

# **LAS PROTEÍNAS REV Y NS5 AFECTAN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DENGUE Y DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA, RESPECTIVAMENTE**

Maicol Ospina-Bedoya<sup>1</sup>, Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo Inmunovirología, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia

## **RESUMEN**

Latinoamérica, India y África están entre las zonas de mayor incidencia tanto del Virus del Dengue (DENV) como del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), ambos considerados como un problema de salud pública. A pesar de ello, existen pocos reportes de pacientes coinfectados; en los casos reportados no se ha descrito una aceleración en la progresión de la enfermedad hacia el estado de SIDA, pero se ha observado que va acompañado de una disminución en la sintomatología propia de la fiebre por dengue. Algunos estudios experimentales muestran que la infección del VIH-1 en presencia de la proteína no estructural NS5 de DENV, conlleva a una disminución en la expresión de proteínas virales y del correceptor CXCR4; este correceptor juega un papel fundamental en la entrada del virus a la célula. Esos resultados sugieren que NS5 afecta la replicación del VIH-1. No obstante, los mecanismos implicados en dichos procesos aún no han sido dilucidados. Teniendo en cuenta que la Proteína NS5 y la proteína Rev del VIH-1 presentan tanto señales de localización nuclear y señales de exportación nuclear, que interactúan con los mismos factores de importación y exportación propios de la célula, nuestro propósito con el presente trabajo fue determinar si la proteína NS5 o sus respectivos dominios, eran capaces de afectar negativa o positivamente la replicación del VIH-1 o, si la proteína Rev afectaba la replicación del DENV. Simultáneamente se realizó estudios *in silico* que nos permitieran establecer una posible interacción entre Rev y NS5. Nuestros resultados muestran que tanto la proteína NS5 como sus dominios afectan la replicación del VIH-1, con base en el nivel de expresión de la proteína viral p24. Igualmente observamos que

la proteína Rev afecta la replicación del DENV-2, según el nivel de expresión de la proteína NS1. Esto se observó tanto en los lisados celulares, como en los sobrenadantes de los cultivos. Igualmente el *docking* de la proteína Rev con los dominios de NS5 fue exitoso e indica que la interacción de Rev con el dominio ARN-polimerasa dependiente de ARN de NS5, se produce a través del sitio activo de la polimerasa. Por lo tanto sugerimos que una posible interacción entre las dos proteínas podría estar asociada con la disminución de la replicación de ambos virus.

## **PALABRAS CLAVES**

DENV, VIH-1, replicación, interacción proteína, *Docking*, Rev, NS5, S-adenosilmetil-transferasa, ARN-polimerasa dependiente de ARN, coinfección.

## **INTRODUCCIÓN**

Es de amplio conocimiento que regiones endémicas para el DENV se sobreponen con áreas de alta incidencia del VIH-1 (Gonzalez et al., 2009); por ejemplo regiones tropicales de Latinoamérica, Asia y África. Esto puede conllevar a que se presenten casos de coinfección con esos dos virus. Sin embargo, existen pocos estudios que reporten casos de coinfecciones. A la fecha, solo 4 estudios han descrito dicho suceso (Gonzalez et al., 2009; Mendes, Branco, & Medeiros, 2006; Siong et al., 2008; Watt, Kantipong, & Jongsakul, 2003). Teniendo en cuenta que los eventos de coinfección del VIH-1 con otros agentes virales de infección aguda generalmente aceleran la progresión a SIDA (Gonzalez et al., 2009; Thomas, 2008), es interesante resaltar que en los casos clínicos reportados, los individuos infectados con VIH-1 no presentaron progresión de la enfermedad después de la infección por DENV. El primer caso reportado en Tailandia demostró que la carga viral de VIH-1 fue considerablemente disminuida durante la infección por DENV-1 (Watt et al., 2003). Además los investigadores demostraron que al usar suero de un paciente con dengue en fase aguda, pero no en convalecencia, reducía la infectividad del VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) infectadas *in vitro*. El segundo caso reportado (Mendes et al., 2006) demostró que

un paciente en Brasil coinfectado con los dos virus (VIH-1 subtipo B y DENV con serotipo no determinado) no presentó una inmunosupresión tan marcada (el conteo de CD4 fue mayor a 400 células/ml). El tercer reporte (Siong et al., 2008) presenta 5 pacientes con VIH-1 tratados con HAART (terapia antiretroviral altamente activa) en los cuales no se presentó complicación alguna durante el curso de la infección por DENV (síntomas leves, no hubo desarrollo de fiebre hemorrágica ni síndrome de shock por dengue). Por último, el cuarto reporte (Gonzalez et al., 2009) muestra dos casos de coinfección durante un brote de DENV-3 en Cuba. Los dos sujetos tuvieron síntomas de dengue clásico y no se observó progresión de la enfermedad. Si bien los 4 reportes expuestos sugieren que la coinfección reduce la patogénesis de uno u otro virus, no existe evidencia que muestre los sucesos celulares, moleculares o sistémicos que ocurren realmente. Por tal razón en el presente estudio nos interesamos en determinar si la proteína NS5 de DENV-2, tiene un efecto en la replicación del VIH-1, o si la proteína Rev de VIH-1, afecta la replicación del DENV-2. El estudio se realizó *in vitro*, usando como modelo células HeLa y células Vero.

### **Aspectos generales del DENV y del VIH-1**

El Virus del Dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Este es un virus icosaédrico, envuelto y el genoma está constituido por una molécula de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 10,7 kb. El genoma del DENV es reconocido directamente por la maquinaria traduccional celular y origina una poliproteína, la cual es procesada por proteasas celulares y virales, dando origen a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Las proteínas estructurales (C, prM/M y E) están localizadas en la región N-terminal de la poliproteína, seguidas de las proteínas no-estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Bartenschlager & Miller, 2008; Friebe & Harris, 2010). Así NS5 constituye la proteína más larga de las proteínas virales del DENV, posee un dominio con actividad ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRP) y otro dominio con actividad S-adenosilmetil-transferasa (MeT).

Hasta el momento basados en la respuesta antigénica y a cambios nucleotídicos de algunos genes, se ha identificado 4 serotipos: DENV -1, -2, -3, -4 (Holmes & Twiddy, 2003; Rico-Hesse Rebeca., 2008). El DENV es transmitido principalmente por mosquitos del genero *Aedes*, convirtiéndola en la enfermedad transmitida por artrópodos más importante en humanos, con aproximadamente entre 50 y 100 millones de casos reportados alrededor del mundo (Friebe & Harris, 2010; Mendez et al., 2010; Ospina et al., 2010). Según la Organización Mundial de la Salud, más de 2.5 billones de personas están expuestos a ser infectados por DENV (WHO, 2010).

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), es un virus envuelto con cápside irregular. El virión contiene dos copias de ARN de cadena positiva de aproximadamente 9 kb. El genoma presenta tres genes mayores (*gag*, *pol* y *env*) que codifican para proteínas estructurales; además genes que codifican para proteínas accesorias (*nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu*) y proteínas reguladoras (*tat* y *rev*), implicadas en el control de la expresión génica y en la patogénesis (Carter & Ehrlich, 2008).

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae* y hace parte del género *Lentivirus*. Hasta el momento se ha identificado dos tipos principales; VIH-1 y VIH-2. El primero es mucho más virulento que el segundo, y es el responsable del SIDA (Reeves & Doms, 2002). Para el año 2011 se ha reportado que existen aproximadamente 34.2 millones de infectados alrededor del mundo y ha provocado la muerte de 1.7 millones de personas. Tal como ocurre con el DENV, el VIH-1 es un problema de salud pública de extrema importancia y el impacto que este tiene tanto a nivel social como a nivel económico es de orden prioritario. El panorama es aún más desconcertante si se tiene cuenta que la mayoría de casos se presentan en regiones de extrema pobreza (UNAIDS, 2011).

### **Proteínas NS5 y Rev**

El comportamiento de los virus en los pacientes coinfectados conlleva a sugerir que muy posiblemente existe una interacción entre los productos génicos de

ambos virus, lo que podría explicar el fenómeno observado (McLinden, Stapleton, Chang, & Xiang, 2008) o también se podría manifestar como consecuencia de una competencia entre factores celulares implicados en la replicación tanto de DENV como del VIH-1. Para entender más ese comportamiento, es indispensable conocer un poco mejor ciertas características de dos proteínas virales, NS5 y Rev, pertenecientes al DENV y VIH-1, respectivamente, las cuales son de vital importancia en el ciclo de replicación de cada virus (Bartenschlager & Miller, 2008; Strebel, 2003).

Como anteriormente se mencionó, la proteína no-estructural NS5 es la proteína más grande del DENV (900 aminoácidos, 105 kDa) y la más conservada de todas las proteínas estructurales del virus (Bartenschlager & Miller, 2008). NS5 contiene un dominio MeT y un dominio C-terminal con actividad ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) separado por una región de unión, conocido como “interdominio” (Xiang et al., 2009). En la región interdominio se presenta una señal de localización nuclear o NLS (residuos 369–405) que explica la presencia de NS5 en el núcleo en el curso de una infección por DENV. Sin embargo el rol de la proteína durante la replicación ocurre en el citoplasma, por tanto NS5 posee una señal de exportación nuclear o NES (residuos 327–343) que le permite ser trasladada hacia el citoplasma, donde lleva a cabo su función (Johansson, Brooks, Jans, & Vasudevan, 2001; Rawlinson, Pryor, Wright, & Jans, 2009). NS5 es de vital importancia en el ciclo de replicación del virus y su presencia en el núcleo está asociada con la regulación negativa de la expresión de la interleucina 8 y la producción de viriones (Rawlinson et al., 2009). Al igual que NS3, NS5 funciona como una enzima, por tal razón ambas proteínas son consideradas como posibles blancos antivirales (Noble et al., 2010).

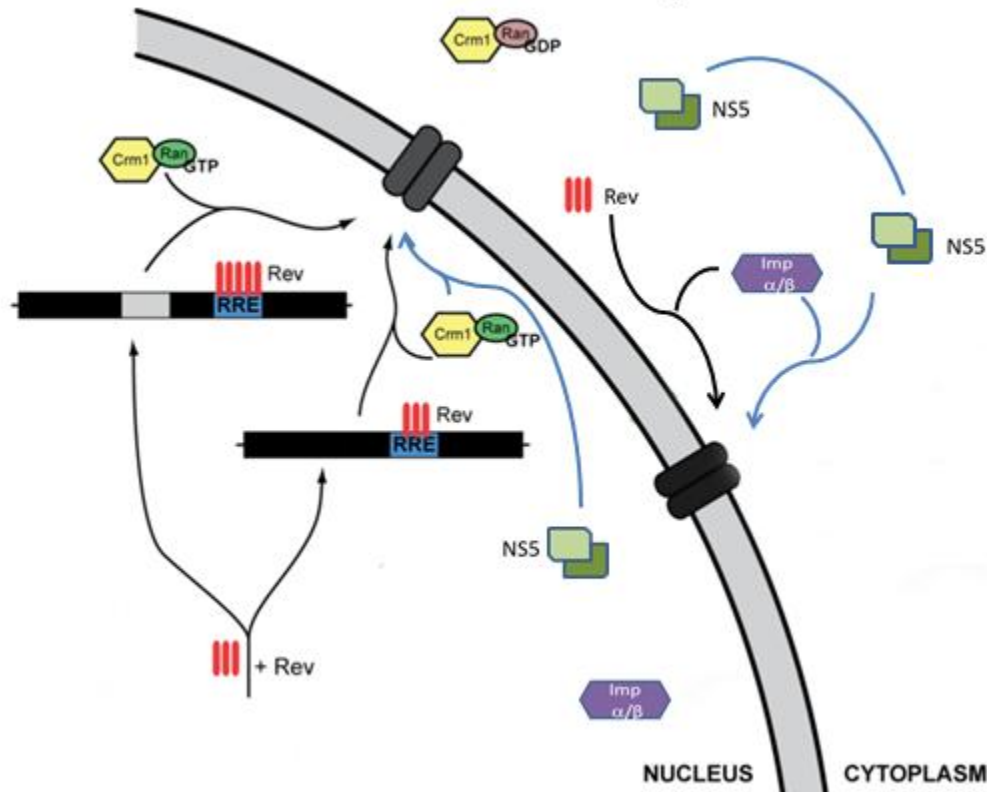
Igualmente, la proteína Rev juega un papel fundamental en el ciclo replicativo del VIH-1, ya que es la responsable de la exportación de transcriptos (ARNm) semiprocesados y sin procesar hacia el citoplasma. Rev es una fosfoproteína localizada predominantemente en núcleo/nucléolo. Análisis mutacionales revelan que Rev contiene distintos y variados dominios (Sahasini & Reddy, 2009). En la

región N-Terminal tiene un motivo rico en arginina localizado entre los aminoácidos 35 y 50, que funciona como una NLS y además actúa como un dominio de unión a ARN altamente estructurado; dicha unión se lleva a cabo a través del elemento de respuesta a Rev (REE), presente en los transcritos semiprocesados y sin procesar (Reeves & Doms, 2002; Suhasini & Reddy, 2009). También presenta un pequeño dominio entre los aminoácidos 10 y 24 en la región N-Terminal, que actúa como señal nuclear inhibitoria (NIS), importante para mantener la actividad de Rev predominantemente en el núcleo (Kubota & Pomerantz, 1998). Un tercer dominio esencial rico en leucina está presente en la región C-Terminal (aminoácidos 73 y 84) y funciona como NES; gracias a la secuencia NES, Rev interactúa con proteínas celulares (exportinas) implicadas en la exportación de ARNm celulares o transcritos virales (Suhasini & Reddy, 2009).

Es de anotar que además de los dos tipos de transcritos del VIH-1 anteriormente mencionados y cuya exportación al citoplasma es dependiente de Rev, el genoma del VIH-1 también da origen a un tercer transcrito que es completamente procesado; el mecanismo de exportación de dicho ARNm es diferente al realizado por Rev, ya que usa el elemento de transporte constitutivo (CTE), que es igualmente utilizado para la exportación de ARNm celulares (Reeves & Doms, 2002; Strebel, 2003).

Lo interesante de Rev y NS5, es que ambas proteínas interactúan con el factor de importación nuclear, Importina- $\beta$  (Johansson et al., 2001), presente en las dos proteínas. Igualmente ambas proteínas interactúan con la exportina celular CRM1, a través de la NES, lo que permite su traslocadas al citoplasma (Rawlinson et al., 2009; Urcuqui-Inchima et al., 2011).

Teniendo en cuenta que la función de estas dos proteínas es dependiente de Importina- $\beta$  y CRM1 (Figura 1), y además que ambas proteínas juegan un papel fundamental en la replicación viral, tanto de DENV como del VIH-1, nos preguntamos si una posible competencia por la exportina CRM1, podría explicar el comportamiento de los dos virus observados en los pacientes coinfectados.



**Figura 1. Representación esquemática de la dinámica intracelular de las proteínas NS5 y Rev.** Una vez sintetizadas, tanto NS5 como Rev dependen de la importina-β para ser trasladadas al núcleo. Ya en el núcleo, NS5 interviene en la regulación negativa de la expresión de la interleucina 8 y en la respuesta antiviral. Por su parte, Rev una vez en el núcleo interactúa con la estructura RRE presente en los transcritos semiprocados y sin procesar. Finalmente, NS5 o el complejo Rev/transcritos son exportados hacia el citoplasma por medio de la exportina CRM1.

Asimismo, ambas proteínas constituyen un atractivo blanco para acercamientos antivirales. Es de anotar que aún no existe una vacuna o estrategia terapéutica para controlar la progresión del dengue, a pesar del impacto económico y social de la enfermedad. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos métodos de prevención y control de infecciones por VIH, o del DENV, permanece como un objetivo crítico en la investigación viral a medida que la población mundial infectada continua en aumento (Pollard & Malim, 1998).

### Marco experimental

Existen pocos estudios experimentales que expliquen la dinámica de la coinfección del DENV y VIH-1 *in vitro*. El primer acercamiento fue con el Virus del Sarampión (*Paramixoviridae*) que aunque no es un *Flavivirus*, mostró como la coinfección de un virus distantemente relacionado con VIH-1 podría inhibir la transcripción reversa, bloquear la replicación y además detener la progresión del ciclo celular en células CD4<sup>+</sup> (García, Yu, Griffin, & Moss, 2008, 2005). El primer trabajo en utilizar NS5 para inhibir la replicación del VIH-1 fue reportado por Xiang y colaboradores (Xiang, McLinden, Chang, Kaufman, & Stapleton, 2006). En el estudio los investigadores utilizaron un segmento de 85 aminoácidos de la fosfoproteína NS5A proveniente del Virus de la Hepatitis G tipo C (*Flaviviridae*) en células Jurkat CD4<sup>+</sup>. El trabajo constituyó el primer reporte en el que se demostró como una proteína viral regulaba negativamente la replicación del VIH-1, gracias a una disminución de la expresión del correceptor CXCR4, necesario para la entrada del virus a la célula (McLinden et al., 2008). En trabajos posteriores se logró localizar una región más exacta dentro de NS5, primero de 30 aminoácidos y luego una región más fina de 14 aminoácidos, siendo estos suficientes para inhibir la replicación del VIH-1 (Chang, McLinden, Stapleton, Sathar, & Xiang, 2007; Xiang, McLinden, Chang, Jordan, & Stapleton, 2008).

Con respecto al DENV, en un estudio realizado en células T CD4<sup>+</sup> se demostró que la expresión de la proteína NS5 inhibía la replicación del VIH-1 alrededor del 90%, al compararla con el control (McLinden et al., 2008). Dicha disminución estaba igualmente asociada con la regulación negativa en la expresión del correceptor CXCR4. El último estudio publicado y quizá el de mayor relevancia para nuestro propósito, indica que NS5 (de 5 miembros de la familia *Flaviviridae*) afectaba la expresión del receptor CD4, sino también la expresión de proteínas del VIH-1 (Xiang et al., 2009).

Teniendo en cuenta que tanto los casos clínicos reportados, como los pocos trabajos experimentales realizados, han sido enfocados a la entrada, replicación y progresión del VIH-1 (pero no se ha reportado un efecto en la replicación del DENV), con este trabajo se apuntó a evaluar el papel y el impacto de las proteínas



virales, NS5 (sus dos dominios) y Rev, en la replicación del VIH-1 y DENV, respectivamente. Además usando servidores de modelación bioinformática (*Protein-Protein Docking*), se determinará si la proteína NS5 interactúa con la proteína Rev. Los resultados logrados muestran que tanto en lisados celulares como en sobrenadantes, la proteína NS5 y sus dominios por separado, afectan la replicación del VIH-1. Equivalentemente observamos que la proteína Rev disminuye la replicación del DENV-2. A la par de estos experimentos, el docking de la proteína Rev con el dominio RdRp de NS5 revela que la interacción entre estas dos proteínas es posible y que se da a través del sitio activo de la polimerasa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivos celulares y transfección**

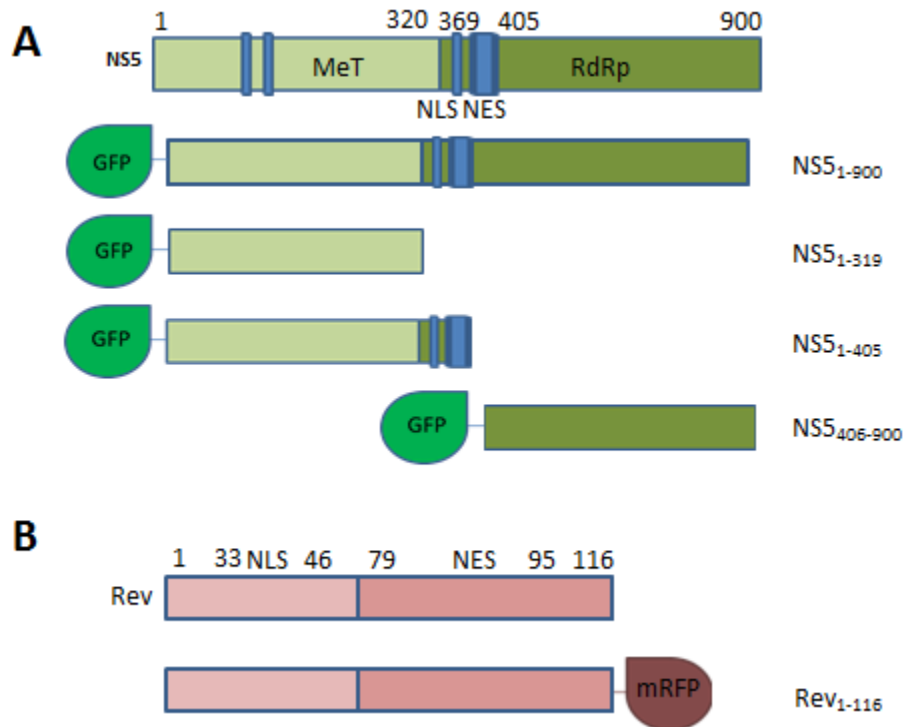
Para evaluar el efecto de la proteína NS5 o sus dominios en la replicación del VIH-1, células HeLa fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con Suero Fetal bovino al 10%, en platos de 6 pozos, e incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez la monocapa celular adquirió una confluencia entre el 70 y 80%, las células fueron cotransfectadas usando el estuche de transfección SuperFect (Qiagen) con 1.5µg del constructo pNL4-3.GFP, que tiene todo el genoma del VIH-1 y produce partículas virales infecciosas (en todos los experimentos se usó la misma cantidad de ADN) y otro que contiene el gen que codifica para la proteína NS5 de DENV (Figura 2A). En este caso se usó 1.5, 3, 4 y 5µg de DNA del constructo que codifica por toda la proteína (NS5<sub>1-900</sub>); otro que contiene el dominio MeT ubicado en la región amino terminal (NS5<sub>1-319</sub>); el constructo NS5<sub>1-405</sub>, es decir, el que contiene además de MeT, la región interdominio que posee la NLS y la NES y finalmente el constructo NS5<sub>406-900</sub> que contiene el dominio ARN-polimerasa dependiente de ARN o RdRp.

Para evaluar el efecto de Rev en la replicación del DENV, células Vero fueron transfectadas usando el estuche de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con diferentes concentraciones de un constructo que contiene el gen que codifica

para la proteína Rev fusionado a la proteína roja fluorescente monomérica (de este constructo se utilizó 3, 4, 5 y 6µg de plásmido) (Figura 2B). Todos los plásmidos utilizados fueron obtenidos de investigaciones anteriores (Rawlinson et al., 2009; Urcuqui-Inchima et al., 2011). Veinticuatro horas después se infectó con el DENV serotipo 2 (600 µl de un stock viral. En ambos casos, 48 horas después se recogió los sobrenadantes de los cultivos y las células fueron desprendidas, inmediatamente la eficiencia de la transfección se evaluó por microscopía de fluorescencia (Figura 3). Consecutivamente se realizó la lisis celular y una vez cuantificadas las proteínas totales, se usaron para realizar un *western blot*.

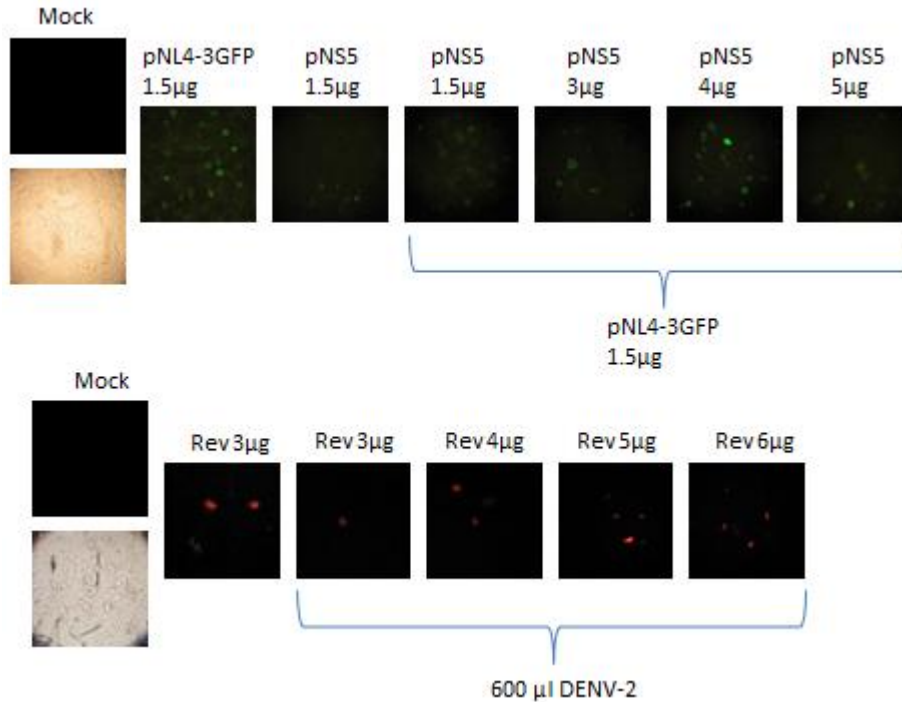
### **Western blot**

Como ya se mencionó, las células recolectadas fueron lisadas usando un buffer de lisis celular [50 mM Tris (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (v/v) Tritón X-100, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1mM fluoruro de fenilmetilsulfonil]. Luego se centrifugó para remover los desechos celulares; una vez cuantificadas las proteínas totales de lisados y sobrenadantes, se cargó en un gel de poliacrilamida/SDS al 10%, entre 30 y 50 µg de proteína para los cultivos de HeLa y 75µg de proteína para los cultivos de Vero (Rawlinson et al., 2009). Luego de la migración electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas virales fueron detectadas usando un anticuerpo que reconoce en forma específica la proteína p24 (se observan 4 bandas, la proteína pr55Gag y los diferentes derivados de dicha poliproteína, incluyendo p24) o un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína NS1 de DENV (banda única).



**Figura 2. Representación esquemática de los diferentes constructos usados en el presente estudio.** (A) se usó el gen completo (NS5<sub>1-900</sub>) que contiene los dominios MeT, las señales NLS y NES, y el dominio RdRp. El constructo NS5<sub>1-319</sub> que contiene el dominio MeT. El constructo NS5<sub>1-405</sub> que contiene el dominio MeT con las señales de localización NLS y NES, y el constructo NS5<sub>406-900</sub> que contiene el dominio RdRp sin ninguna señal de localización. (B) constructo que expresa la proteína Rev unido a la proteína roja fluorescente monomérica.

Los anticuerpos y las membranas tanto para los lisados como para los sobrenadantes se dejaron “*overnight*” a 4°C en solución de bloqueo (TBS 10% leche descremada). Finalmente a cada membrana se le adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. El revelado se realizó usando el estuche ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham™). Como control de carga (CG) para todas las membranas, se usó Rojo de Ponceau (ácido carmínico/ácido tricloroacético 1%). A modo de *Mock* se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar o infectar. Todas las transfecciones y *westerns blot* se hicieron por triplicado.



**Figura 3. Evaluación de la eficiencia de transfección, por microscopía de fluorescencia, de los constructos pNS5, pNL4-3GFP y Rev.** Los plásmidos pNS5 y pNL4-GFP se evaluaron detectando la proteína verde fluorescente (GFP), tanto separados como en sus respectivas cotransfecciones; los constructos NS5<sub>1-319</sub>, NS5<sub>1-405</sub> y NS5<sub>406-900</sub> también fueron chequeados, revelando así eficiencias de transfección similares (datos no mostrados). El plásmido Rev se evaluó detectando la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP).

## Docking

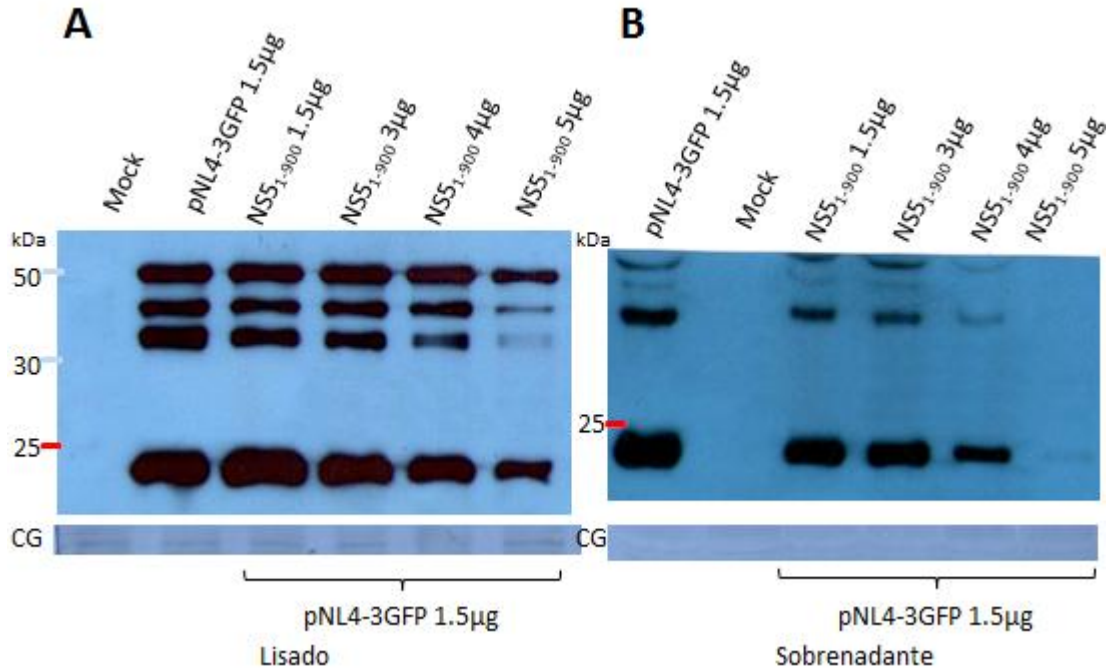
A las proteínas NS5 y Rev se les realizó un Docking de interacción proteína-proteína, utilizando la base de datos de estructuras macromoleculares biológicas *Protein Data Bank* (PDB), las herramientas del Clúster en línea *ClusPro Protein-protein docking* de la Universidad de Boston (S. R. Comeau, Gatchell, Vajda, & Camacho, 2003; Stephen R Comeau, Gatchell, Vajda, & Camacho, 2004; Kozakov et al., 2010; Kozakov, Brenke, Comeau, & Vajda, 2006) y el software libre PyMOL para la visualización de estructuras moleculares (Delano, 2002). Como la estructura tridimensional de la proteína NS5 no se encuentra completa se usó la estructura de sus dominios principales (El dominio N-terminal MeT [PDB ID:1L9K (Egloff, Benarroch, Selisko, Romette, & Canard, 2002)] y el dominio C-terminal RdRp [PDB ID: 2J7W (Yap et al., 2007)]) (McLinden et al., 2008). Estos dos dominios se hicieron interactuar con la proteína Rev, de la cual también se conoce

la estructura tridimensional [PDB ID: 3LPH (DiMattia et al., 2010)] en 4 estados diferentes (Mono-, Di-, tri- y Tetramérica) simulando así diferentes conformaciones fisiológicas (Pollard & Malim, 1998; Strebel, 2003). Todas las interacciones fueron realizadas por duplicado.

## RESULTADOS

### La proteína NS5<sub>1-900</sub> disminuye la síntesis de p24

p24 es una de las proteínas que se obtiene del procesamiento de la poliproteína pr55Gag y es utilizada como un indicador de la replicación del VIH-1. Por ende, para determinar el efecto de la proteína NS5 del DENV-2 en la replicación del VIH-1, se evaluó por *western blot* la expresión de esa proteína. El anticuerpo utilizado tiene la ventaja que además de p24, reconoce la poliproteína pr55Gag y sus proteínas derivadas. Como se puede apreciar en la figura 4A, cuando las células fueron transfectadas con el constructo pNL4-3GFP y en presencia de una alta concentración del gen que codifica para la proteína NS5 (aminoácidos 1-900), se observó una fuerte disminución de p24 y de pr55Gag, en los lisados celulares. Cuando la evaluación se hizo en los sobrenadantes de esos cultivos, igualmente se observó una disminución en el contenido de pr55Gag y p24 (Figura 4B); Cuando las células fueron transfectadas con 5µg de pNS5<sub>1-900</sub>, no fue posible detectar ni pr55Gag y por ende p24.

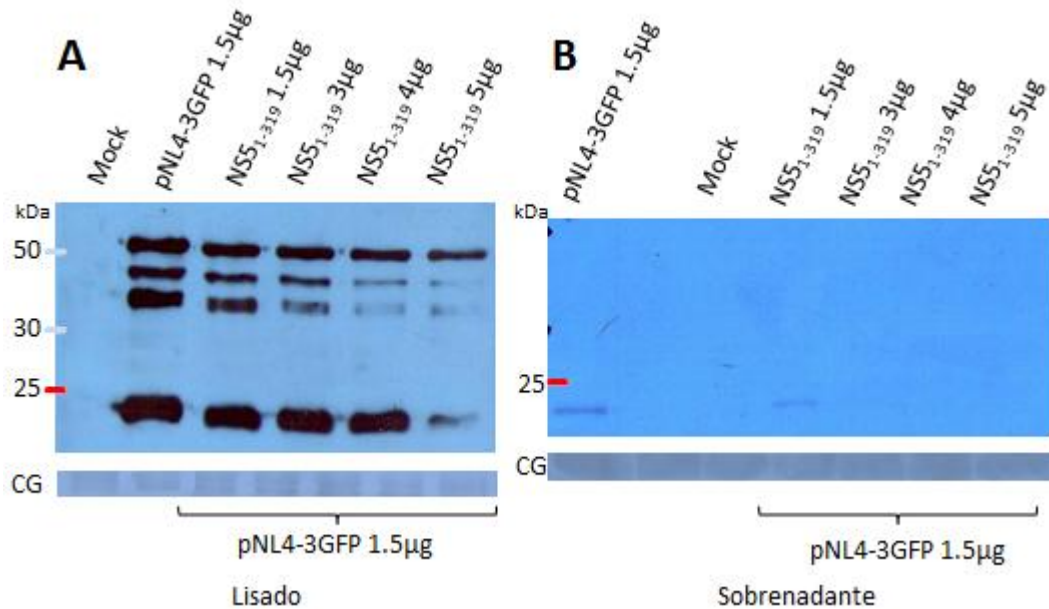


**Figura 4. La proteína NS5 disminuye la síntesis de pr55Gag y sus proteínas derivadas.** (A) *Western blot* para p24 de los lisados celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>1-900</sub>. La detección de pr55Gag y p24 disminuyó cuando se usó 4 y 5 µg del plásmido NS5<sub>1-900</sub>. (B) *Western blot* para p24 de los sobrenadantes de los cultivos celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>1-900</sub>. No se detectó pr55Gag ni p24 cuando se usó 5 µg del plásmido NS5<sub>1-900</sub>. El marcador de masa molecular se indica con rojo (-) y azul (-). Como *Mock* se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar.

### El dominio MeT de NS5 (NS5<sub>1-319</sub>) disminuye la síntesis de pr55Gag y sus proteínas derivadas

Teniendo en cuenta que NS5 afecta la expresión de pr55Gag, el siguiente paso fue determinar si para llevar a cabo dicha función era necesario toda la proteína o solo una región específica. Para ello lo primero que se hizo fue evaluar el constructo que codifica por el dominio MeT (NS5<sub>1-319</sub>). Nuestros resultados muestran que igualmente el dominio MeT afecta la producción de pr55Gag y p24 en los lisados celulares, dependiendo de la cantidad de DNA plasmídico utilizado (Figura 5A). En los sobrenadantes de las células cotransfectadas no fue posible detectar ni pr55Gag ni p24 (Figura 5B), aunque cuando se usó 1.5 µg de pNS5<sub>1-319</sub>,

se observa una ligera banda de p24. A cantidades mayores de ADN plasmídico, ya no fue posible observar esa banda.

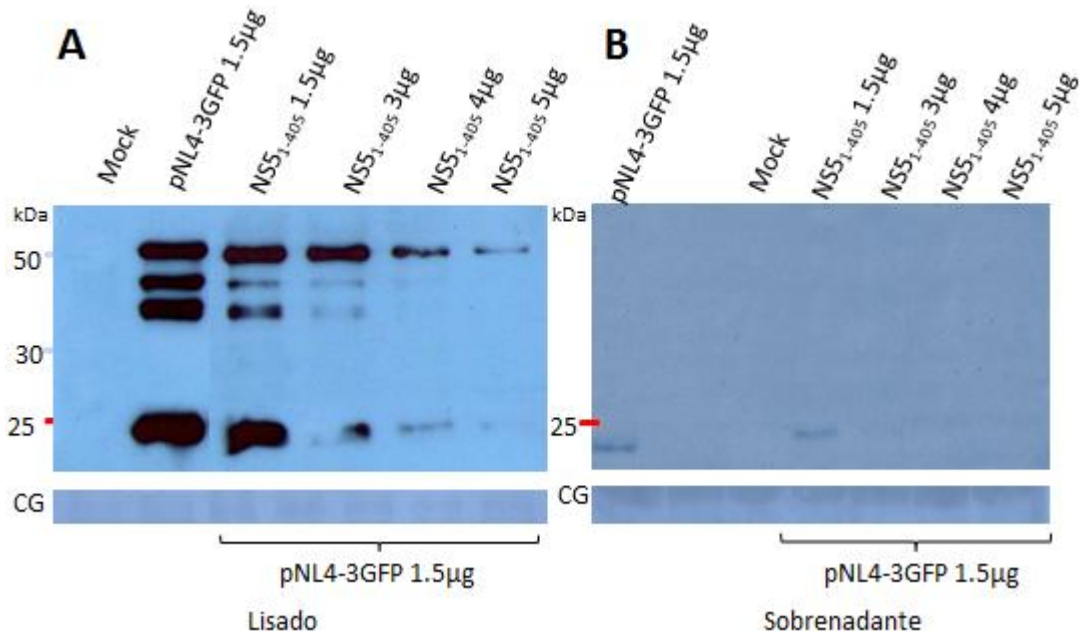


**Figura 5. El dominio MeT de NS5 reduce la síntesis de pr55Gag y p24.** (A) Western blot para p24 de la cotransfección pNL4-3GFP y NS5<sub>1-319</sub>. La detección de pr55Gag y p24 en el lisado celular se redujo cuando se usó 3, 4 y 5 µg del plásmido NS5<sub>1-319</sub>. (B) Western blot para p24 de los sobrenadantes de los cultivos celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>1-319</sub>. En los sobrenadantes no se detectó bandas de pr55Gag y p24 a excepción de cuando se usó 1.5 µg del plásmido NS5<sub>1-319</sub>. El marcador de masa molecular se indica en rojo (-) y azul (-). Como Mock se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar.

### El dominio MeT de NS5 (NS5<sub>1-405</sub>) junto con las NLS y NES disminuye la síntesis de pr55Gag y sus proteínas derivadas

Posteriormente se determinó si el dominio MeT junto con la región interdominio de la proteína NS5, el cual contiene las NLS y NES (NS5<sub>1-405</sub>), afecta igualmente la expresión de pr55Gag. Como se observa en la figura 6A, la región de la proteína que contiene el dominio MeT en presencia del interdominio, igualmente afecta el contenido de p24 y pr55Gag. A diferencia del solo dominio MeT, en este caso el efecto se empieza a observar con tan solo 3 µg de ADN plasmídico. En los

sobrenadantes de los cultivos cotransfectados no se detectó pr55Gag ni p24, excepto cuando se usó 1.5µg de NS5<sub>1-405</sub> (Figura 6B).



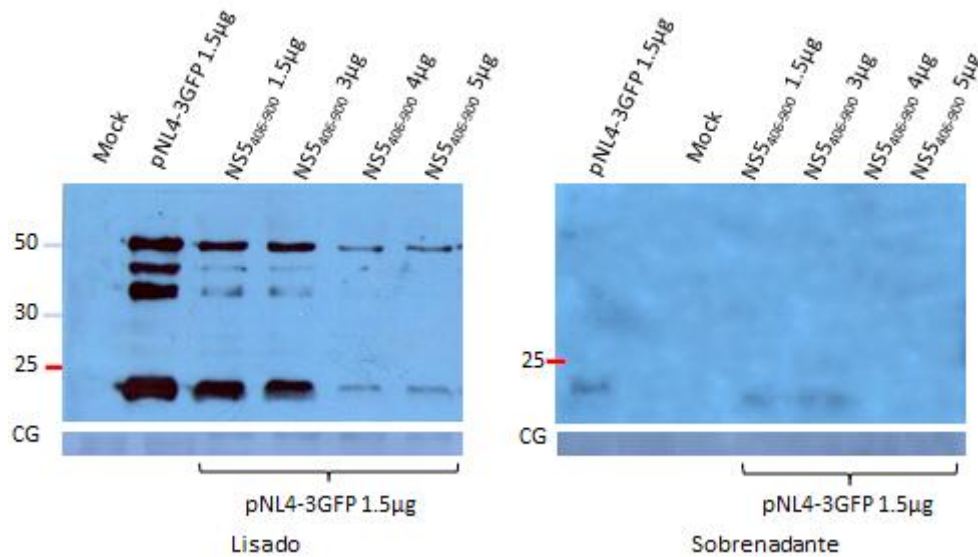
**Figura 6. La expresión del dominio MeT de NS5, en presencia de la región interdominio tiene un fuerte efecto en la síntesis de pr55Gag y p24.** (A) *Western blot* para p24 de la cotransfección pNL4-3GFP y NS5<sub>1-405</sub>. La detección de pr55Gag y p24 en el lisado celular se redujo cuando se usó 1.5, 3, 4 y 5µg del plásmido NS5<sub>1-405</sub>. (B) *Western blot* para p24 de los sobrenadantes de los cultivos celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>1-405</sub>. En los sobrenadantes no se detectó bandas de pr55Gag y p24 a excepción de cuando se usó 1.5µg del plásmido NS5<sub>1-405</sub>. El marcador de masa molecular se indica en rojo (-) y azul (-). Como *Mock* se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar.

### El dominio RdRp de NS5 (NS5<sub>406-900</sub>) disminuye la síntesis de pr55Gag y sus proteínas derivadas

Una vez establecido que el dominio MeT, en presencia de las señales de localización y exportación nuclear, afecta la expresión de pr55Gag, procedimos a determinar si el constructo que codifica para el dominio RdRp (NS5<sub>406-900</sub>) poseía la misma función. Nuestros resultados muestran que ese dominio también afecta la producción de pr55Gag y p24 en los lisados celulares dependiendo de la cantidad de DNA plasmídico utilizado (Figura 7A). Igualmente en los



sobrenadantes de los cultivos no fue detectada en absoluto la proteína pr55Gag ni p24 cuando se usó, 4 y 5 µg del plásmido NS5<sub>406-900</sub> (Figura 7B).

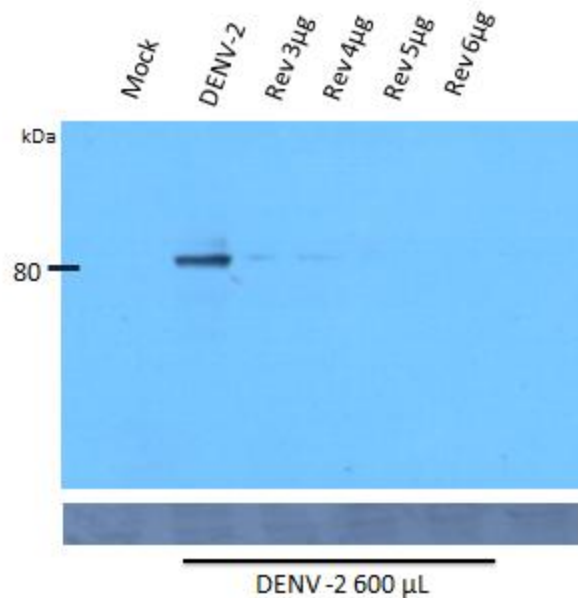


**Figura 7. El dominio RdRp de NS5 reduce la síntesis de pr55Gag y p24.** (A) *Western blot* para p24 de los lisados celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>406-900</sub>. La detección de pr55Gag y p24 disminuyó cuando se usó 4 y 5µg del plásmido NS5<sub>406-900</sub>. (B) *Western blot* para p24 de los sobrenadantes de los cultivos celulares de la cotransfección con pNL4-3GFP y NS5<sub>406-900</sub>. No se detectó pr55Gag ni p24 cuando se usó 5 y 6µg del plásmido NS5<sub>406-900</sub>. El marcador de masa molecular se indica con rojo (-) y azul (-). Como *Mock* se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar.

## La proteína Rev del VIH-1 afecta negativamente la síntesis de NS1 del DENV-2

NS1 es una glicoproteína no-estructural que generalmente es secretada al medio extracelular. Esta se une a la superficie de células infectadas y sin infectar. Tiene además funciones en la evasión del sistema inmune por parte del virus. Ya que esta proteína se encuentra en el torrente sanguíneo durante una infección por dengue, es usada normalmente como un indicador de la replicación del DENV. En consecuencia, para determinar el efecto de la proteína Rev del VIH-1 en la replicación del DENV, se evaluó por *western blot* la expresión de esa proteína. Claramente en la figura 8 se puede observar que cuando las células fueron transfectadas con el gen que codifica para la proteína Rev y luego infectadas con

DENV-2, se observó una fuerte disminución en la detección de NS1 en el lisado celular. Con 5 y 6  $\mu\text{g}$  del ADN plasmídico que codifica para Rev no fue posible detectar ninguna banda.



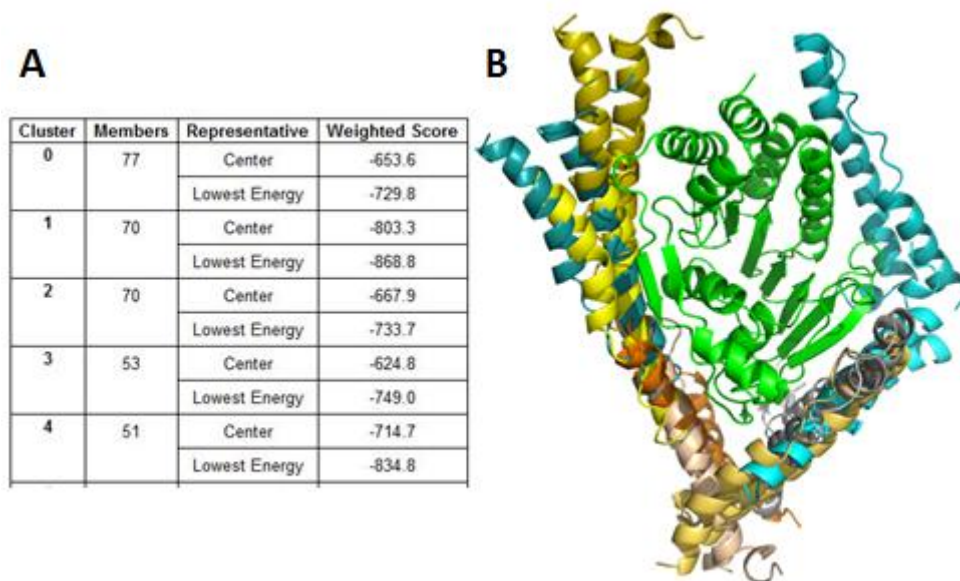
**Figura 8. La proteína Rev del VIH-1 disminuye drásticamente la síntesis de NS1 del DENV.** *Western blot* para NS1 de los lisados celulares de la transfección con Rev y posterior infección con DENV-2. La detección de NS1 disminuyó cuando se usó 3, 4, 5 y 6  $\mu\text{g}$  del plásmido NS1 respecto al control. El marcador de masa molecular se indica con negro (-). Como *Mock* se utilizó lisados y sobrenadantes de cultivos sin transfectar e infectar.

### **Los estudios *in silico* sugieren que existe una interacción periférica entre el dominio MeT de la proteína NS5 del DENV y la proteína Rev del VIH-1**

En concordancia con los resultados anteriores y teniendo en cuenta que no es necesaria las señales de localización nuclear para la inhibición de la síntesis de pr55Gag y p24, planteamos un estudio *in silico* que nos permitiera establecer una posible interacción entre Rev y NS5, la cual pudiese explicar el efecto en la replicación del VIH-1 y DENV observado por *western blot*.

La mejor manera de evaluar los modelos de interacción entre proteínas es por tamaño de clúster y por el puntaje de cada interacción; por lo tanto, clústeres con

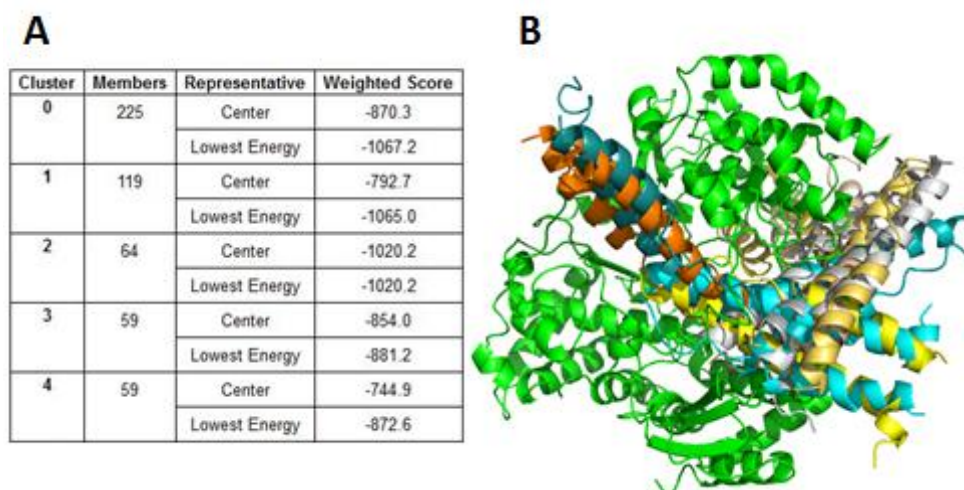
mayor número y valores más negativos sugieren una posible interacción entre esas estructuras. Es así como los análisis *in silico* para evaluar la interacción entre el dominio MeT de la proteína NS5 y la proteína Rev fueron exitosos. Es decir, se obtuvo una buena cantidad de miembros de modelos con coeficientes negativos (Figura 9A). Los puntajes de energía de los modelos obtenidos variaron desde -653.6 hasta -803.3 KJ/mol. Equivalentemente los análisis hechos con la proteína Rev dimérica, trimérica y tetramérica dieron rangos de energías similares (datos no mostrados). Los resultados del acoplamiento permitieron identificar que las interacciones entre las dos proteínas son posibles pero promiscuas y por lo tanto no sitio-específicas (figura 9B).



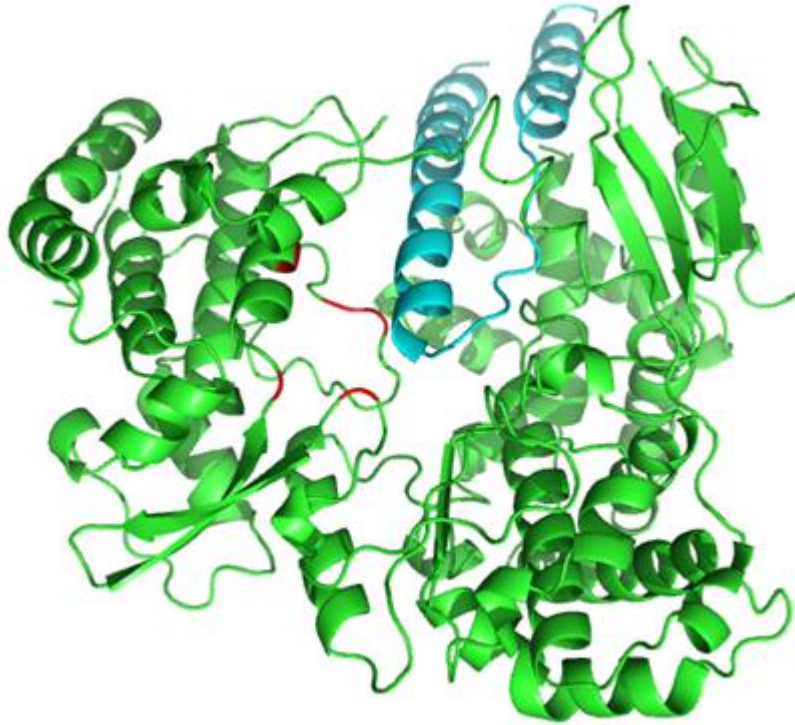
**Figura 9. Docking proteína-proteína del dominio MeT y la proteína Rev.** (A) Tabla de valores de interacciones en entre el dominio MeT y la proteína Rev. Se obtuvo una buena cantidad de miembros por clúster y con puntuaciones negativas (B) Las interacciones de la proteína Rev (colores variados) se dan en diferentes regiones alrededor de la estructura del dominio MeT (verde).

**Los estudios *in silico* indican que existe una posible interacción específica entre el dominio RdRp de la proteína NS5 del DENV y la proteína Rev del VIH-1**

De igual manera procedimos a determinar una posible interacción entre el dominio RdRp de NS5 y la proteína Rev de VIH-1. Los análisis de la interacción fueron igualmente exitosos. Es decir, se obtuvo una buena cuantía de miembros en los clústeres, todos ellos con coeficientes negativos. Los puntajes de energía de los modelos van desde -744.9 hasta -1020.2 KJ/mol (Figura 10A). De la misma manera las interacciones hechas entre el dominio RdRp y la proteína Rev en sus conformaciones dimérica, trimérica y tetramérica arrojaron rangos de energías similares (datos no mostrados). Comparativamente, los valores obtenidos con RdRp y Rev, fueron sustancialmente mayores a los obtenidos en las interacciones entre el dominio MeT y la proteína Rev en todas sus conformaciones. Los resultados muestran una mayor cantidad de miembros en los clústeres y valores más negativos. Asimismo los resultados del acoplamiento permitieron identificar que las interacciones entre las dos proteínas no eran promiscuas (Figura 10B), y se dan cerca a sitios de unión a nucleótidos trifosfato, e intervienen específicamente los residuos S710, R729, R737, T794, W795 (Figura 11).



**Figura 10. Docking proteína-proteína del dominio MeT y la proteína Rev.** (A) Tabla de valores de interacciones entre el dominio RdRp y la proteína Rev. Se obtuvo una buena cantidad de miembros por clúster y con puntuaciones negativas (B) Las interacciones de la proteína Rev (colores variados) se dan en lugares relativamente cercanos del centro catalítico del dominio RdRp (verde) y con valores mucho más negativos comparativamente con las interacciones entre MeT y Rev.



**Figura 11. Interacción entre la proteína Rev y el dominio RdRp.** La interacción entre la proteína Rev (cian) y el dominio RdRp de NS5 (verde) se da en el sitio activo, donde se indica (rojo) los residuos S710, R729, R737, T794, W795 lo cuales están implicados en la unión a nucleótidos trifosfato, posiblemente la proteína Rev pueda truncar la función enzimática.

## CONCLUSIONES

Es bastante claro que el DENV y el VIH-1 son problemas de salud pública de primer orden. El Dengue representa cerca de 50 millones de casos alrededor del mundo y 2.5 billones de personas están en alto riesgo de ser infectados; por otro lado, existe alrededor de 33 millones de personas infectadas con el VIH-1 en todo el planeta. Las regiones de mayor prevalencia para ambos virus son los países en vía de desarrollo localizados en regiones tropicales y subtropicales. Por tanto, investigaciones centradas en estos dos importantes patógenos podrían de alguna manera, vislumbrar interacciones inmunopatológicas entre DENV y VIH-1 y sus posibles implicaciones en los resultados de una coinfección.

Puntualmente, esta investigación aporta nuevos conocimientos relacionados con el papel de la proteína NS5 y sus dominios en la replicación del VIH-1, además del rol de la proteína Rev en la replicación del DENV-2. Esto contribuye a entender mejor los reportes clínicos reportados en pacientes coinfectados con ambos virus.

En investigaciones previas se ha demostrado que la proteína NS5, no solo de DENV sino de otros virus como el Virus Oeste del Nilo, Virus de la Fiebre Amarilla, Virus de la Hepatitis C y Virus GB-C (todos dentro de la familia *Flaviviridae*) disminuyen la expresión de la molécula de superficie CD4, tanto en líneas como células primarias T CD4<sup>+</sup>, lo que afecta la replicación del VIH-1 (Xiang et al., 2009). Estos autores plantean que el mecanismo de inhibición por la proteína NS5 actúa a un nivel transcripcional, ya que la expresión de la proteína NS5 de esos Flavivirus en células T reduce los niveles basales de ARNm de CD4, comparado con las células control. No obstante, nuestras investigaciones fueron desarrolladas en modelos *in vitro* con las líneas celulares HeLa y Vero; las cuales poseen un fenotipo CD4<sup>-</sup> (Mondor, Ugolini, & Sattentau, 1998), por lo cual no pueden ser infectadas, no obstante sí disponen de todos los factores necesarios para la replicación del genoma del VIH-1 y producir partículas virales infecciosas. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que la inhibición de la replicación viral observada, no solo está asociada a la regulación negativa o ausencia de los receptores celulares que permiten la entrada del virus, sino que existen otros mecanismos o factores intracelulares que tienen un efecto en la replicación del VIH-1. Teniendo en cuenta que la proteína Rev y NS5, dependen tanto de las importinas como de las exportinas, para trasladarse al núcleo o al citoplasma (Rawlinson et al., 2009; Suhasini & Reddy, 2009), respectivamente, una competición por esos factores celulares o la interacción directa entre NS5 con Rev u otras proteínas del VIH-1, podría explicar el efecto en la replicación del DENV o del VIH-1, que hemos descrito en el presente estudio.

Acorde con lo previamente reportado (McLinden et al., 2008; Xiang et al., 2009), el *western blot* para p24 claramente muestra que la proteína NS5 total (NS<sub>1-900</sub>), que contiene sus dos dominios (MeT y RdRp) y la región interdominio, tiene un efecto

en la replicación del virus. Nuestros resultados muestran que el efecto es dependiente de la cantidad de ADN plasmídico utilizado en la transfección de las células. El mayor efecto en el contenido de pr55Gag y p24 se observó cuando las células fueron transfectadas con 5µg. Cuando se evaluó el contenido de pr55Gag y p24 en los sobrenadantes de las células transfectadas con esa cantidad de ADN, no fue posible detectar pr55Gag y solo se observa una banda muy tenue de p24. Resultados similares fueron reportados cuando se evaluó el efecto del factor Nuclear 90, en la replicación del VIH-1 (Urcuqui-Inchima et al., 2011). Nuestros resultados posiblemente sugieren que la proteína NS5 tiene un efecto en el ensamblaje o salida de los viriones al medio extracelular.

Con el propósito de caracterizar o determinar qué dominio estaba implicado en dicha función, se evaluó el efecto de cada uno de los dominios de NS5, en la replicación del VIH-1. Observamos que ambos dominios de la proteína NS5 (MeT en presencia o ausencia del interdominio y RdRp) son eficaces en cuanto a la inhibición de la replicación del VIH-1. Sin embargo, el dominio MeT es el que menos efecto tiene (Figura 5A); los que inhiben más drásticamente la síntesis de pr55Gag y p24, es el dominio RdRp (Figura 7A) y MeT pero en conjunto con el interdominio (Figura 6A), sugiriendo que las señales de exportación y localización nuclear son primordiales. Posiblemente el aumento en la inhibición de la replicación por parte de la proteína NS5<sub>1-405</sub>, respecto a la NS5<sub>1-900</sub>, sea consecuencia de la exposición de esas dos señales (NLS y NES) presentes en la región interdominio (residuos 369 a 405). Estas señales son importantes ya que permiten la entrada y salida del núcleo, de la proteína NS5 (Johansson et al., 2001; Rawlinson et al., 2009). Una posible competición por la importina-β o por CRM1, entre la proteína NS5 y Rev (que también posee dichas señales) podría explicar el efecto en la replicación del VIH-1, que hemos reportado en el presente estudio.

El efecto del dominio RdRp en la replicación del VIH-1 puede ser consecuencia de la interacción directa de ese dominio con la proteína Rev. Este tipo de interacción podría afectar la función de Rev, que es exportar los transcritos semiprocados

y sin procesar del VIH-1 (Pollard & Malim, 1998; Strebel, 2003; Suhasini & Reddy, 2009). Si bien nosotros no mostramos experimentalmente la interacción entre NS5 y Rev, pero con el objetivo de dar un soporte científico a nuestra hipótesis, se realizó un *docking* proteína-proteína entre la proteína Rev y los dos principales dominios de la proteína NS5. Los valores obtenidos permiten sugerir una posible interacción entre la proteína Rev y el dominio de MeT de la proteína NS5; no obstante, las interfases de interacción fueron variables respecto a la estructura del dominio MeT. Pero, vale la pena recalcar que el efecto de MeT en la replicación del VIH-1 solo se observa cuando se usa altas concentraciones del constructo que codifica para ese dominio. Cuando el *docking* se realizó con el dominio RdRp y Rev, los datos muestran resultados más interesantes, ya que los valores de la interacción (clústeres) son mucho más negativos y se observó más miembros en cada uno de ellos. Lo interesante de nuestros resultados es que el *docking* sugiere que la interacción se produce entre el sitio activo del dominio RdRp (sitio de unión a nucleótidos trifosfato) y Rev. Además los estudios *in silico*, sugieren que los residuos S710, R729, R737, T794, W795 del dominio RdRp y el bucle de aminoácidos que comprende los residuos 26 al 32 de la proteína Rev, son claves en la interacción. Recientemente se demostró que el asa formada por los aminoácidos T794 y A799, es esencial para la iniciación y proporciona al menos parte del sitio de fijación específico del ATP (Selisko et al., 2012). Esos aminoácidos del dominio RdRp son trascendentales en la función catalítica de la proteína NS5 y por lo tanto del ciclo de replicación del virus (Yap et al., 2007). Mientras que la región 26 al 32 de la proteína Rev no está asociada a ninguna de sus funciones celulares, pero se encuentran próximos a la región hidrofóbica de la proteína, implicada en la interacción con el elemento de respuesta a Rev y en la homo-dimerización de Rev.

Finalmente en el contexto de la infección por DENV, el efecto de la proteína Rev es muy interesante. Hasta la fecha no se ha reportado, según nuestros conocimientos, un trabajo en el que se reporte que una proteína de VIH-1, afecte la replicación del DENV-2. Este resultado es supremamente interesante si se tiene en cuenta que aún no existe un medicamento para el control de la progresión del



dengue, o una vacuna contra dicha enfermedad. Los blancos terapéuticos que hasta la fecha se han evaluado, están dirigidos básicamente contra la glicoproteína E, formación de poro y truncamiento de proteínas virales con actividad enzimática (Shadan, 2004), pero hasta hoy no se conoce un prospecto terapéutico utilizando un producto proteico del VIH-1. El resultado obtenido con el *western blot* para detectar NS1 en lisados de células Vero transfectadas con un constructo que contiene el gen que codifica por Rev y luego infectadas con DENV-2, muestra una fuerte disminución de la expresión de esa proteína viral (Figura 8). La expresión de NS1 es fuertemente disminuida aún con cantidades bajas del ADN plasmídico (3µg); cuando se utilizó 6µg, la inhibición de la expresión fue total, comparada con el control, indicando que hay un efecto dosis dependiente. Al igual que en los resultados obtenidos con VIH-1, la inhibición de la replicación del DENV-2 por la proteína Rev puede ser debida a la competición por la importina-β y la exportina CRM1, entre Rev y NS5, o por la interacción directa entre ambas proteínas.

En conclusión, en el presente estudio demostramos que la replicación del VIH-1 y de DENV-2, es afectada por la expresión de la proteína NS5 y Rev, respectivamente. El efecto en la replicación del VIH-1 está más relacionado con el dominio polimerasa (RdRp) de NS5. Los estudios *in silico*, sugieren que posiblemente ocurre una interacción entre NS5, a través del dominio RdRp y Rev. A diferencia del efecto de NS5 en la replicación del VIH-1, que es dependiente de altas cantidades de ADN plasmídico, Rev tiene un efecto muy drástico en la replicación del DENV-2, aún a concentraciones bajas de ADN. No obstante otros estudios son necesarios para caracterizar adecuadamente regiones específicas dentro de los mismos dominios que permitan regular negativamente la síntesis de proteínas de ambos virus e identificar las interacciones intracelulares que permitan explicar de mejor manera el fenómeno. Una vez se tenga esto se podrían generar estructuras polipeptídicas similares que pudiesen ser utilizadas en nuevas terapias celulares diseñadas para modular la expresión viral y tener un rol importante en algunas enfermedades infecciosas.

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera especial deseo agradecer al profesor Silvio Urcuqui por el hecho de haberme elegido como su estudiante y guiarme en esta fracción de mi vida académica, a Lanie Ruiz que junto a mis otros compañeros de laboratorio me enseñaron un sin fin de elementos, que considero importantes para mi futuro como investigador.

En general al Grupo Inmunovirología de la Universidad de Antioquia por los espacios, lugares de trabajo y los equipos donde desarrollé todos los ensayos y procesos experimentales del trabajo de grado.

A los profesores y científicos; Gabriel Bedoya, Juan Carlos Gallego, Edwin Patino, Lina Barrera, Daniel Ortiz, Cristina López, Juan Carlos Hernández, Jose Usme y Juliana Smetana, por confiar en mí, por ser maestros, consejeros y guías en el camino que me trajo hasta acá,

A David Vásquez, Laura Cano, Henry Arenas, Andrea Manrique, Sergio Muñoz, Cristiam Santa, Steven Roldan, Juan Esteban Gómez, Andrea Pérez, Camilo Rodríguez, David Loaiza, Viviana Ospina, Juan José Yepes, Daniel Mejía, Santiago Mesa, Elkin Aristizábal, Laura Gonzáles y a mi familia, en cualquier orden que los nombre, gracias por su apoyo y preocupación.

A Sara Isabel todo.

## **REFERENCIAS**

- Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*, 3, 155–65. doi:10.2217/17460913.3.2.155
- Carter, C. a, & Ehrlich, L. S. (2008). Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annual review of microbiology*, 62, 425–43. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162758
- Chang, Q., McLinden, J. H., Stapleton, J. T., Sathar, M. A., & Xiang, J. (2007). Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30

- aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *The Journal of general virology*, 88(Pt 12), 3341–6. doi:10.1099/vir.0.83198-0
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2003). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1), 45–50. doi:10.1093/bioinformatics/btg371
- Comeau, Stephen R, Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue), W96–9. doi:10.1093/nar/gkh354
- Delano, W. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System* (p. 9).
- DiMattia, M. a, Watts, N. R., Stahl, S. J., Rader, C., Wingfield, P. T., Stuart, D. I., Steven, A. C., et al. (2010). Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 5810–4. doi:10.1073/pnas.0914946107
- Egloff, M. pierre, Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J., & Canard, B. (2002). An RNA cap ( nucleoside-2' -O- ) -methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5 : crystal structure and functional characterization. *EMBO Journal*, 21(11), 2757–2768.
- Friebe, P., & Harris, E. (2010). Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication. *Journal of virology*, 84(12), 6103–18. doi:10.1128/JVI.02042-09
- García, M., Yu, X. F., Griffin, D. E., & Moss, W. J. (2008). Measles virus inhibits human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and replication by blocking cell-cycle progression of CD4+ T lymphocytes. *The Journal of general virology*, 89(Pt 4), 984–93. doi:10.1099/vir.0.83601-0
- García, M., Yu, X. fang, Griffin, D. E., & Moss, W. J. (2005). In Vitro Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Measles Virus. *Society*, 79(14), 9197–9205. doi:10.1128/JVI.79.14.9197
- Gonzalez, D., Limonta, D., Bandera, J. F., Perez, J., Kouri, G., & Guzman, M. G. (2009). Dual infection with dengue virus 3 and human immunodeficiency virus 1 in Havana, Cuba. *Journal of infection in developing countries*, (4), 318–320.
- Holmes, E., & Twiddy, S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(1), 19–28. doi:10.1016/S1567-1348(03)00004-2

- Johansson, M., Brooks, a J., Jans, D. a, & Vasudevan, S. G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *The Journal of general virology*, 82(Pt 4), 735–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257177>
- Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER : An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials. *Bioinformatics*, 406(August), 392–406. doi:10.1002/prot
- Kozakov, D., Hall, D. R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., Shen, Y., Li, K., et al. (2010). Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19. *Proteins*, 78(15), 3124–30. doi:10.1002/prot.22835
- Kubota, S., & Pomerantz, R. J. (1998). A cis-acting peptide signal in human immunodeficiency virus type I Rev which inhibits nuclear entry of small proteins. *Oncogene*, 16(14), 1851–61. doi:10.1038/sj.onc.1201738
- McLinden, J. H., Stapleton, J. T., Chang, Q., & Xiang, J. (2008). Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication. *The Journal of infectious diseases*, 198(6), 860–3. doi:10.1086/591254
- Mendes, W. D. S., Branco, M. D. R. F. C., & Medeiros, M. N. L. (2006). Clinical case report: Dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(5), 905–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687700>
- Mendez, J. a, Usme-Ciro, J. a, Domingo, C., Rey, G. J., Sanchez, J. a, Tenorio, A., & Gallego-Gomez, J. C. (2010). Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology journal*, 7, 226. doi:10.1186/1743-422X-7-226
- Mondor, I., Ugolini, S., & Sattentau, Q. J. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of virology*, 72(5), 3623–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Noble, C. G., Chen, Y.-L., Dong, H., Gu, F., Lim, S. P., Schul, W., Wang, Q.-Y., et al. (2010). Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral research*, 85(3), 450–62. doi:10.1016/j.antiviral.2009.12.011

- Ospina, M. C., Diaz, F. J., & Osorio, J. E. (2010). Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellin, Colombia. *Tropical Medicine*, 83(3), 672–678. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0766
- Pollard, V. W., & Malim, M. H. (1998). THE HIV-1 REV PROTEIN. *Annual review of microbiology*, (52), 491–532.
- Rawlinson, S. M., Pryor, M. J., Wright, P. J., & Jans, D. a. (2009). CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *The Journal of biological chemistry*, 284(23), 15589–97. doi:10.1074/jbc.M808271200
- Reeves, J. D., & Doms, R. W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology*, 83(Pt 6), 1253–65. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=400359&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rico-Hesse Rebeca. (2008). Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(5), 629–629. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
- Selisko, B., Potisopon, S., Agred, R., Priet, S., Varlet, I., Thillier, Y., Sallamand, C., et al. (2012). Molecular basis for nucleotide conservation at the ends of the dengue virus genome. *PLoS pathogens*, 8(9), e1002912. doi:10.1371/journal.ppat.1002912
- Shadan, S. (2004). Unfolding targets for dengue fever. *Drug discovery today*, 9(8), 344. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127717>
- Siong, W. C., Ching, T. H., Jong, G. C., Pang, C. S., Jian, L., Vernon, M., & Sin, L. Y. (2008). DENGUE INFECTIONS IN HIV PATIENTS, 39(2), 3–8.
- Strebel, K. (2003). Virus – host interactions : role of HIV proteins Vif , Tat , and Rev. *Aids*, 17(4), 25–34. doi:10.1097/01.aids.0000104337.15729.7e
- Suhasini, M., & Reddy, T. R. (2009). Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Current HIV research*, 7(1), 91–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149558>
- Thomas, D. L. (2008). The challenge of hepatitis C in the HIV-infected person. *Annual review of medicine*, 59, 473–85. doi:10.1146/annurev.med.59.081906.081110
- UNAIDS. (2011). UNAIDS. Retrieved January 19, 2013, from <http://www.unaids.org/en/>

- Urcuqui-Inchima, S., Patiño, C., Zapata, X., García, M. P., Arteaga, J., Chamot, C., Kumar, A., et al. (2011). Production of HIV particles is regulated by altering sub-cellular localization and dynamics of Rev induced by double-strand RNA binding protein. *PloS one*, 6(2), e16686. doi:10.1371/journal.pone.0016686
- Watt, G., Kantipong, P., & Jongsakul, K. (2003). Decrease in human immunodeficiency virus type 1 load during acute dengue fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(8), 1067–9. doi:10.1086/374600
- WHO. (2010). WHO | Dengue. World Health Organization. Retrieved January 20, 2013, from <http://www.who.int/topics/dengue/en/>
- Xiang, J., McLinden, J. H., Chang, Q., Jordan, E. L., & Stapleton, J. T. (2008). Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PloS one*, 3(7), e2580. doi:10.1371/journal.pone.0002580
- Xiang, J., McLinden, J. H., Chang, Q., Kaufman, T. M., & Stapleton, J. T. (2006). An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15570–5. doi:10.1073/pnas.0604728103
- Xiang, J., McLinden, J. H., Rydze, R. a, Chang, Q., Kaufman, T. M., Klinzman, D., & Stapleton, J. T. (2009). Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), 7860–9. doi:10.4049/jimmunol.0902276
- Yap, T. L., Xu, T., Chen, Y.-L., Malet, H., Egloff, M.-P., Canard, B., Vasudevan, S. G., et al. (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *Journal of virology*, 81(9), 4753–65. doi:10.1128/JVI.02283-06