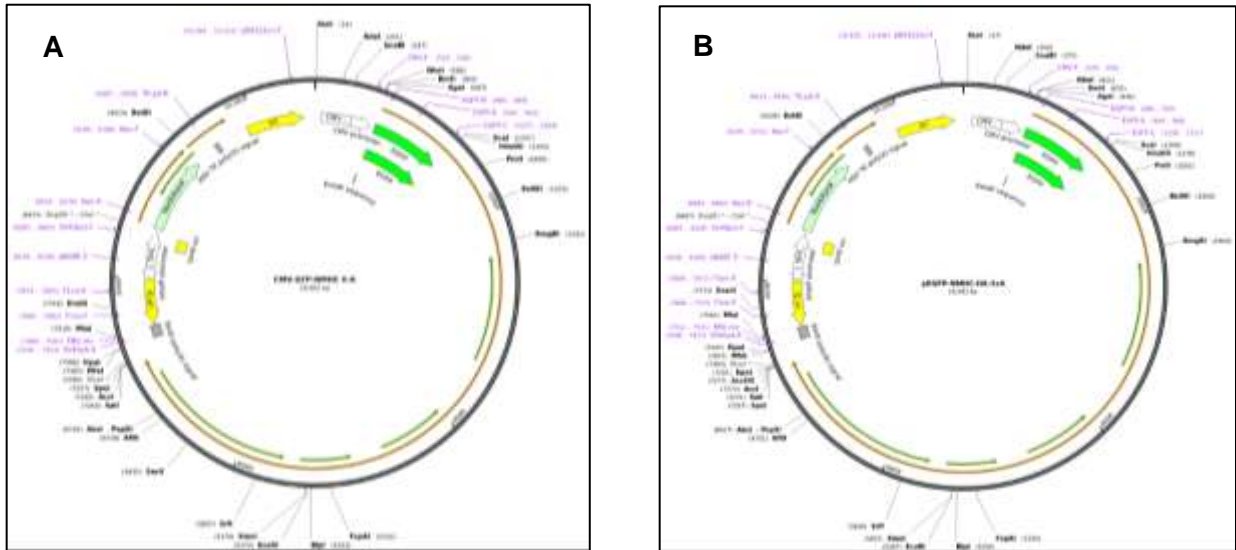


Figura 17. Constructos plasmídicos de Addgene. A) CMV-GFP-NMHC II-A (#11347) (WT); B) pEGFP-NMHC-IIA-3xA (#101041) 3A

8.2 Anexo 2: Protocolos

A. Aislamiento de ADN plasmídico total de bacterias *E. coli* con el kit Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB):

1. Centrifugar 1–5 ml de cultivo bacteriano a 13000 rpm durante 30 segundos y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el *pellet* bacteriano en 200 μ l de buffer de resuspensión de plásmido (B1). Pipetear para asegurarse que las células se mezclen por completo.
3. Lisar las células añadiendo 200 μ l de buffer de lisis (B2). Invertir el tubo 5-6 veces e incubar durante un minuto.
4. Neutralizar el lisado agregando 400 μ l de buffer de neutralización (B3). Invertir suavemente el tubo hasta que el color sea uniformemente amarillo e incubar durante 2 minutos.
5. Aclarar el lisado centrifugando por 5 minutos a 13000 rpm.
6. Transferir el sobrenadante a la columna de centrifugación y centrifugar durante 1 minuto y desechar el líquido del colector.
7. Volver a insertar la columna en el tubo de recolección y agregar 200 μ l de buffer de lavado 1 para eliminar ARN, proteínas y endotoxinas. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto y desechar el líquido del colector.
8. Agregar 400 μ l del buffer de lavado 2 y centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.
9. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

10. Agregar ≥ 30 μl de buffer de elución de ADN al centro de la matriz, esperar 1 minuto y centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN plasmídico.

B. Aislamiento de RNA total de células con el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek):

1. Remover el medio y agregar 350 μl de buffer de lisis (RL). Mezclar bien con pipeta y agitar la placa por 5 min.
2. Transferir el lisado celular a un tubo de 1.5 ml y agregar 200 μl de etanol absoluto. Mezclar por vortex 10 s.
3. Colocar las columnas de purificación en los tubos colectores (2 ml) y transferir la mezcla del lisado y etanol. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el líquido del colector.
4. Agregar 400 μl de buffer de lavado (WS) a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el líquido del colector.
5. Realizar un segundo lavado repitiendo el paso 4.
6. Centrifugar las columnas a 13.000 rpm por 2 min para secar la resina y transferir la columna a un tubo de 1.5 ml.
7. Agregar 40 μl de ddH₂O al centro de la columna y centrifugar a 2000 rpm por 2 min, seguido de 1 min a 14.000 rpm.
8. Descartar la columna y pasar el tubo de 1.5 ml con el RNA a hielo o guardar a -80°C hasta su uso.

C. Silenciamiento del gen de MYH9 mediante un ARN pequeño de interferencia (siRNA)

1. Tripsinar células A549 (1 ml/botella 25 cm²) por 5 min a 37°C.
2. Diluir las células en 5 ml de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y utilizar 10 μl para contarlas en cámara de Neubauer.
3. Ajustar la concentración final a 100.000 células/ml e incubar en hielo.
4. Para cada pocillo a transfectar, preparar complejos siRNA-MISSION® Transfection Reagent en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml:
 - Diluir 1 μl de siRNA (10 μM) en 100 μl de medio Opti-MEM sin (SFB) y mezclar bien. Se utilizan siMYH9 y un siRNA control (siCTRL).
 - Agregar 2 μl de MISSION® Transfection Reagent a cada tubo conteniendo el siRNA diluido en Opti-MEM.
5. Mezclar y agregar los complejos siRNA-MISSION® Transfection Reagent a cada pocillo (100 μl).
6. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (TA).
7. Adicionar 500 μl de la dilución de células y mezclar moviendo la placa.
8. Incubar las células por 48-96 hs a 37°C en incubadora de CO₂.

D. Transfección de constructos plasmídicos de MYH9-WT, 2F, 3A, 277F y 1805F fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP)

Para cada pocillo a transfectar, preparar complejos plásmido-Lipofectamine 3000 en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml:

1. Diluir 750 ng de plásmido en 50 μ l de medio Opti-MEM sin SFB, agregar 3 μ l de reactivo P3000 y mezclar con pipeta (tubo A). Se utilizan los constructos MYH9-GFP WT, MYH9-GFP 2F, MYH9-GFP 277F, MYH9-GFP 1805F, MYH9-GFP 3A (control negativo), y un vector vacío (pcDNA) como control.
2. Agregar 1 μ l de Lipofectamine 3000 en 50 μ l de Opti-MEM sin SFB y mezclar con pipeta (tubo B).
3. Incubar los tubos A y B a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos.
4. Combinar ambos tubos, mezclar y agregar los complejos plásmidos-Lipofectamine 3000 a cada pocillo (100 μ l).
5. Incubar por 15 minutos adicionales a TA.
6. Adicionar 500 μ l de células previamente diluidas en DMEM 10% SFB y mezclar moviendo la placa.
7. Incubar las células por 24-36 hs a 37°C en incubadora de CO₂.

E. Infección de células con TCRV y LCMV por 24 horas.

1. Diluir el stock de TCRV o LCMV en DMEM con SFB 2% para contar con la multiplicidad de infección (MOI) especificada.
2. Remover el medio de cultivo de cada pocillo, lavar las células con 1X PBS y agregar 150 μ l de la dilución de TCRV o LCMV.
3. Incubar por 1 h a 37° C, con agitación cada 15 min.
4. Una vez cumplida la hora, retirar el inóculo viral y lavar las células con 1X PBS.
5. Agregar 500 μ l de DMEM 10% SFB por pocillo.
6. Incubar a 37° C por 24 h.