

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Granada



La 3' UTR del RNA genómico del virus del Nilo Occidental codifica información clave para la regulación de la traducción

Sara Esther Ramos Lorente

Directores

Dr. Alfredo Berzal Herranz

Dra. Cristina Romero López

Tutora

Dra. María Paz Carrasco Jiménez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sara Esther Ramos Lorente
ISBN: 978-84-1195-432-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/94840>

A quien trajo luz.

AGRADECIMIENTOS

Este viaje que, por duración, poco tiene que envidiarle a la Odisea de Ulises, empezó en 2017; cuando por un “voluntazo”, elegí un proyecto de TFG dirigido por un señor llamado Dr. Alfredo Berzal en el IPBLN-CSIC. Aunque aún no lo sabía, ese día me sirvió para dos cosas: hacer el doctorado, algo que me parecía entonces completamente fuera de mi alcance; y para convencerme de que, a veces, las mejores decisiones proceden de “voluntazos”. Tras siete años, una pandemia, mucho sudor, algunas lágrimas, mil contratiempos e incontables buenos momentos, por fin puedo agradecer su apoyo a todas las personas que han compartido conmigo este camino:

A mis directores de Tesis, el Dr. Alfredo Berzal-Herranz y la Dra. Cristina Romero López, por darme esta increíble oportunidad y confiar en mí cuando yo misma no hubiese apostado un duro. No puedo estar más agradecida por haber podido aprender de vosotros.

A Alfredo, que siempre tiene la puerta del despacho abierta, aún sabiendo que lo vamos a molestar con nuestro parloteo, las centrífugas y el “cacharreo”. Gracias por estar siempre dispuesto a atenderme, escucharme y ayudarme; por tu infinita paciencia y estoicismo; por mover cielo y tierra para hacerme un contrato y buscar siempre lo mejor para mí; por tu comprensión, empatía y por darme todas las facilidades del mundo; por dedicar cuerpo y alma al laboratorio y a la investigación, por tus consejos y por compartir todo ese conocimiento y experiencia conmigo. De ti he aprendido muchísimas cosas, pero me gustaría destacar dos. Primero, el rigor aplicado a todos los ámbitos y segundo, que un científico también es un artesano. Eres el mejor ejemplo que podía tener de cómo debe ser un jefe.

A Cristina, mi maestra jedi, *coach*, proveedora de protocolos salvavidas, mi jefa “molona”, psicóloga, asesora de imagen y amiga. Gracias por volcarte conmigo; por dedicar tantísimo tiempo a enseñarme, corregirme, resolver mis dudas, discutir “mis fumadas”, ayudarme en los momentos de crisis (ese gel que se raja tras 4 h de electroforesis); por transmitirme tu entusiasmo por los experimentos “bonitos”; por aconsejarme; por adaptarte a “mis procesos mentales” y por tratar de enseñarme

que las matemáticas son “guays” (aunque si hay algo menos “guay” que decir “guay”, son las mates). Gracias también por nuestras charlas de trapos, uñas, series y fútbol; por preocuparte por mí y compartir conmigo las cosas buenas y malas que me pasan. Eres una inspiración y te admiro muchísimo, espero ser algún día una investigadora tan competente, resolutiva e inteligente como tú. Te debo cervezas, jamones, churros, napolitanas, bizcochos, y no sé cuantas cosas más. Pero ni con todo eso podría agradecerte todo lo que me has enseñado y lo que has hecho por mí en estos años. Sé lo que estás pensando y si, sería un buen comienzo.

A Beatriz Berzal-Herranz, la mejor técnico que podía tener el laboratorio, nuestra *community manager*, gestora, relaciones públicas, administrativa, psicóloga, DJ... Y con competencias de madre. Eres la alegría del laboratorio con tu risa, tu música y tu charla (sola o acompañada). Gracias por nuestras charlas hasta las tantas; porque, aunque vayas “como las motos”, siempre tienes tiempo para ayudarme. Gracias por tus trucos supereficientes, por esos protocolos tan maravillosamente redactados que te puedes imaginar haciéndolos cuando los lees, por hacernos la vida y el trabajo más fácil a todos, por tus abrazos y por animarme siempre.

A mis padres, sois lo más importante de mi vida, mi pilar. Me habéis apoyado siempre en todo y el doctorado no ha sido una excepción. Gracias por demostrarme vuestro apoyo y orgullo incluso cuando me equivoco; por consolarme cuando tengo un mal día; por escucharme siempre, por muy pesadita que pueda llegar a ponerme con un tema; por vuestros *tuppers*, gracias a los cuales no he escrito la tesis a base de leche con galletas; por el mensaje diario de “buenos días” y “buenas noches”, que me recuerda que siempre estáis ahí para mí; por darme tantísimo cariño; por apoyarme en todas mis decisiones de forma incondicional y por aceptarme tal y como soy, aunque a veces os haga suspirar con mis ocurrencias.

A mi abuela Leonor. Al final lo conseguí, abu, voy a ser doctora. Ojalá estuvieses aquí para celebrarlo juntas porque estás en cada cosa que hago.

A Manu, mi compañero de aventuras desde los trece años y, por supuesto, durante esta última etapa. Eres mucho más que un ex o un amigo, eres parte de mi familia. Gracias por leerme la mente, por ayudarme a entender mejor el mundo que me rodea y por ser mi “Pepito Grillo”. Gracias por esas charlas que me ayudan tantísimo a despejarme; por hacerme reír incluso en mitad de los dramas; por cuidarme,

aconsejarme, escucharme; por tu sensatez... Y sobre todo, por ayudarme siempre a levantarme cuando me estrello, sin hacer un solo reproche.

Al Dr. Pablo Olgoso, mi “llenapizarras” favorito, gracias por enseñarme sobre partículas y estrellas. Gracias por animarme; por dibujarme a todas horas la sonrisa tonta (aunque sea con esos chistes TAN malos); por transmitirme paz; por demostrar tanta confianza en mí y por ayudarme a recuperar la ilusión. Gracias por nuestros piques de Triviat y por las horas de videollamada. Incluso a distancia, estás presente en mi día a día. Gracias por esas escapadas increíbles por Italia, que me han cargado las pilas estos últimos meses. Estoy muy orgullosa de ti, en el “pedazo” de doctor en el que te has convertido y en cómo te esfuerzas en mejorar siempre.

A mis compañeros del krav magá, mis “peleones”. Sin nuestros entrenamientos, me hubiese vuelto loca todo el día enfrente del ordenador. Gracias por ayudarme a desconectar de todo. Y sobre todo, gracias a Elena y Sascha, mis “ukes”, que me han apoyado en los momentos difíciles tanto dentro como fuera del tatami.

A Maria del Mar y a mis “hermanitos postizos”, Mariano y Juan Antonio, por haberme acogido como si fuese una más de la familia y tratarme con tanto cariño.

A Mari Paz Carrasco, mi tutora de tesis, por facilitarme siempre la burocracia del doctorado.

A mis compañeros y compañeras del “López-Neyra”, por tener una sonrisa y unas palabras de ánimo para mí y por estar siempre dispuestos a echar una mano, gracias a vosotros me he sentido muy cómoda en el centro. Gracias especialmente al Servicio de Genómica y particularmente, a Cristina; al Servicio de Proteómica y Radiactividad; al personal de Administración y a nuestros maravillosos conserjes: Lola, Yolanda, Javier y Daniel, porque el instituto no sería el mismo sin vosotros.

Y a todas aquellas personas a las que no puedo nombrar de forma individual porque tendría que escribir dos tomos de tesis: familia, amigos y compañeros de clase. Gracias por haberme acompañado durante el doctorado y haber contribuido con consejos, palabras de ánimo, cariño, una buena charla, unas cervecillas o unas risas. Muchísimas gracias por hacer más agradable el camino.

RESUMEN

La traducción de los genomas de RNA virales depende de la maquinaria celular del hospedador, por lo que los virus emplean mecanismos que les permiten competir por ella con los mRNAs celulares. Como otros virus RNA, los flavivirus codifican parte de su información genética en elementos estructurales conservados. Estos elementos se agrupan en dominios que regulan funciones virales esenciales, como la replicación y la traducción, mediante el ajuste de la estructura global del genoma viral a través del establecimiento de interacciones inter- e intramoleculares. En flavivirus, el inicio de traducción se produce principalmente por un mecanismo dependiente de cap, aunque en varios miembros del género se ha descrito un mecanismo alternativo independiente de cap. La 3' UTR genómica interviene en la regulación de ambos procesos, pero se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes. En la presente Memoria de Tesis Doctoral se proporciona evidencia de que, como en otros flavivirus, la 3' UTR del virus del Nilo Occidental (WNV) potencia la traducción viral dependiente e independiente de cap. Los resultados obtenidos apoyan que este efecto podría estar mediado por el reclutamiento específico de la subunidad ribosómica 40S a través de la 3' UTR. Se han identificado dos sitios de reclutamiento de 40S por la 3' UTR, en el elemento SL-III y en el dominio II, que podrían tener implicaciones funcionales diferentes. La combinación de técnicas de análisis estructural ha revelado requisitos conformacionales específicos en la 3' UTR para que se produzca la unión de 40S, los cuales implican a los elementos conservados SL-III, 5'DB, 3'DB y 3'SL, involucrados en la regulación de la traducción viral. También se aportan evidencias de que la formación del doble *pseudoknot* PK3-PK4, en el que están implicados los elementos 5' y 3'DB, es esencial para que se produzca el reclutamiento de 40S a través de cualquiera de los dos sitios identificados. Nuestro estudio, además, apunta a que el establecimiento de interacciones directas RNA-RNA a larga distancia entre los extremos del genoma viral tiene un efecto modulador de la estructura de la 3' UTR de WNV que permite la liberación de la subunidad 40S desde la 3' UTR al extremo 5' del RNA viral, facilitando su posicionamiento en las proximidades del codón de inicio de la traducción. En base a estos resultados, se propone que la interacción entre los extremos 5' y 3' podría actuar como regulador del reclutamiento de 40S y,

en último término, como regulador de la traducción en WNV. Finalmente, se aportan evidencias que sugieren que el reclutamiento de la subunidad 40S a través de la 3' UTR es un mecanismo conservado en otros miembros del género *Flavivirus*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I.1. Estructuroma e interactoma del RNA: más allá de la secuencia	3
I.2. <i>Flavivirus</i>	6
I.2.1. El virus del Nilo Occidental	8
I.2.2. Morfología	10
I.2.3. Ciclo intracelular	11
I.2.4. Organización del genoma	13
I.2.4.1. Región no traducible 5'	15
I.2.4.2. Región no traducible 3'	17
I.2.5. Ciclación del genoma viral	21
I.2.5.1. Ciclación en la traducción	25
I.2.5.2. Ciclación en la replicación	26
I.3. Mecanismos de regulación de la traducción	28
I.3.1. Mecanismo canónico de inicio de la traducción dependiente de cap	28
I.3.2. Mecanismos no canónicos de inicio de la traducción	30
I.3.2.1. Desviaciones del sistema de selección del codón de inicio de la traducción	31
I.3.2.2. Inicio de traducción dependiente de VPg	32
I.3.2.3. Inicio interno de la traducción	33
I.3.3. Elementos potenciadores de la traducción independientes de cap en la 3' UTR	36
I.3.3.1. Virus vegetales	36
I.3.3.2. Virus animales	39

MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. Materiales	47
M.1.1. Reactivos químicos	47
M.1.2. Isótopos radiactivos	47
M.1.3. Enzimas de restricción	47
M.1.4. Medios de cultivo	48
M.1.4.1. De bacterias	48
M.1.4.2. De células eucariotas	48
M.1.5. Tampones	48
M.1.5.1. Para electroforesis	48
M.1.5.2. Para reacciones de unión	49

M.1.5.3. Para la extracción y purificación de la subunidad 40S	49
M.1.6. Cepas bacterianas	50
M.1.7. Líneas celulares eucariotas	50
M.1.8. Marcadores de masa molecular	51
M.1.8.1. Para DNA	51
M.1.8.2. Para RNA	51
M.1.8.3. Para proteínas	51
M.1.9. Programas informáticos	51
M.1.10. Oligonucleótidos	52
M.1.11. Construcciones de RNA	54
M.1.11.1. A partir del plásmido pGL-WNV	54
M.1.11.2. A partir del plásmido pUC-3'WNV	56
M.1.11.3. A partir del plásmido pBS SK(+) digerido con <i>Xba</i> I	56
M.1.11.4. A partir del plásmido pUC-3'DENV	56
M.1.11.5. A partir del plásmido pUC-3'YFV	56
M.1.11.6. A partir del plásmido pgl-5'WNV-3'DENV	57
M.2. Métodos	58
M.2.1. Cultivo de bacterias	58
M.2.2. Crioconservación de bacterias	58
M.2.3. Transformación	58
M.2.4. Selección de colonias recombinantes	59
M.2.5. Cultivo de células eucariotas	59
M.2.6. Transfección	60
M.2.7. Cuantificación de la actividad luciferasa	60
M.2.8. Ensayo de estabilidad intracelular	61
M.2.9. Extracción y purificación de la subunidad 40S	62
M.2.10. Aislamiento de DNA plasmídico	63
M.2.11. Síntesis de ácidos nucleicos	64
M.2.11.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
M.2.11.2. Transcripción <i>in vitro</i>	65
M.2.11.3. Retrotranscripción	66
M.2.12. Mutagénesis dirigida	66
M.2.13. Construcción de híbridos subgenómicos virales por recombinación	68
M.2.14. Marcaje de ácidos nucleicos	68
M.2.14.1. Marcaje radiactivo en el extremo 5'	68
M.2.14.2. Marcaje radiactivo interno	68
M.2.15. Purificación de ácidos nucleicos	69
M.2.15.1. Extracción fenólica y precipitación con etanol	69
M.2.15.2. En gel de agarosa	69

M.2.15.3. En gel de poliacrilamida.....	70
M.2.15.4. Cromatografía de exclusión por tamaño	70
M.2.16. Electroforesis.....	71
M.2.16.1. De ácidos nucleicos	71
M.2.16.2. De proteínas.....	72
M.2.17. Secado de geles de poliacrilamida	73
M.2.18. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	73
M.2.18.1. De DNA y RNA no marcado en solución.....	73
M.2.18.2. De RNA marcado radiactivamente internamente en solución	74
M.2.18.3. De RNA marcado radiactivamente inmovilizado en soporte sólido.....	74
M.2.19. Secuenciación automática de DNA.....	75
M.2.20. Reacciones de asociación.....	75
M.2.20.1. Ensayos de unión	75
M.2.20.2. Ensayos de competición de la unión	76
M.2.21. Separación de complejos RNA-40S del RNA libre.....	76
M.2.22. Ensayos de inhibición de extensión de cebador	77
M.2.23. Técnicas de análisis estructural a gran escala.....	77
M.2.23.1. <i>Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE)</i>	77
M.2.23.2. <i>2'-Hydroxyl molecular interference</i>	79
M.2.24. Análisis proteómico por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	80

RESULTADOS

R.1. La 3' UTR de WNV regula la traducción viral.....	85
R.2. Estudio de la afinidad y especificidad de la unión de la 3' UTR de WNV a la subunidad ribosómica 40S	88
R.2.1. La 3' UTR de WNV interacciona con la subunidad 40S con elevada afinidad	88
R.2.2. La unión entre la subunidad 40S y la 3' UTR de WNV es específica.....	90
R.3. El reclutamiento de 40S está influido por elementos de la 3' UTR de WNV	92
R.4. La 3' UTR de WNV une la subunidad 40S a través de SL-III y del dominio II	98
R.5. Análisis estructural de la interacción 3'WNV-40S	102
R.5.1. La unión de 40S induce cambios conformacionales en la 3' UTR de WNV	102
R.5.2. La 3' UTR de WNV adquiere una conformación específica para unirse a la subunidad 40S	108
R.6. Implicación de proteínas ribosómicas la unión de 40S por parte de la 3' UTR de WNV.....	111
R.7. La unión de la subunidad 40S por la 3' UTR está influida por el extremo 5' del genoma viral.....	114

R.8. Las interacciones entre los extremos del genoma son compatibles con la unión de 40S.	120
R.9. El reclutamiento de 40S por la 3' UTR podría mediar el efecto potenciador de la traducción	124
R.10. La unión de 40S a través de la 3' UTR es un mecanismo presente en otros flavivirus	127
R.10.1. La 3' UTR de DENV y YFV une la subunidad 40S	127
R.10.2. Identificación de los sitios de unión a la subunidad 40S en la 3' UTR de DENV	128
DISCUSIÓN	
Discusión	135
CONCLUSIONES	
Conclusiones	157
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	161

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. Clasificación de los flavivirus.....	6
Tabla I.2. Clasificación de los IRES virales.....	35
Tabla I.3. Clasificación de los 3'-CITEs en función de los requerimientos de factores.....	36

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M.1. Oligonucleótidos empleados en la obtención del DNA molde para la síntesis de las construcciones de RNA deletéreas.....	55
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESULTADOS

Tabla R.1. Constantes obtenidas para la unión 3'WNV-40S según la Ec.2.....	90
Tabla R.2. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S de las construcciones deletéreas por 3' a partir de la Ec.1.....	93
Tabla R.3. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S de las construcciones deletéreas por 5' a partir de la Ec.1.....	95
Tabla R.4. Proteínas ribosómicas identificadas por LC-MS/MS que interaccionan directamente con la 3' UTR de WNV.....	113
Tabla R.5. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S según la Ec.1 de las construcciones 3'WNV, 3'DENV y 3'YFV.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Esquema del sistema de codificación dual de la información en el RNA.....	4
Figura I.2. Epidemiología de DENV a nivel mundial.....	7
Figura I.3. Representación del ciclo de transmisión de WNV.....	8
Figura I.4. Organización del virión en flavivirus.....	11
Figura I.5. Ciclo intracelular de flavivirus.....	13
Figura I.6. Estructura secundaria propuesta de los extremos 5' y 3' del genoma de WNV.....	14
Figura I.7. Comparación de la estructura secundaria teórica de la 5' y 3' UTR de diferentes MBFVs.....	16
Figura I.8. Interacciones RNA–RNA implicadas en la ciclación del genoma flaviviral.....	23
Figura I.9. Modelo sobre la alternancia de la conformación lineal y ciclada del genoma en la regulación del inicio de replicación.....	27
Figura I.10. Inicio de la traducción dependiente de cap.....	29
Figura I.11. Comparación del inicio de traducción dependiente de cap y el mediado por IRES.....	34
Figura I.12. Mecanismo de potenciación de la traducción a través de 3'-CITEs.....	38

RESULTADOS

Figura R.1. La 3' UTR de WNV potencia la traducción dependiente de cap.....	86
Figura R.2. La 3' UTR de WNV regula la traducción independiente de cap.....	87
Figura R.3. La 3' UTR de WNV recluta la subunidad 40S con elevada afinidad y a través de más de un sitio de unión.....	89
Figura R.4. La interacción entre la 3' UTR de WNV y la subunidad 40S es específica.....	91
Figura R.5. En la 3' UTR de WNV existe un sitio de unión a 40S en 5' del elemento 5'DB.....	92
Figura R.6. La subunidad 40S se une a los elementos sHP-3'SL de la 3' UTR de WNV.....	94
Figura R.7. El <i>pseudoknot</i> PK3 es crítico para la interacción 3' UTR-40S.....	96
Figura R.8. La presencia de SL-III incrementa la eficiencia de unión a 40S, pero no la afinidad.....	97
Figura R.9. Representación esquemática del ensayo de inhibición de extensión de cebador.....	98
Figura R.10. La subunidad 40S es reclutada a través del dominio II y del elemento SL-III.....	99
Figura R.11. La subunidad 40S se une a SL-III y 5'DB en condiciones equimolares.....	101
Figura R.12. El análisis SHAPE con NMIA revela que el reclutamiento de 40S induce cambios conformacionales en la 3' UTR de WNV.....	104
Figura R.13. El análisis SHAPE con 1M6 apoya la existencia de sitios de unión a 40S en el elemento SL-III y el dominio II.....	105
Figura R.14. La unión de 40S origina cambios conformaciones en la 3' UTR de WNV.....	107

Figura R.15. La unión de 40S a la 3' UTR requiere una conformación determinada de SL-II, SL-III y 3'DB.....	107
Figura R.16. La interacción 3' UTR WNV-40S implica la participación de proteínas ribosómicas...	112
Figura R.17. El sitio de unión a 40S de alta afinidad se localiza en el dominio II.....	114
Figura R.18. Implicación de sHP-3'SL en la unión de la subunidad 40S.....	116
Figura R.19. El reclutamiento de 40S por la 3' UTR de WNV está influido por la presencia del extremo 5' del genoma.....	117
Figura R.20. La 3' UTR contribuye al posicionamiento de 40S en el extremo 5' del genoma de WNV.....	118
Figura R.21. El extremo 5' del genoma induce cambios estructurales en la 3' UTR independientes de 40S.....	121
Figura R.22. La delección de elementos de la 3' UTR de WNV implicados en la unión de 40S interfiere con la regulación de la traducción viral.....	124
Figura R.23. DENV y YFV también unen la subunidad 40S a través de la 3' UTR	127
Figura R.24. Los elementos sHP-3'SL de DENV unen la subunidad 40S en presencia del extremo 5' del genoma de WNV.....	129
Figura R.25. La subunidad 40S es reclutada en la base de los elementos SL-II y 5'DB de la 3' UTR de DENV.....	131

DISCUSIÓN

Figura D.1. Predicción de la estructura tridimensional del elemento 5'DB de WNV.....	139
Figura D.2. Predicción de la estructura tridimensional del elemento SL-III de WNV.....	141
Figura D.3. Predicción de la estructura tridimensional de los dominios II y III de la 3' UTR de WNV.....	143
Figura D.4. Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a la 3' UTR de WNV, DENV y YFV.....	151
Figura D.5. Modelo de regulación de la traducción mediado por el reclutamiento de 40S a través de la 3' UTR de WNV.....	153

ABREVIATURAS

ψDB	Pseudo- <i>dumbbell</i>
1M6	Anhídrido 1-metil-6-nitroisatoico
B_{max}	Rendimiento máximo de formación de complejo RNA-proteína
BTE	<i>BYDF-like translation enhancer</i>
BYDV	Virus del enanismo amarillo de la cebada (<i>Barley yellow dwarf virus</i>)
cDNA	DNA complementario
CFAV	Virus agente de fusión celular (<i>Cell-fusing agent virus</i>)
clSFV	Clado de ISFV clásicos
CITE	Estimulador de la traducción independiente de cap (<i>Cap-Independent Translation Element</i>)
CPS	Cuentas por segundo (unidad)
CR	Complejos de replicación
CRE	<i>Cis-acting replicating element</i>
CYC	<i>Cyclization sequence</i>
CS	<i>Conserved sequence</i>
diSFV	Clado de ISFV con doble hospedador
D.O.	Densidad óptica
DAR	<i>Downstream of AUG region</i>
DB	Estructura tipo <i>dumbbell</i>
ddCTP	2',3'-Dideoxicitidina-5'-trifosfato
ddTTP	2',3'-Dideoximidina-5'-trifosfato
DENV	Virus del Dengue
DHX9	<i>DEAH box helicase 9</i>
DMEM-LG	Medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DONGV	Virus Donggang
DPM	Desintegraciones por minuto (unidad)
DTMUV	Virus Tembusu de pato (<i>Duck Tembusu virus</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
eIF	Factor de inicio de la traducción (<i>Eukaryotic initiation factor</i>)
FLuc	Luciferasa de la luciérnaga <i>Photinus pyralis</i>

FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
G-MEM	Medio esencial mínimo de Glasgow
HCV	Virus de la hepatitis C
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HMX	Interferencia molecular de los grupos 2' hidroxilo (<i>2'-Hydroxyl molecular interference</i>)
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (<i>Internal ribosome entry site</i>)
ISFV	<i>Flavivirus</i> específicos de insectos (<i>Insect-specific flavivirus</i>)
ISS	(3'-CITE tipo) <i>I-shaped structure</i>
ITAF	Factor de interacción con el IRES (<i>IRES trans-acting factor</i>)
JEV	Virus de la encefalitis japonesa (<i>Japanese encephalitis virus</i>)
K_d	Constante de disociación
LB	(Medio) Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
MBFV	<i>Flavivirus</i> transmitidos por mosquitos (<i>Mosquito-borne flavivirus</i>)
MEM	Medio esencial mínimo
MODV	Virus Modoc
mRNA	RNA mensajero
NKFV	<i>Flavivirus</i> con vector desconocido (<i>No known vector flavivirus</i>)
NMIA	Anhídrido N-metilisatoico
nt	Nucleótidos (unidad)
NTAV	Virus Ntaya
NTP	Nucleótido trifosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Orgánulos de replicación vírica
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PABP	<i>Poli-A-Binding Protein</i>
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pb	Pares de bases (unidad)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
P_i	Fosfato inorgánico
PK	<i>Pseudoknot</i>
PSA	Persulfato amónico
PTB	<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i>
PTE	<i>Panicum mosaic virus like translation enhancer</i>
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RIQ	Rango intercuartil, Q ₃ -Q ₁
RLuc	Luciferasa de <i>Renilla</i>
RNA	Ácido ribonucleico

RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto (unidad)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero fetal bovino
sfRNA	RNA subgenómico no codificante de <i>Flavivirus</i> (<i>small flavivirus RNA</i>)
SHAPE	Ensayo de acilación de los grupos 2' hidroxilo analizada por extensión del cebador (<i>Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension</i>)
sHP	Tallo-lazo S (<i>Short hairpin</i>)
SINV	Virus Sindbis
SL	Tallo-lazo <i>Sstem-loop</i>)
Sp.	Especies
SPOV	Virus Spondweni
T7p	Secuencia promotora de la RNA polimerasa del fago T7
TABV	Virus del murciélago de Tamana (<i>Tamana bat virus</i>)
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBEV	Virus de la encefalitis por garrapatas (<i>Tick-borne encephalitis-virus</i>)
TBFV	<i>Flavivirus</i> transmitidos por garrapatas (<i>Tick-borne flavivirus</i>)
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TED	<i>Translation enhancer domain</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
T_m	Temperatura de desnaturalización (<i>melting</i>)
TMED	Tetrametiletildiamina
TMUV	Virus Tembusu
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
tRNAi	tRNA iniciador (unido a metionina)
TSS	(3'-CITE tipo) <i>T-shape structure</i>
UAR	<i>Upstream of AUG region</i>
UTR	Región no traducible (<i>Untranslated region</i>)
UV	Ultravioleta
VPg	<i>Viral protein genome linked</i>
WNV	Virus del Nilo Occidental (<i>West Nile Virus</i>)
YB-1	<i>Y box-binding protein-1</i>
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla (<i>Yellow Fever Virus</i>)
YSS	(3'-CITE tipo) <i>Y-shaped structure</i>
ZIKV	Virus del Zika

INTRODUCCIÓN



La portada de los diferentes capítulos de la tesis muestra una predicción de la estructura tridimensional de los dominios II y III de la 3' UTR genómica de WNV obtenida con el programa *RNAComposer* a partir de su estructura secundaria teórica.

I.1. ESTRUCTUROMA E INTERACTOMA DEL RNA: MÁS ALLÁ DE LA SECUENCIA

El RNA desempeña un papel central en numerosos procesos biológicos y su complejidad funcional va más allá de la codificación de proteínas. Se han identificado numerosas moléculas de RNA que, pese a que no actúan como molde para la síntesis de proteínas, codifican información esencial para la vida; y la estructura desempeña un papel clave en su funcionamiento. La relación estructura-función es extraordinariamente compleja. Al igual que las proteínas, las moléculas de RNA adoptan una estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (**Figura I.1**). La estructura primaria hace referencia a la secuencia nucleotídica. La estructura secundaria y terciaria constituyen dos niveles de compactación del RNA que se definen por interacciones intramoleculares basadas en apareamientos de bases Watson-Crick o apareamientos de bases no canónicos. La estructura secundaria se refiere a las interacciones locales, que permiten la formación de diferentes tipos de lazos (*loops*), tallos (*stems*) u horquillas (*hairpins*) (Leontis & Westhof, 2001), mientras que la estructura terciaria se origina por el establecimiento de interacciones entre regiones distantes de la cadena de RNA (S. J. Chen, 2008; Hendrix et al., 2005). La combinación de estos niveles de plegamiento define la conformación tridimensional de las moléculas de RNA, el denominado estructuroma (Wan et al., 2011). Finalmente, el RNA desempeña su función biológica mediante la interacción con otras moléculas, como metabolitos, proteínas, DNA u otras moléculas de RNA, lo cual define la estructura cuaternaria (Dai et al., 2020). El amplio abanico de interacciones intra- e intermoleculares resultante define el interactoma de RNA (**Figura I.1**) (Bludau & Aebersold, 2020).

La estructura tridimensional condiciona la función de la molécula de RNA. Además, dicha estructura es dinámica y experimenta procesos de transición entre diferentes estados conformacionales biológicamente funcionales (Denny & Greenleaf, 2019). El interactoma condiciona el intercambio entre las diferentes conformaciones del RNA y, a su vez, la estructura del RNA condiciona la afinidad y especificidad de las interacciones (Denny & Greenleaf, 2019). Así pues, el estudio de la arquitectura del RNA, su dinamismo conformacional y sus interacciones con otras moléculas, se ha convertido en una necesidad fundamental para comprender los mecanismos de actuación de los RNAs.

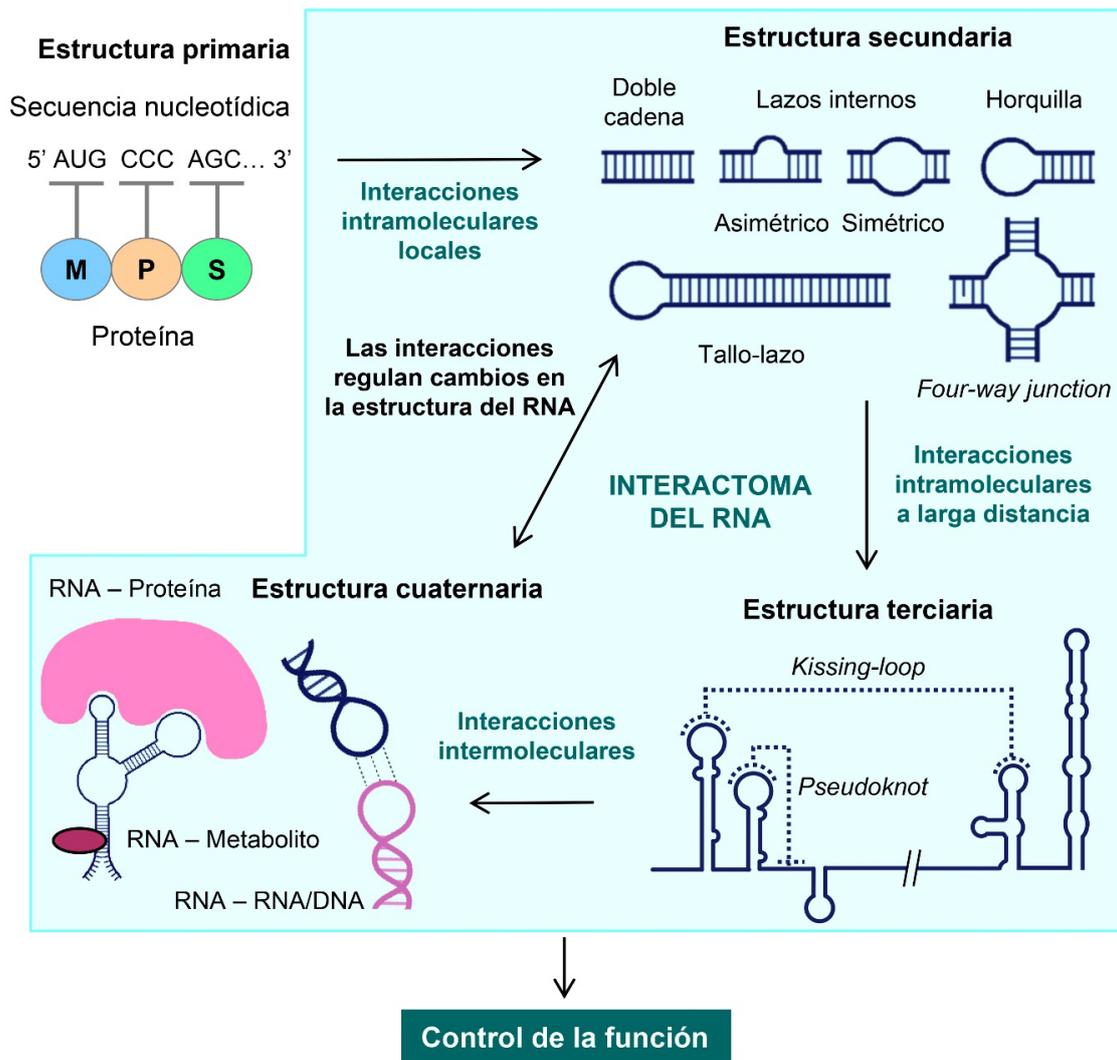


Figura I.1. Esquema del sistema de codificación dual de la información en el RNA. El RNA adopta una estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria que es crucial para su función. La estructura primaria se corresponde a la secuencia de nucleótidos. La estructura secundaria implica la formación de lazos, tallos y horquillas como resultado de apareamientos de bases locales. La estructura terciaria surge de interacciones intramoleculares a larga distancia. La estructura cuaternaria se refiere al establecimiento de interacciones intermoleculares con metabolitos, proteínas, DNA u otras moléculas de RNA. La compleja red de interacciones intra- e intermoleculares en las que participan el RNA definen su interactoma. El interactoma influye en la estructura tridimensional del RNA y, por consiguiente, en su función.

El **genoma de los virus RNA** es una entidad compacta que contiene toda la información necesaria para completar el ciclo infeccioso. Además de actuar como molde de replicación y traducción, los genomas virales de RNA contienen dominios altamente conservados que presentan un plegamiento complejo e intervienen de forma directa en el ciclo viral. Estos dominios funcionales adoptan estructuras específicas, que les permiten ejecutar funciones esenciales para el virus a través del reclutamiento directo de factores virales y/o celulares así como en el

establecimiento de interacciones RNA–RNA a larga distancia que regulan la arquitectura global del genoma (Berzal-Herranz et al., 2019; Romero-López & Berzal-Herranz, 2020). La conservación estructural existente en el genoma de los virus RNA contrasta con su enorme variabilidad genética, resultado de las elevadas tasas de error de las RNA polimerasas dependientes de RNA viral. Esta variabilidad les confiere una gran adaptabilidad a nuevos entornos moleculares y celulares, favorece la evasión de las defensas del hospedador, así como el desarrollo de resistencia a los fármacos antivirales (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016; Villa et al., 2021). De este modo, el equilibrio entre la variabilidad de la secuencia y la preservación de la estructura determina el éxito de las poblaciones virales.

El estudio de la secuencia y de la estructura del genoma viral, junto con el análisis del interactoma virus-hospedador, constituye una potente herramienta para arrojar luz sobre los mecanismos moleculares empleados por el virus para infectar a los organismos hospedadores y secuestrar su maquinaria celular. A su vez, dicha información permitirían identificar y seleccionar potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos antivirales específicos y eficientes (Romero-López et al., 2021). Los elementos estructurales conservados presentes en el RNA genómico podrían constituir excelentes dianas terapéuticas ya que, el bloqueo de su interacción con factores celulares y/o virales, o bien, la interferencia con su plegamiento, puede comprometer seriamente la viabilidad viral.

I.2. FLAVIVIRUS

Flavivirus es un género de virus RNA perteneciente a la familia *Flaviviridae*. El nombre flavivirus (del latín *flavus*, amarillo) hace referencia a la ictericia provocada por las infecciones graves del virus de la fiebre amarilla (YFV) y se utiliza comúnmente para referirse a los miembros de este género. *Flavivirus* incluye más de 70 especies entre los que se incluyen patógenos humanos y animales (**Tabla I.1**) causantes de enfermedades que van, desde infecciones asintomáticas, hasta complicaciones neurológicas graves (encefalitis, meningitis o meningoencefalitis), o hemorragias, que pueden resultar letales (Higuera & Ramírez, 2019).

Tabla I.1. Clasificación de los flavivirus *

Nombre	Abreviatura
Transmitidos por mosquitos	MBFV
Clado del virus del Dengue	DENV
Serotipo 1 del virus del Dengue	DENV-1
Serotipo 2 del virus del Dengue	DENV-2
Serotipo 3 del virus del Dengue	DENV-3
Serotipo 4 del virus del Dengue	DENV-4
Clado del virus de la encefalitis japonesa	Clado JEV
Virus de la encefalitis japonesa	JEV
Virus del Nilo occidental	WNV
Clado del virus Spondweni	SPOV
Virus del Zika	ZIKV
Clado del virus de la fiebre amarilla	YFV
Virus de la fiebre amarilla	YFV
Clado del virus Ntaya	NTAV
Virus Tembusu	TMUV
Virus Tembusu de pato	DTMUV
Transmitidos por garrapatas	TBFV
Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	TBEV
Sin vector conocido	NKFV
Virus Modoc	MODV
Específicos de insectos	ISFV
Clado de ISFV clásicos	ciSFV
Virus agente de fusión celular	CAV
Clado de ISFV con doble hospedador	diSFV
Virus del murciélago de Tamana	TABV
Flavivirus no clasificados	
Flavivirus relacionados con MBFV	
Virus Donggang	DONGV

* Se incluyen los clados mencionados en el texto y ejemplos representativos de cada grupo.

Los flavivirus se clasifican de acuerdo al artrópodo que actúa como vector en su ciclo de transmisión (**Tabla I.1**): i) flavivirus transmitidos por mosquitos (MBFV); ii) flavivirus transmitidos por garrapatas (TBFV); iii) flavivirus con vector desconocido (NKFV); iv) flavivirus específicos de insectos (ISFV); y v) flavivirus no clasificados (Blitvich et al., 2017). Estos grupos se dividen, a su vez, en clados y especies.

El grupo más significativo desde un punto de vista clínico son los MBFV, entre los cuales destacan los cuatro tipos de serotipos del virus del dengue (DENV); el virus del Zika (ZIKV); el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) o YFV (**Tabla I.1**). Se estima que sólo DENV causa en la actualidad 390 millones de infecciones totales al cabo del año (Brady et al., 2012). En los últimos setenta años, el número de personas infectadas por el virus ha aumentado de forma constante, hasta el punto de que, hoy en día, el dengue es la enfermedad vírica transmitida por artrópodos con mayor prevalencia del mundo (Pierson & Diamond, 2020). De acuerdo con datos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), desde principios de 2024 se han registrado más de dos millones de casos de dengue y más de 500 muertes relacionadas con esta enfermedad en todo el mundo (**Figura I.2**).

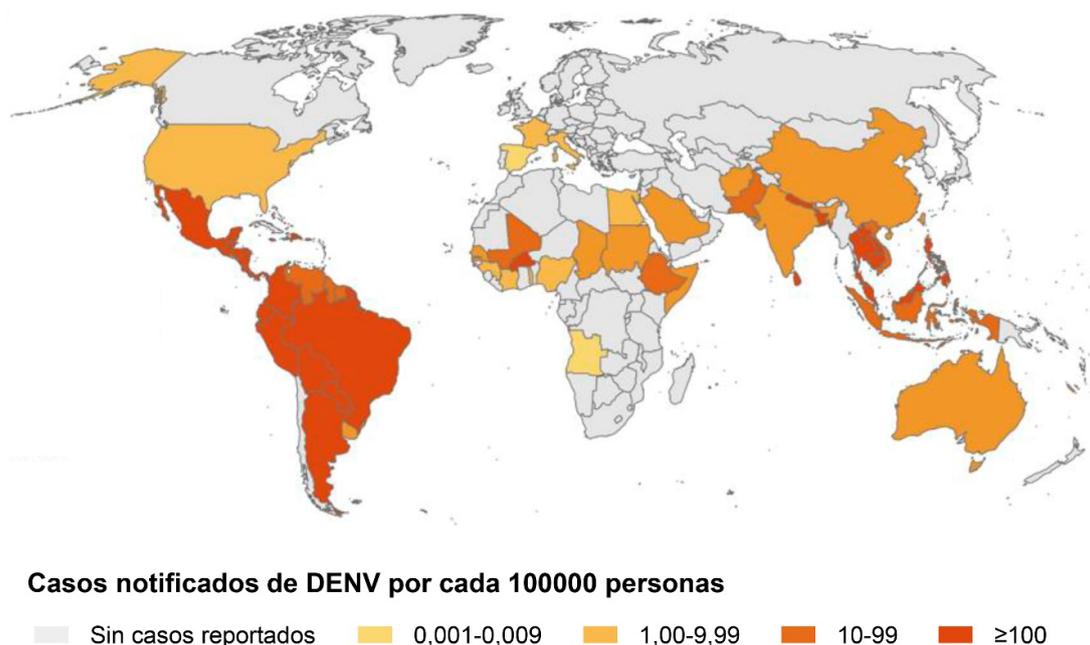


Figura I.2. Epidemiología de DENV a nivel mundial. Representación de la tasa de notificación de los casos de enfermedad por DENV por cada 100000 habitantes. Se muestran los datos recogidos entre marzo de 2023 y febrero de 2024 a nivel mundial. Fuente: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Figura tomada de: <https://www.ecdc.europa.eu/en>

Otro ejemplo de la hegemonía de los flavivirus se encuentra en la gran epidemia de ZIKV que se inició en Brasil en el año 2015, y durante la cual se estableció, por primera vez, una relación entre la infección por ZIKV y la microcefalia en neonatos (de Araújo et al., 2018). Como resultado del brote y su posterior expansión por América, entre febrero y noviembre de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la microcefalia y otras alteraciones neurológicas asociadas a la infección por ZIKV como emergencia de salud pública de importancia internacional (World Health Organization, 2022).

I.2.1. EL VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL

El modelo biológico elegido para el presente trabajo de Tesis Doctoral es WNV, un flavivirus que se ha expandido de forma considerable por todo el mundo durante las últimas décadas. Aunque WNV circula en la naturaleza entre mosquitos del género *Culex* sp. y aves, los seres humanos, equinos y otros mamíferos constituyen hospedadores accidentales, dado que experimentan una viremia transitoria y de bajo nivel que, salvo raros casos, no permite la transmisión del virus (Figura I.3) (Higgs et al., 2005).

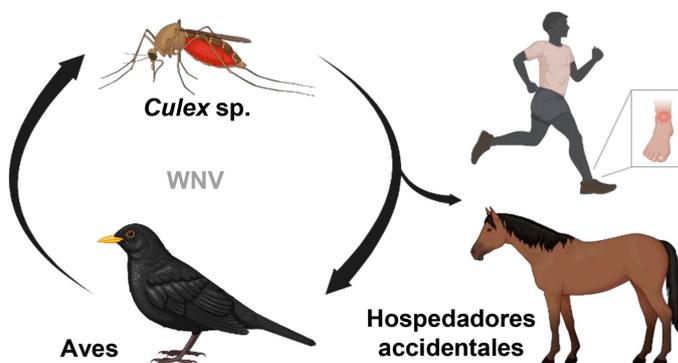


Figura I.3. Representación del ciclo de transmisión de WNV. Los reservorios naturales de WNV son las aves. Los mosquitos del género *Culex* sp., actúan como los principales vectores responsables de la transmisión del virus. Los seres humanos y otros mamíferos, como los caballos, constituyen hospedadores accidentales que son infectados a través de la picadura de un mosquito.

Desde que se aisló por primera vez en Uganda en 1937 (Smithburn et al., 1940), WNV había causado brotes esporádicos de enfermedad febril repartidos por África, Oriente Medio, Asia y Australia que no se asociaban a una enfermedad humana grave. Constituyen excepciones de este periodo los brotes acontecidos en Israel y en Francia en la década de 1960, en los cuales se describieron casos de encefalitis tanto en humanos como en equinos (Rossi et al., 2010). En la década de 1990, la epidemiología de la infección cambió. Los brotes detectados en Europa del Este se

asociaron a una enfermedad notablemente más severa en humanos que conllevaba complicaciones neurológicas e incluso el fallecimiento de los individuos afectados (Hubálek & Halouzka, 1999). En el verano de 1999, WNV provocó un brote en Nueva York que se extendió al resto de Norteamérica, donde actualmente es endémico. Desde la primera vez que se detectó en 2001, el virus también se ha propagado por América Central y del Sur (Reiter, 2010). En Europa, WNV sigue originando brotes que cursan con una enfermedad neurológica grave (Erdélyi et al., 2007; Veo et al., 2019). En 2018, un número inusualmente alto de infecciones en caballos y personas fueron notificados en el sur de Europa (Sansom et al., 2018). La razón de esta rápida expansión reside en el movimiento internacional de pasajeros, el comercio exterior y el cambio climático, los cuales han favorecido la dispersión de los vectores por todo el mundo. La OMS considera a WNV un virus re-emergente en Europa desde 1996 y emergente en América desde 1999; apoyando de forma intensiva la vigilancia y respuesta a los brotes epidémicos de WNV.

En España, desde 2010, se han detectados numerosos brotes de WNV en equinos y aves silvestres en las Comunidades Autónomas de Andalucía, Extremadura, Castilla-La Mancha, Castilla y León y Cataluña y, actualmente, el país experimenta una situación endémica (Llorente, 2023). La amplia diversidad de potenciales reservorios, la proximidad a zonas endémicas como África, el clima, las rutas migratorias de las aves y la distribución de los vectores del virus propician el mantenimiento y circulación del mismo (Cuervo et al., 2022).

En ~80% de las personas infectadas, la infección por WNV es asintomática. Alrededor del 20% de las personas infectadas desarrollan la denominada Fiebre del Nilo Occidental, cuyos síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, cansancio y dolores corporales, náuseas, vómitos e inflamación de los ganglios linfáticos; y, aproximadamente un 1%, desarrolla una forma neuroinvasiva de la enfermedad (encefalitis o meningitis) (Rossi et al., 2010).

Aunque se han desarrollado vacunas eficaces frente a YFV, JEV y DENV, actualmente no existen vacunas contra WNV en humanos. La situación se ve agravada por el hecho de que, aunque existen algunos antivirales que han demostrado su eficacia *in vitro* e *in vivo*, dichos tratamientos todavía no han sido probados en ensayos clínicos (Wu et al., 2023).

I.2.2. MORFOLOGÍA

La información que se tiene en cuanto a la morfología, ciclo viral y organización del genoma de WNV se ha inferido a partir de estudios realizados sobre diferentes especies de MBFV. Por esta razón, en los próximos apartados se hace referencia a flavivirus, de forma general, citando en cada caso las diferencias o excepciones existentes dentro del género.

Los viriones maduros de flavivirus tienen un diámetro de 40–60 nm. La nucleocápsida, formada por el RNA viral y múltiples copias de la proteína C, está rodeada de una bicapa lipídica derivada de la célula infectada. La cubierta externa tiene simetría icosaédrica y está compuesta por 90 heterodímeros de las glicoproteínas M y E ancladas a la membrana (**Figura I.4A**) (Kuhn et al., 2002). El RNA genómico de flavivirus codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que es procesada por proteasas celulares y virales para dar lugar a diez proteínas virales (**Figura I.4B**). Tres de ellas constituyen los componentes estructurales del virus: la proteína de la cápsida C y las glicoproteínas de la envuelta M (cuyo precursor es prM) y E (**Figura I.4B**) (Pierson & Diamond, 2020).

Las siete proteínas virales restantes presentan funciones no estructurales (**Figura I.4B**). NS1 se localiza en el lumen del retículo endoplasmático (RE) e induce la formación de invaginaciones en su membrana para permitir el ensamblaje del complejo de replicación viral (**I.3.3.**) (Muller & Young, 2013). NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son proteínas integrales de membrana responsables del ensamblaje del complejo de replicación. NS3 es una proteína multifuncional que consta de un dominio con actividad proteasa N-terminal y de un dominio helicasa C-terminal. La actividad proteasa requiere NS2B como cofactor e interviene en el procesamiento de la poliproteína viral (Chambers et al., 1991; Falgout et al., 1991). El dominio helicasa está implicado en la replicación del genoma (Benarroch et al., 2004; H. Li et al., 1999). El dominio N-terminal de NS5 presenta actividad metiltransferasa y RNA guaniltransferasa, las cuales permiten la incorporación de un grupo cap de tipo I (m^7GpppN^m) al extremo 5' del genoma viral; mientras que el dominio C-terminal actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA (Ackermann & Padmanabhan, 2001; Issur et al., 2009).

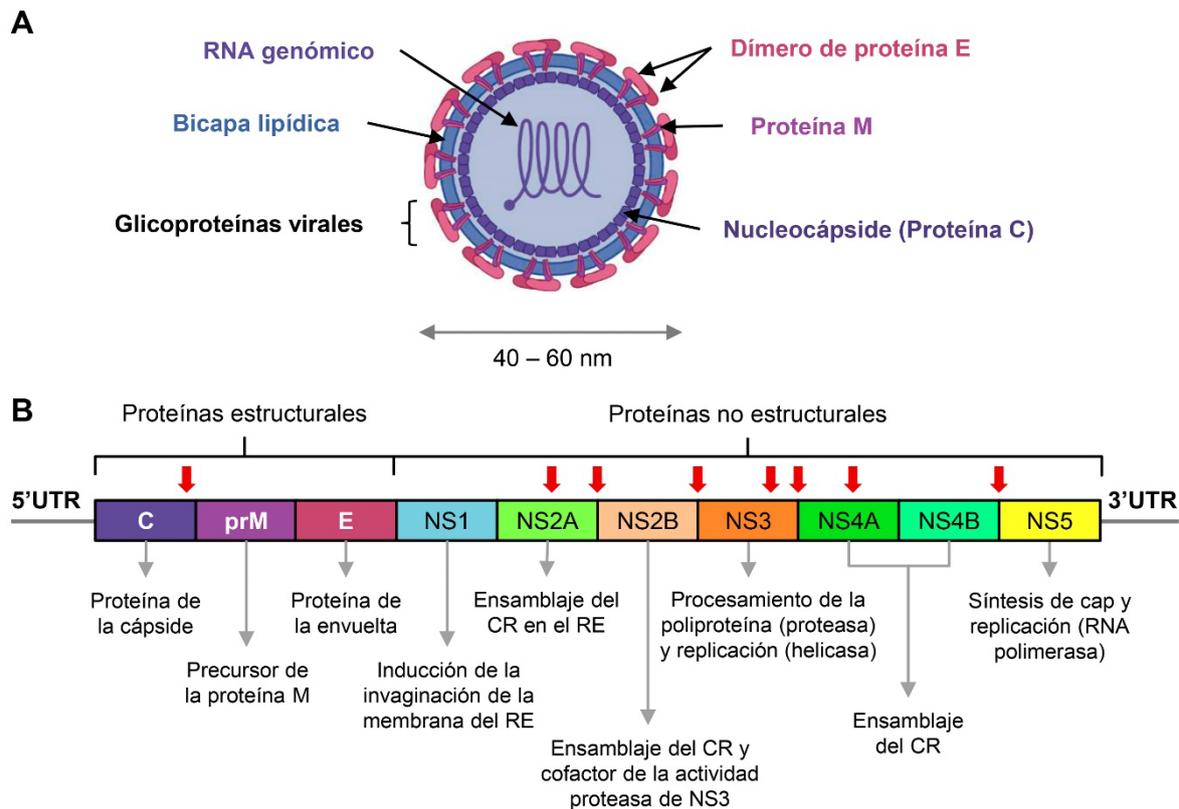


Figura I.4. Organización del virión en flavivirus. (A) Representación de la estructura del virión. Consta de una nucleocápsida, integrada por la proteína viral C, rodeada de una bicapa lipídica procedente de la célula hospedadora. La cubierta externa está constituida por las glicoproteínas virales M (cuyo precursor es prM) y E. La proteína E se organiza en dímeros. La nucleocápsida contiene el genoma viral. (B) Esquema del genoma viral. El genoma codifica una única poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares en diez proteínas virales. Las flechas rojas señalan los sitios de corte de dichas proteasas. Tres de las proteínas resultantes (C, prM y E) presentan funciones estructurales; las restantes tienen función no estructural. CR, complejo de replicación. RE, retículo endoplasmático. Creado con: BioRender.com

I.2.3. CICLO INTRACELULAR

La entrada del virus en la célula se produce a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina (**Figura I.5A**) (Y. Chen et al., 1997; Chu & Ng, 2004; C. W. Davis et al., 2006). La posterior acidificación del endosoma permite que las proteínas de la cápside viral se fusionen con la membrana de la vesícula y liberen así el RNA viral en el citoplasma (S. L. Allison et al., 1995). En la superficie del RE, el genoma flaviviral actúa inicialmente como mRNA y es traducido por la maquinaria celular (**Figura I.5A**). La poliproteína resultante se inserta en la membrana del RE y es escindida por la proteasa viral NS3 y las proteasas del hospedador para dar lugar a las proteínas virales (Lindenbach et al., 2006; Nowak et al., 1989).

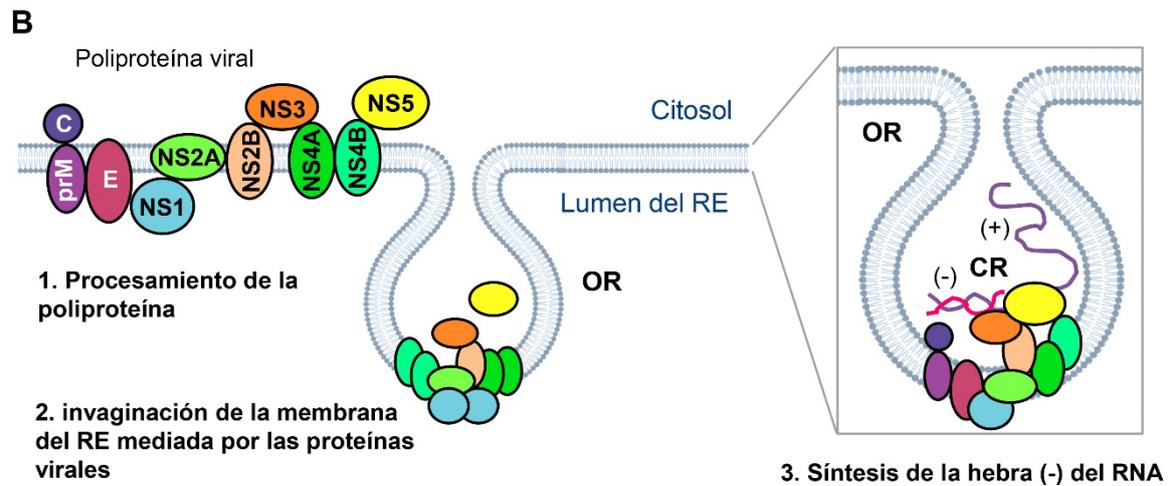
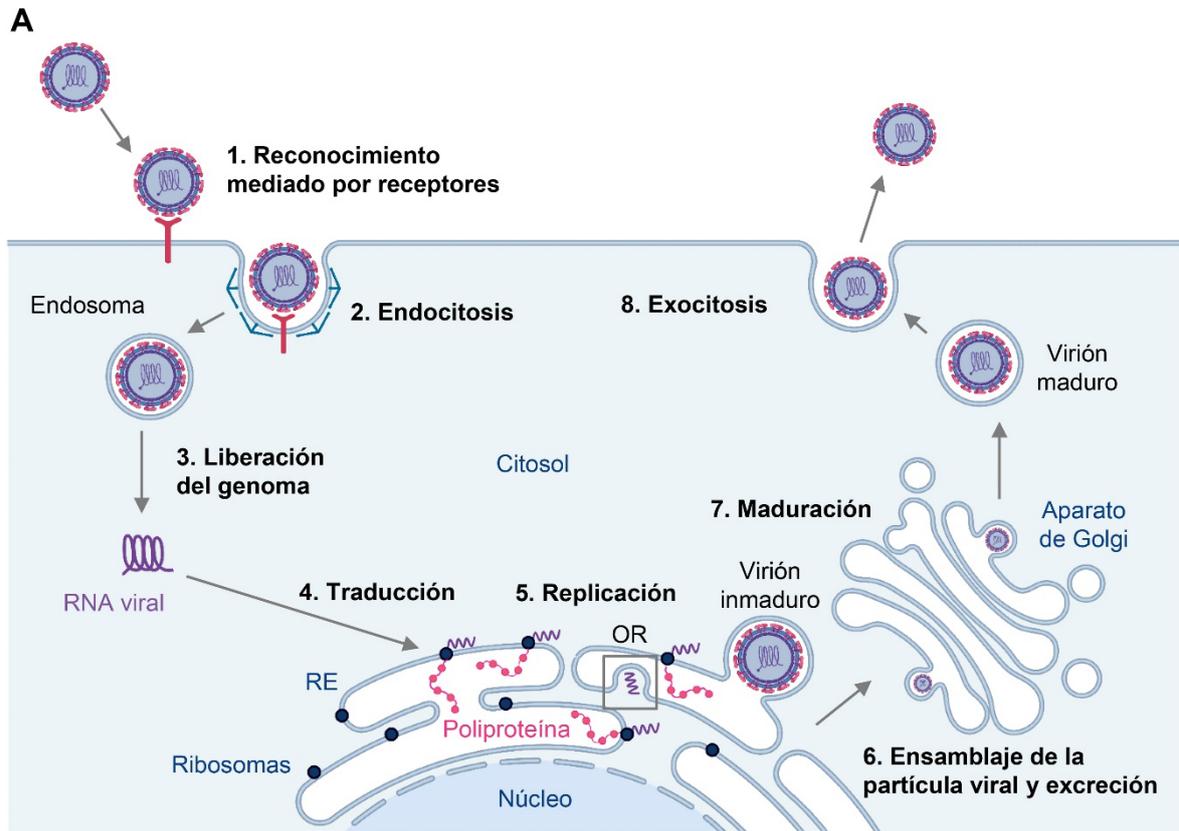


Figura I.5. Ciclo intracelular de flavivirus. (A) Esquema del ciclo viral. El virus entra en la célula por endocitosis mediada por clatrina. El RNA viral se libera en el citoplasma y migra a la superficie del RE, donde es traducido por la maquinaria celular. La poliproteína resultante se inserta en la membrana del RE y es procesada en las diez proteínas virales. Las proteínas no estructurales sintetizan nuevas copias del genoma. Las proteínas estructurales se ensamblan junto con el RNA viral en viriones inmaduros. Los viriones se someten a un proceso de maduración en el aparato de Golgi antes de ser liberados al exterior por exocitosis. (B) Esquema del ensamblaje del complejo de replicación (CR). Las proteínas virales inducen invaginaciones en la membrana del RE que quedan conectadas con el citoplasma. Estas estructuras, similares a vesículas, se denominan orgánulos de replicación (OR). En su interior, las proteínas virales no estructurales se ensamblan en la membrana del RE y forman complejos de replicación viral junto con el RNA viral. El RNA genómico (+) es utilizado como molde por NS5 para sintetizar la hebra negativa (-). A partir de ésta, se inicia la síntesis una nueva molécula de RNA genómico. Creado con: BioRender.com

La acumulación de las proteínas virales provoca una reorganización estructural en la membrana del RE que da lugar a la formación de invaginaciones esféricas, similares a vesículas, denominados orgánulos de replicación vírica (OR) (Gillespie et al., 2010; Kaufusi et al., 2014; Welsch et al., 2009) (**Figura I.5B**). En su interior, se ensamblan los complejos de replicación, constituidos por proteínas virales no estructurales, factores de la célula hospedadora y RNA viral (Cerikan et al., 2020; Cortese et al., 2017). Durante la primera fase de la replicación, NS5 emplea el genoma viral como molde para sintetizar la hebra negativa complementaria (**Figura I.5B**), la cual es utilizada posteriormente como molde para generar nuevas copias del RNA con polaridad positiva (Duan et al., 2019). NS5, junto con NS3, también cataliza la incorporación de cap al extremo 5' de las moléculas de RNA viral recién sintetizadas (Hodge et al., 2019; Mazeaud et al., 2018) (**Figura I.5A**).

La proteína C coordina la encapsidación del genoma (Kuhn et al., 2002). La nucleocápside resultante es envuelta por una bicapa lipídica procedente del RE con las proteínas prM y E incorporadas en ella (Prasad et al., 2017). Los viriones inmaduros son sometidos a un proceso de maduración en el aparato de Golgi que consiste en la liberación del péptido pR de la proteína M (Elshuber et al., 2003) y en la redistribución de M y E en la superficie del virión (Sirohi et al., 2016). Los viriones maduros son liberados al medio extracelular mediante exocitosis (**Figura I.5A**) (Mazeaud et al., 2018; Neufeldt et al., 2018).

I.2.4. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

Como en otros flavivirus, el genoma de WNV se compone de una única hebra de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11000 nucleótidos (nt) de longitud. La molécula posee un único marco abierto de lectura (ORF) que se encuentra flanqueado por las regiones no traducibles 5' y 3' (UTR) (**Figura I.6**) (Castle et al., 1985; Castle & Wengler, 1987; Wengler et al., 1985). El RNA viral porta en su extremo 5' un grupo cap de tipo 1 (Ray et al., 2006; Y. Zhou et al., 2007) y carece de cola poli-A en 3' (Brinton et al., 1986; Wengler & Wengler, 1981) (**Figura I.6**).

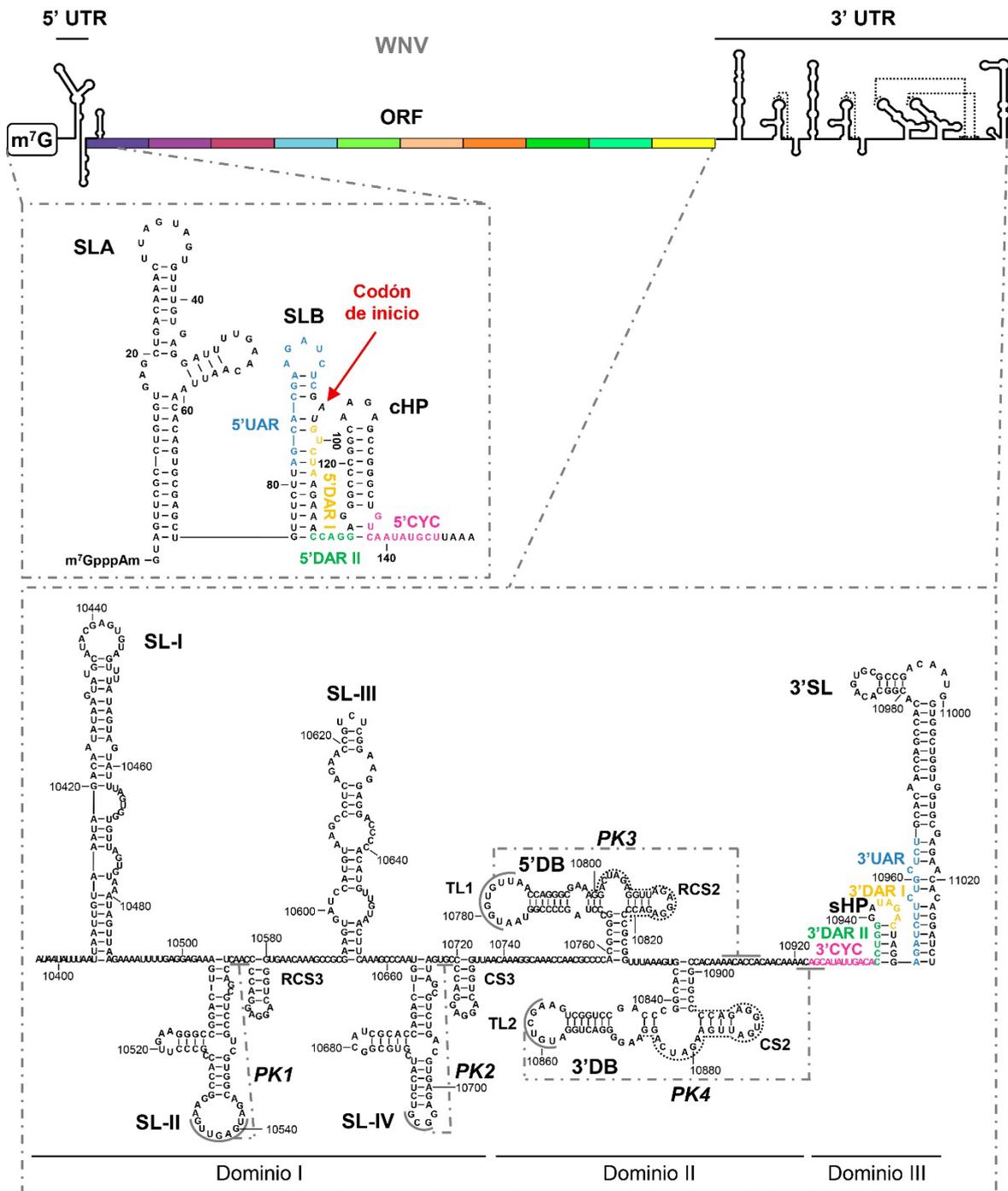


Figura I.6. Estructura secundaria propuesta de los extremos 5' y 3' del genoma de WNV. Esquema de la estructura secundaria teórica del extremo 5' del genoma (5' UTR, cHP y la secuencia 5'CYC) y de la 3' UTR. La numeración hace referencia a la posición genómica en la cepa NY99-flamingo382-99 de WNV (Acceso a *GeneBank* [AF196835](#)). Se indican los nombres de los elementos estructurales y los motivos de secuencia. Los codones de inicio (AUG) y terminación (UAA) de la traducción se muestran en cursiva. Los *pseudoknots* (PK) se representan con líneas discontinuas en gris. Las secuencias de ciclación están coloreadas: UAR, azul; DAR I, amarillo; DAR II, verde; y CYC, rosa. Las secuencias conservadas RCS2 y CS2 están señaladas con una línea de puntos. Se delimitan con línea continua los diferentes dominios (I–III) en la parte inferior.

En las UTRs se han identificado elementos estructurales e interacciones RNA–RNA a larga distancia esenciales para la traducción y replicación de flavivirus (Alvarez et al., 2005a, 2005b; Clyde & Harris, 2006; de Borba et al., 2015; Lodeiro et al., 2009). Estas características estructurales se conservan entre los miembros del género y han sido ampliamente descritas (revisado en (Ramos-Lorente et al., 2021)). Un estudio reciente (Huber et al., 2019) demostró que el resto del genoma de DENV y ZIKV también se encuentra altamente plegado. Se identificaron elementos estructurales e interacciones RNA–RNA a larga distancia conservadas entre los diferentes serotipos (Huber et al., 2019). Su posible relevancia funcional constituye un campo de estudio aún sin explorar.

I.2.4.1. REGIÓN NO TRADUCIBLE 5'

La 5' UTR presenta aproximadamente 100 nt de longitud (Markoff, 2003). Aunque su secuencia varía entre los diferentes flavivirus, la estructura general se encuentra bastante conservada (Z.-Y. Liu & Qin, 2020; Ramos-Lorente et al., 2021). En MBFV, el extremo 5' del genoma presenta la siguiente organización (**Figura I.7**):

El tallo-lazo SLA contiene los primeros 70 nt del genoma viral (**Figura I.7**) y actúa como promotor de la replicación viral a través del reclutamiento de la RNA polimerasa NS5 (Filomatori et al., 2006; Lodeiro et al., 2009). Además, el elemento SLA dirige la incorporación de cap en el extremo 5' del genoma viral durante la replicación (Zhang et al., 2008b; Y. Zhou et al., 2007). La reacción está catalizada por la actividad metiltransferasa y RNA guanililtransferasa de NS5 y requiere el posicionamiento del extremo 5' del RNA en el sitio activo de la enzima (Ray et al., 2006) lo cual, a su vez, depende de la conformación local del RNA.

En la mayoría de los MBFV, incluidos DENV y WNV, en 3' del elemento SLA se forma una segunda estructura tipo tallo-lazo más pequeña denominada SLB, la cual muestra cierta variabilidad en cuanto a su plegamiento (**Figura I.7**) (Brinton & Dispoto, 1988). El elemento SLB contiene el codón de inicio de la traducción AUG en el tallo, situado en un contexto Kozak débil (Clyde et al., 2008; Clyde & Harris, 2006).

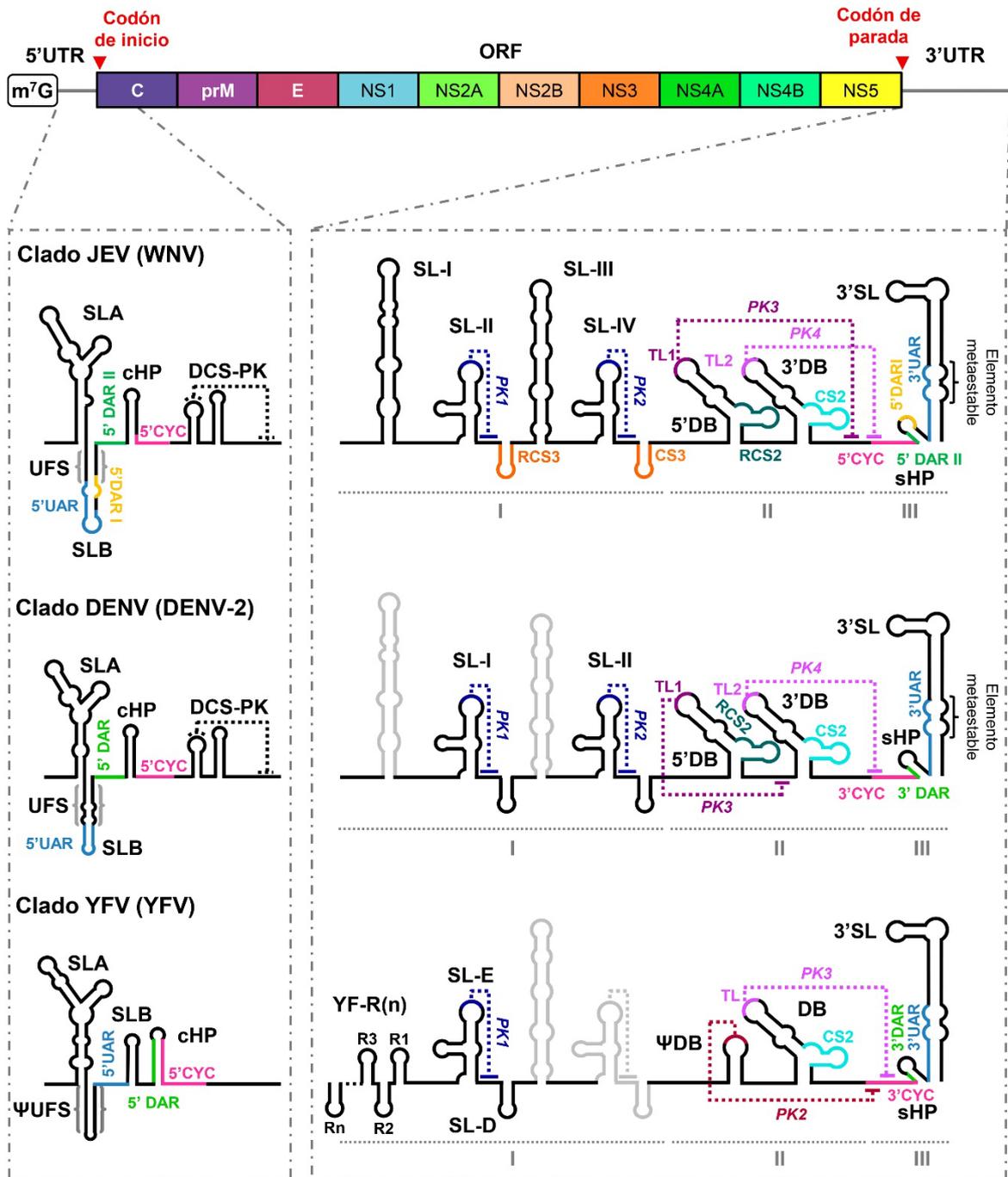


Figura I.7. Comparación de la estructura secundaria teórica de la 5' y 3' UTR de diferentes MBFVs. En la parte superior de la figura se muestra un esquema del genoma de flavivirus. Con cabezas de flecha roja se indican los codones de inicio y de parada de la traducción. En la parte inferior se representa una ampliación del extremo 5' y 3' del genoma de WNV (superior), del serotipo 2 de DENV (DENV-2) (central) y de YFV (inferior), indicando los nombres de los elementos estructurales y motivos de secuencia. Los elementos presentes en los miembros del clado JEV que no se conservan en DENV y YFV se señalan en gris. Los *pseudoknots* están indicados con una línea discontinua. Las secuencias de ciclación UAR, DAR y CYC y las secuencias conservadas CS2, RCS2, CS3 y RCS3 se representan con líneas coloreadas. Los dominios I–III se indican con una línea de puntos.

Entre los elementos SLA y SLB existe una secuencia corta rica en uracilo que puede interactuar con la región de inicio de la traducción viral para formar una doble hélice denominada UFS (**Figura I.7**) (Z.-Y. Liu et al., 2016). UFS está presente en la mayoría de los MBFV, a excepción del clado YFV, en el cual muestra un patrón de plegamiento diferente, dando lugar a una estructura denominada ψ UFS (**Figura I.7**) (Z.-Y. Liu et al., 2016). Tanto UFS como ψ UFS contribuyen al reclutamiento de NS5 en la forma lineal del genoma (Z.-Y. Liu et al., 2016; Sharma & Varani, 2020).

En 3' del elemento SLB, solapando con la región codificante de la proteína C (**Figura I.7**) existe un tallo-lazo altamente conservado (cHP) que se forma únicamente en la conformación lineal del RNA viral. El elemento cHP favorece el reconocimiento del codón de inicio de la traducción al posicionar el complejo ribosómico 43S cerca del AUG iniciador (Clyde & Harris, 2006). La razón es que la presencia de este tipo de estructuras secundaria estables en 3' de un codón AUG frenar el avance de la maquinaria de traducción. Esto permite un contacto prolongado del complejo 43S con el codón de inicio y favorece su reconocimiento (Kozak, 1990). Además, cHP ha demostrado ser esencial para que se produzca la replicación viral en DENV y WNV (Clyde et al., 2008).

I.2.4.2. REGIÓN NO TRADUCIBLE 3'

La 3' UTR de flavivirus presenta entre 400 y 800 nt de longitud y finaliza con un dinucleótido conservado CU-OH (Brinton & Disposito, 1988; Wengler & Wengler, 1981). La 3' UTR flaviviral ha demostrado ser esencial tanto en la regulación de la replicación (Men et al., 1996; L. Zeng et al., 1998) como de la traducción (Chiu et al., 2005) viral. El estudio de su estructura y función se ha realizado principalmente en MBFV. En este grupo, la 3' UTR se caracteriza por la presencia de estructuras duplicadas en tándem que incrementan la diversidad funcional de la región, favoreciendo en muchos casos la adaptación a los diferentes hospedadores (de Borja et al., 2019).

La 3' UTR puede subdividirse en tres dominios que se pliegan de forma autónoma (I a III) (**Figura I.7**). Estos muestran diferentes grados de conservación de la secuencia y la estructura (revisado en (Ramos-Lorente et al., 2021)).

El **dominio I**, situado en 3' del codón de terminación de la traducción, es el menos conservado, y contiene un número variable de estructuras tipo tallo-lazo (SL). Algunas de ellas están implicadas en la formación de *pseudoknots* (PK) que se conservan parcialmente entre los miembros del género. En estas interacciones intervienen los nucleótidos situados en el lazo apical del elemento SL y la secuencia localizada en 3' del mismo (**Figura I.7**) (T. S. Gritsun & Gould, 2007b; Khromykh et al., 1994; Mutebi et al., 2004; Proutski et al., 1997b). Los SL-PK influyen en la infectividad, la adaptación del hospedador y la aptitud viral (Lo et al., 2003; Sztuba-Solinska et al., 2013; Villordo et al., 2015, 2016). Además, están relacionados con el bloqueo de la exorribonucleasa celular XRN1, lo que lleva a la producción de RNAs subgenómicos no codificantes (sfRNA) (Pijlman et al., 2008). Destaca el hecho de que en los flavivirus en los que existe un único SL-PK en el dominio I, como YFV (SL-E; **Figura I.7**), éste determina la virulencia del virus (Proutski et al., 1997a).

La existencia de duplicaciones de SL en el dominio I parece constituir un mecanismo adaptativo del virus que permite el movimiento entre los hospedadores naturales sin interferir con otras funciones de la 3' UTR (de Borba et al., 2019). Por ejemplo, el dominio I de DENV se compone de un SL-PK duplicado (SL-I y SL-II) precedido de una secuencia hipervariable (**Figura I.7**). La delección o mutación en SL-II favorece la replicación viral en células de mosquito, mientras que la supresión de SL-I reduce marginalmente la eficiencia del proceso. Sin embargo, en células humanas, SL-I y SL-II tienen funciones redundantes, ya que su delección independiente reduce ligeramente la eficiencia de replicación, mientras que la delección simultánea de ambos compromete la viabilidad del virus (Villordo et al., 2015; Villordo & Gamarnik, 2013). Existe mayor conservación en la estructura de SL-I entre diferentes miembros del clado que entre SL-I y SL-II de la misma cepa (Höchsmann et al., 2004), lo que sugiere que la duplicación de los SL ocurrió en una etapa temprana de la evolución y, posteriormente, cada elemento duplicado adquirió funciones específicas (Villordo et al., 2016).

En el clado JEV, el extremo 5' del dominio I se pliega en un elemento SL rico en AU (SL-I) seguido de un SL-PK altamente conservado (SL-II y PK1) y de una horquilla corta conservada (RCS3) (**Figura I.7**). Esta unidad estructural (SL-I–SL-II–RCS3)

se repite para dar lugar a los elementos SL-III, SL-IV junto a PK2 y CS3 (**Figura I.7**) (Proutski et al., 1999). Cuando se describieron por primera vez, estos elementos se denominaron SL-I, SL-II, SL-III y SL-IV de acuerdo con su posición en el genoma; sin embargo, son SL-II y SL-IV los que presentan homología en su secuencia y estructura con los elementos SL-I y SL-II de DENV (**Figura I.6**) (Pijlman et al., 2008). Los motivos RCS3 y CS3, presentes únicamente en el clado JEV (Proutski et al., 1999), han demostrado contribuir a la replicación eficiente del virus, aunque no son esenciales (Lo et al., 2003). Respecto a SL-I y SL-III, se desconoce su función, aunque recientemente se ha propuesto que SL-I podría actuar como un regulador negativo de la traducción viral (Romero-López et al., 2023).

El **dominio II** muestra diferencias moderadas en su organización estructural, no sólo entre diferentes grupos de flavivirus, sino también entre clados del mismo grupo (M. Zeng et al., 2020). En los miembros de los clados JEV y DENV, el dominio II está integrado por dos estructuras tipo *dumbbell* (DB), denominados 5'DB y 3'DB (**Figura I.7**) (Hahn et al., 1987). Estos elementos se encuentran separados por una secuencia desapareada que varía en longitud (M. Zeng et al., 2020). YFV contiene un único DB completo precedido por un elemento pseudo-DB (ψ DB), cuya secuencia parece ser una combinación de los elementos 5' y 3'DB presentes en otros MBFV (**Figura I.7**) (de Borba et al., 2019; T. S. Gritsun & Gould, 2007b; Villordo et al., 2016). El análisis de la secuencia de los DB en diferentes MBFVs ha puesto de manifiesto una conservación diferencial de estos elementos. Mientras que el elemento 3'DB descrito en DENV muestra variación de secuencia y, de hecho, se encuentra ausente en algunos MBFVs, 5'DB es crítico para la replicación eficiente del virus (de Borba et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que los DB contribuyen a la producción de sfRNAs (Clarke et al., 2015; Funk et al., 2010) y, además, podrían estar implicados en la traducción viral (Funk et al., 2010; Manzano et al., 2011).

Una característica significativa de los genomas de flavivirus es que al menos un elemento DB está implicado en la formación de un PK estabilizado por una unión cuádruple (*four-way junction*) (**Figura I.6**). Estos PKs resultan de la interacción entre la secuencia localizada en el lazo apical del elemento DB (denominada TL) y una secuencia ubicada en 3' del mismo. En los clados JEV y DENV, ambos DB están

implicados en la formación de PKs (PK3 y PK4) (**Figuras I.6 e I.7**) (Proutski et al., 1999). Estas interacciones han demostrado ser esenciales para la replicación viral y, además, potencian la traducción (Manzano et al., 2011; Sztuba-Solinska et al., 2013), aunque se desconoce el mecanismo por el cual estos elementos contribuyen a la regulación de ambos procesos.

Los DBs también incluyen las secuencias conservadas CS2 y RCS2. CS2 se encuentra presente en los clados DENV, JEV y YFV (**Figuras I.6 e I.7**), mientras que RCS2 está ausente en YFV (**Figura I.7**) (Brinton 1986; Hahn et al 1987). RCS2 y CS2 podrían haber evolucionado a partir de una duplicación de secuencia para maximizar el reclutamiento de factores proteicos, mejorando así la eficiencia de las diferentes etapas del ciclo viral, pero esto está aún por confirmar.

El **dominio III** es el más conservado desde un punto de vista estructural. Está compuesto por un elemento con estructura tipo SL que abarca los últimos 80-90 nt del genoma viral (3'SL) precedida del elemento sHP (**Figura I.7**) (T. S. Gritsun et al., 1997; Ochsenreiter et al., 2019). sHP contiene parte de los motivos de secuencia implicados en la ciclación del genoma (**Figura I.7**), por lo que adopta diferentes conformaciones en la forma lineal y ciclada del RNA viral (Villordo & Gamarnik, 2009). En DENV, la preservación del plegamiento de sHP es crítica para que se produzca la replicación del virus en células de mamífero, pero la tolerancia a la mutación de la secuencia es muy elevada. Sin embargo, en células de mosquito, las variaciones en la secuencia afectan de forma significativa a la replicación, lo cual indica que tanto la estructura como la secuencia son importantes en el desempeño de su función (Villordo & Gamarnik, 2013).

El lazo apical del elemento 3'SL contiene un pentanucleótido (5'-CACAG-3') en su bucle apical (Charlier et al., 2002; D. J. Gritsun et al., 2014; Mandl et al., 1993) que es esencial para la replicación viral (Elghonemy et al., 2005; Filomatori et al., 2011; Khromykh et al., 2003; Tilgner et al., 2005) y, además, potencia la traducción (Holden et al., 2006; Holden & Harris, 2004). Dichas funciones las lleva a cabo mediante el reclutamiento de diferentes proteínas celulares y virales: NS5 (Hodge et al., 2016); eEF1A (*eukaryotic elongation factor 1A*) (W. G. Davis et al., 2007); YB-1 (*Y box-binding protein-1*) (Paranjape & Harris, 2007); DHX9 (*DEAH box polypeptide 9*, también conocida como RNA helicasa A) (Gomila et al., 2011), el

autoantígeno La (García-Montalvo et al., 2004; Vashist et al., 2009), entre otras (Albornoz et al., 2014; Emara & Brinton, 2007; Gomila et al., 2011; W. Li et al., 2002).

En los clados JEV y DENV, en la base del elemento 3'SL existen dos pares de bases (pb) conservados flanqueados por dos lazos internos simétricos que constituyen un elemento metaestable (**Figura I.7**) (Friedrich et al., 2018). Este elemento estabiliza toda la estructura de 3'SL y podría estar implicado en el cambio entre la conformación lineal y ciclada del genoma (W. G. Davis et al., 2013). Dicha hipótesis se ve apoyada por la presencia del motivo de ciclación 3'UAR (**I.3.4.3.**) en el segmento basal 5' del elemento 3'SL (**Figura I.6**) (W. G. Davis et al., 2013; Filomatori et al., 2011). En células de mamífero se ha demostrado que este segmento debe experimentar una desorganización de la estructura secundaria para permitir una replicación eficiente. Sin embargo, en células de mosquito dicha desestabilización estructural se produce de forma poco eficiente, por lo que se ha propuesto que ésta podría ser la razón por lo que la tasa de replicación del virus es menos eficiente en el vector que en el hospedador mamífero (Meyer et al., 2020).

I.2.5. CICLACIÓN DEL GENOMA VIRAL

El genoma de flavivirus actúa como mRNA durante la traducción y como RNA molde durante la replicación viral (García-Blanco et al., 2016). Dado que dichos procesos tienen lugar en sentidos opuestos, es clave la existencia de una fina regulación para prevenir la colisión de la maquinaria de traducción y la RNA polimerasa NS5. Por tanto, debe existir un sistema de regulación por el cual, tras varias rondas de síntesis de proteínas, la traducción del RNA viral se inhiba, la molécula sea desocupada por los ribosomas, y ésta actúe como molde para la síntesis de nuevas copias del genoma. Hasta la fecha, se desconoce el mecanismo que regula dicha transición, pero se ha propuesto que en él podría estar implicada la ciclación del RNA viral.

La ciclación se define como la adquisición de una topología circular por parte del genoma mediada por el establecimiento de interacciones RNA–RNA entre secuencias complementarias presentes en los extremos (Vicens et al., 2018). La adquisición de esta conformación en flavivirus fue revelada en 1987 (Hahn et al., 1987), aunque este comportamiento ya se había identificado por microscopía

electrónica durante la década de 1970 en el alfavirus Sindbis (SINV) (Hsu et al., 1974). Desde entonces, se ha demostrado que la ciclación del genoma tiene lugar en numerosos virus (Flick & Hobom, 1999; Kohl et al., 2004; Mir et al., 2006; Mir & Panganiban, 2005; Patton, 2001; Perez & de la Torre, 2003).

En MBFV se han identificado tres pares de secuencias de ciclación (**Figura 1.8A**) (revisado en (Y. Liu et al., 2020)):

i) **Par 5'–3'UAR**. La secuencia en 5' del codón AUG (5'UAR) forma parte del elemento SLB (Alvarez et al., 2008, 2005b), por lo que se engloba dentro del dúplex UFS en la conformación lineal del genoma (Friedrich et al., 2018). Su secuencia complementaria, 3'UAR, se localiza en la base 5' del tallo del elemento 3'SL (Alvarez et al., 2008, 2005b) (**Figura 1.8B**). Esto implica que el 3'SL experimenta una reorganización estructural durante la ciclación del genoma para permitir la interacción entre 5' y 3'UAR (Alvarez et al., 2008; Z.-Y. Liu et al., 2016; Meyer et al., 2020; Zhang et al., 2008a).

ii) **Par 5'–3'DAR**. Mientras que YFV, el virus Spondweni (SPOV) y DENV tienen un único par de secuencias DAR, los demás virus MBFV contienen dos pares de estas secuencias (DAR I y DAR II) (M. Zeng et al., 2020). En todos los MBFV, las secuencias 5'DAR se localizan en 3' del codón de inicio de la traducción y sus secuencias complementarias, 3'DAR, solapan con el elemento sHP (**Figura 1.8B**) (Friebe et al., 2011; Friebe & Harris, 2010; X.-D. Li et al., 2019). La replicación viral tolera mejor la presencia de mutaciones en las secuencias 5' y 3'DAR en células de mamífero que en células de mosquito; y esta diferencia está relacionada con las temperaturas de crecimiento de los hospedadores (X.-D. Li et al., 2019). En base a esto, se ha propuesto que la interacción 5'–3'DAR está sometida a una presión de selección diferente en células de mosquito y mamífero, y contribuye a la adaptación al hospedador (X.-D. Li et al., 2019; Villordo et al., 2015).

iii) **Par 5'–3'CYC** (también denominado 5'–3'CS). 5'CYC se encuentra altamente conservada y abarca los primeros nucleótidos de la región codificante de la cápsida en MBFVs (Hahn et al., 1987; Khromykh et al., 2001; Mandl et al., 1993). Su secuencia complementaria, 3'CYC, se ubica en 5' de sHP (Alvarez et al., 2005b; Khromykh et al., 2001; Lo et al., 2003; Zhang et al., 2008b) y solapa parcialmente

con la secuencia complementaria al motivo TL2, lo cual implica que el *pseudoknot* PK4 no se forma en la conformación ciclada del RNA viral (**Figura I.8B**) (Sztuba-Solinska et al., 2013).

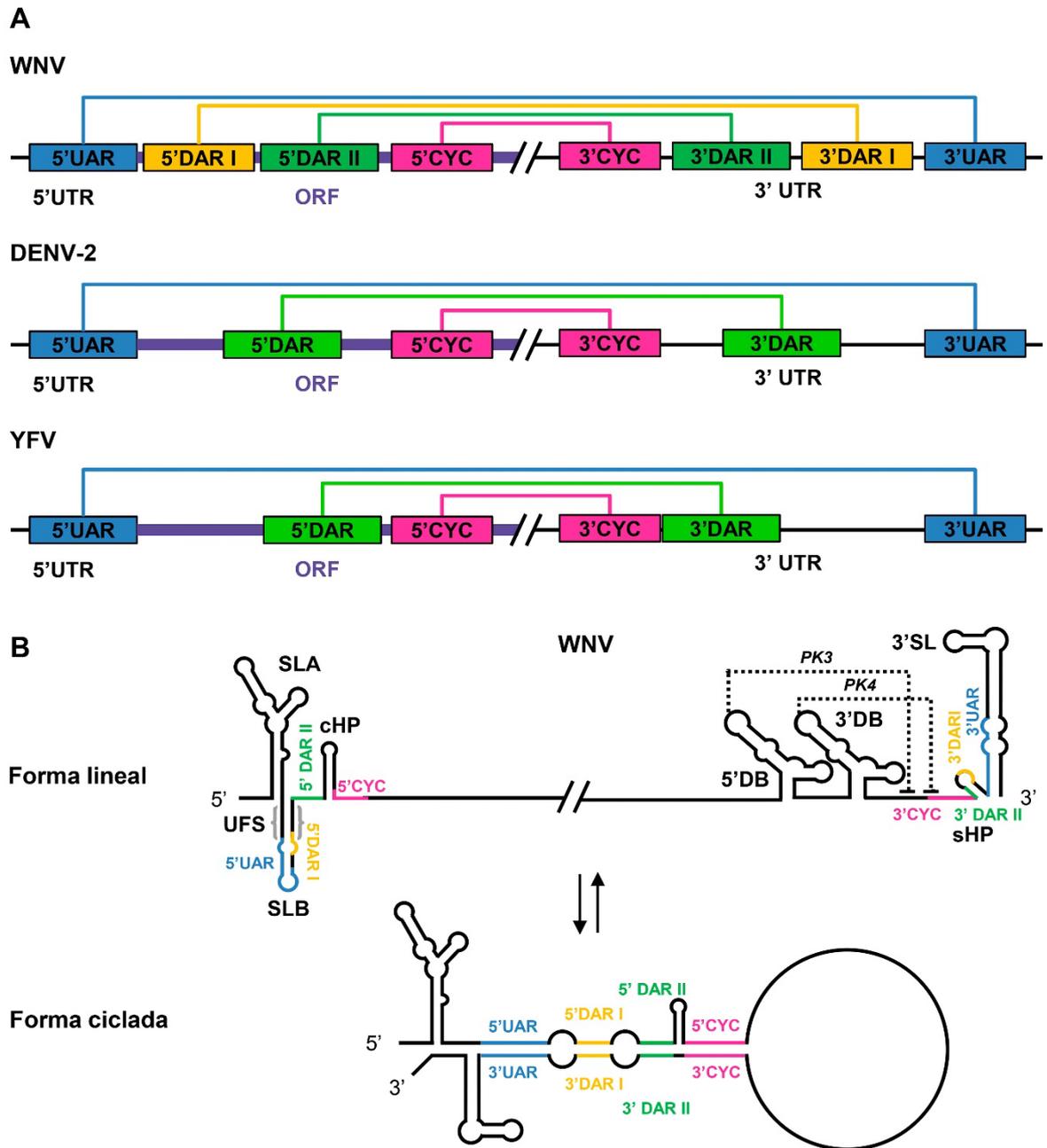


Figura I.8. Interacciones RNA–RNA a larga distancia implicadas en la ciclación del genoma flaviviral. (A) Diagrama de la organización de las secuencias de ciclación en tres flavivirus representativos: WNV, DENV-2 y YFV. Las secuencias de ciclación se representan con cajas y las interacciones con líneas continuas. Se utiliza el mismo código de color que en la **Figura I.6**. **(B)** Esquema de las formas lineal (arriba) y ciclada (abajo) del genoma de WNV. Los *pseudoknots* se muestran con líneas discontinuas. Las secuencias de ciclación se representan con el mismo código de color que en (A).

Liu y Zhao (Z.-Y. Liu & Zhao, 2013) han demostrado que la secuencia en 3' de 5'CYC también se conserva en MBFV, salvo en YFV; y está implicada en la formación del *pseudoknot* DCS-PK (**Figura I.6**). Se ha propuesto que este elemento, junto con los pares UAR, DAR y CYC, constituye un elemento funcional que modularía el cambio conformacional del genoma flaviviral. Los pares de secuencias de ciclación constituirían el núcleo de este elemento mientras que DCS-PK favorecería la adquisición de una conformación en la que el establecimiento de las interacciones de ciclación se viese favorecida (Z.-Y. Liu & Zhao, 2013).

Además, se han identificado elementos estructurales en los extremos del genoma implicados en el cambio entre las conformaciones lineal y ciclada:

i) **UFS**. Contribuye al reclutamiento de NS5 en la forma lineal del genoma y no se forma en la conformación ciclada, ya que contiene el motivo 5'UAR (**Figura I.8B**) (Z.-Y. Liu et al., 2016; Sharma & Varani, 2020).

ii) **cHP**. Durante la infección temprana, la formación de cHP promueve un inicio eficiente de la traducción al favorecer el reconocimiento del codón de inicio de traducción. La ciclación daría lugar a un acortamiento del tallo de cHP (**Figura I.8B**), dificultando así la traducción para, posteriormente, permitir la unión de los factores necesarios para la síntesis del RNA viral (Clyde et al., 2008).

iii) **sHP**. Contiene los motivos de secuencia 3'DAR, por lo que debe modificar su plegamiento entre la conformación lineal y ciclada (**Figura I.8B**).

iv) El **elemento metaestable de 3'SL**. Solapa con el motivo de ciclación 3'UAR, por lo que se ha propuesto que podría regular la transición entre ambas conformaciones (**Figura I.7**) (W. G. Davis et al., 2013).

La ciclización del genoma en flavivirus es necesaria para la replicación (Alvarez et al., 2005b; Hahn et al., 1987; X.-D. Li et al., 2019; Lo et al., 2003; Men et al., 1996), proporciona un mecanismo de control sobre la traducción (Manzano et al., 2011; Wei et al., 2009) y la infectividad (Proutski et al., 1999); y contribuye en la regulación de transición entre las diferentes etapas del ciclo viral (Sanford et al., 2019).

1.2.5.1. CICLACIÓN EN LA TRADUCCIÓN

Se sabe muy poco sobre los requerimientos conformacionales de la fase de traducción. Se asume que la síntesis de proteínas en flavivirus se produce de forma preferente por el mecanismo canónico dependiente de cap propio de la mayoría de los mRNAs celulares. El mRNA celular adquiere una conformación circular mediada por la proteína de unión a poli-A (PABP) y los factores de inicio de traducción (1.4.1.).

Varios estudios han descartado que la ciclación sea necesaria para que se produzca la traducción viral (Chiu et al., 2005; Lo et al., 2003; Zhang et al., 2008a). Recientemente, incluso se ha demostrado en DENV y ZIKV que la ciclación de forma estable inhibe el inicio de traducción (Sanford et al., 2019), probablemente mediante el bloqueo del proceso de escaneo (1.3.1.). Esto podría indicar que la circularización del genoma viral se produce a través de interacciones RNA-proteína. De hecho, aunque el genoma flaviviral carece de cola poli-A, se ha visto que PABP es capaz de interactuar con la 3' UTR a través de las secuencias ricas en adenina que flanquean los elementos DB, aumentando así la eficiencia de traducción en DENV (Mazeaud et al., 2018; Polacek et al., 2009). Además, la 3' UTR de flavivirus une factores celulares implicados en la traducción como eEF1A (Blackwell & Brinton, 1997; W. G. Davis et al., 2007; De Nova-Ocampo et al., 2002; Paranjape & Harris, 2007); proteína La, la cual podría actuar como chaperona estabilizando la conformación del genoma apta para la traducción (De Nova-Ocampo et al., 2002; Vashist et al., 2009); PTB, cuyo efecto sobre la traducción está mediado por la unión a la 5' y 3' UTR (De Nova-Ocampo et al., 2002); y las proteínas ribosómicas de la subunidad 60S RPLP1/2, las cuales promueven la acumulación temprana de proteínas estructurales (Campos et al., 2017).

También cabe la posibilidad de que el establecimiento de las interacciones entre las secuencias de ciclación se produzca de forma intermitente durante la traducción. La alternancia entre la conformación lineal y ciclada podría estar mediada por las estructuras DB. Una característica conservada en el dominio II de MBFV es que la secuencia complementaria al motivo TL de, al menos, uno de los DB, solapa con la secuencia de ciclación 3'CYC (1.3.4.2., **Figura 1.6**) (Olsthoorn & Bol, 2001; Proutski et al., 1997b; Villordo et al., 2016). Por tanto, es probable que exista una competición entre la formación de PK4 y el establecimiento de las interacciones

RNA–RNA a larga distancia que permiten la ciclación del genoma (Akiyama et al., 2020; de Borba et al., 2019; Sztuba-Solinska et al., 2013). Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos en DENV (Manzano et al., 2011), en los que se demuestra que la mutación de TL1 y TL2 no afecta a la traducción viral siempre que se preserve la formación de PK3 y PK4.

I.2.5.2. CICLACIÓN EN LA REPLICACIÓN

Se encuentra ampliamente demostrado que la ciclación del genoma es crítica para que se produzca el inicio de la fase de replicación viral (Alvarez et al., 2005b; Corver et al., 2003; Friebe et al., 2011; Friebe & Harris, 2010; Khromykh et al., 2001; Zhang et al., 2008a). Sin embargo, dado que NS5 es reclutada más eficientemente por la conformación lineal *in vitro*, se ha propuesto que la ciclación del genoma no se produce de forma estable durante replicación, sino que existe una alternancia entre las formas lineal y ciclada (Z.-Y. Liu et al., 2016). De hecho, se ha visto en DENV que la introducción de mutaciones destinadas a estabilizar la interacción 5'–3'UAR inhibe la replicación (Villordo et al., 2010). En base a estos resultados, se ha propuesto que el inicio de replicación en flavivirus podría producirse según el siguiente modelo (**Figura I.9**). El elemento SLA reclutaría NS5 en el extremo 5' del genoma (Filomatori et al., 2006; Lodeiro et al., 2009), un proceso favorecido por la presencia del dúplex UFS en la conformación lineal del RNA viral (Z.-Y. Liu et al., 2016). A continuación, NS5 sería transferido desde SLA al lazo apical de 3'SL para iniciar la síntesis de la hebra negativa. La ciclación del genoma permitiría aproximar los extremos del genoma (Dong et al., 2008; Filomatori et al., 2006; Z.-Y. Liu et al., 2016; Lodeiro et al., 2009) y, además, inducir la fusión de UFS, provocando así la pérdida de afinidad de SLA por NS5 y, por consiguiente, facilitando su transferencia al extremo 3' (Z.-Y. Liu et al., 2016; Sharma & Varani, 2020). Finalizada la síntesis de la hebra negativa, la helicasa NS3 se uniría al extremo 5' del RNA molde para liberar el extremo 3' de la hebra negativa, y así facilitar el inicio de la síntesis de una nueva molécula de polaridad positiva a partir de la misma (Swarbrick et al., 2017). A su vez, al separarse de la hebra negativa, el extremo 5' de la hebra parental de polaridad positiva se plegaría en los elementos SLA y UFS. Esto posibilitaría que SLA reclutase moléculas libres de NS5, favoreciendo el inicio de una nueva ronda de replicación (Z.-Y. Liu et al., 2016).

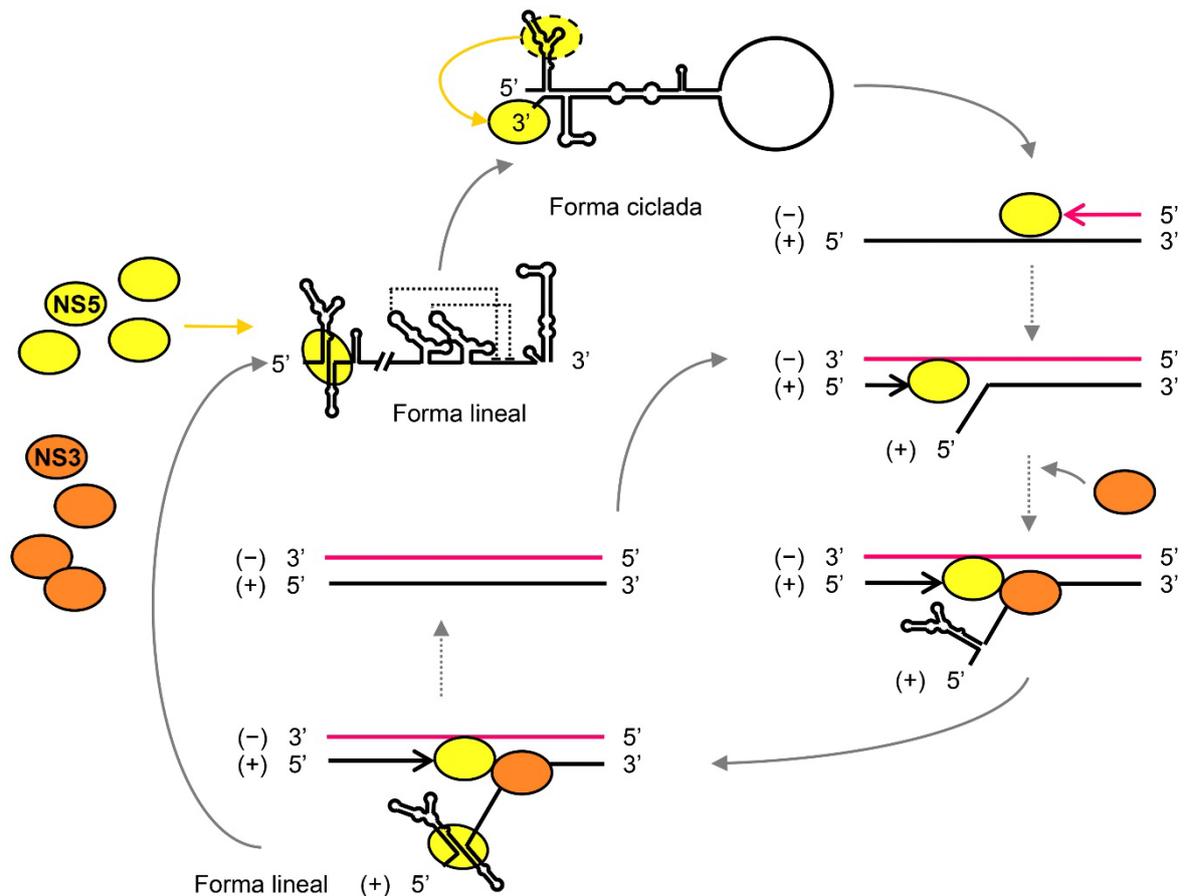


Figura I.9. Modelo sobre la alternancia de la conformación lineal y ciclada del genoma en la regulación del inicio de replicación. Durante la fase de replicación, NS5 es reclutada en el extremo 5' del genoma de flavivirus a través de SLA. Como resultado de la ciclación, NS5 es transferida al extremo 3' de la molécula, donde inicia la síntesis de la hebra negativa (-) para generar un intermediario de replicación de doble cadena. Dentro del propio intermediario de replicación, NS5 inicia entonces la síntesis de una molécula de RNA de polaridad positiva (+) utilizando la hebra (-) como molde. La actividad helicasa de la proteína viral NS3 contribuye al proceso mediante el desenrollamiento de la estructura secundaria del RNA. Durante este proceso, el extremo 5' de la molécula de RNA parental (+) se separa del intermediario de replicación y se pliega en las estructuras SLA y UFS. Esto permite el reclutamiento de NS5 por parte de la hebra (+) parental. De este modo, tan pronto como finaliza la síntesis de la cadena naciente de RNA (+), el genoma viral parental (+) se libera, se cicla y puede iniciar una nueva ronda de síntesis de la hebra (-).

I.3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

Los mRNAs eucarióticos presentan una modificación en su extremo 5' denominada cap (Galloway & Cowling, 2019) y, salvo los transcritos que codifican histonas (Marzluff et al., 2008), una cola poli-A en el extremo 3' (Fakim & Fabian, 2019) (**Figura I.10A**). La síntesis de proteínas se divide en cuatro fases: inicio, elongación, terminación y reciclaje del ribosoma (Merrick & Pavitt, 2018; Pelletier & Sonenberg, 2019). El control de la traducción de los mRNA eucariotas se ejerce principalmente, aunque no de forma exclusiva, en la etapa de inicio.

I.3.1. MECANISMO CANÓNICO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE CAP

El primer paso de la traducción consiste en la formación del complejo de preiniciación 43S. Inicialmente, se forma un complejo ternario (eIF2-GTP-tRNA_i) mediante la unión del factor eIF2, con actividad GTPasa, a una molécula de guanosina trifosfato (GTP) y a tRNA iniciador unido a metionina (tRNA_i). El complejo ternario se une a la subunidad ribosómica 40S y a los factores eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 para formar el complejo 43S (Erzberger et al., 2014).

A continuación, se produce el reclutamiento del mRNA al complejo del 43S para formar el complejo de iniciación 48S. Este proceso está mediado por el reconocimiento del 5'-cap por parte del factor eIF4F, un complejo heterotrimérico formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G (**Figura I.10B**) (Pelletier & Sonenberg, 2019). La subunidad eIF4E es responsable del reconocimiento directo de cap; eIF4A es una RNA helicasa dependiente de ATP; y eIF4G interacciona con PABP, la cual oligomeriza en la cola poli-A para permitir la circularización de la molécula de mRNA (**Figura I.10B**) (Alekhina et al., 2020; Fakim & Fabian, 2019; Gallie, 1991). El factor eIF4G recluta el complejo 43S a través de su interacción con eIF3 (**Figura I.10B**).

El complejo 43S escanea el mRNA de 5' a 3' hasta que se produce la interacción del anticodón del tRNA_i a un codón de inicio AUG (Passmore et al., 2007) en un contexto molecular adecuado (A/GXXAUGG; donde X corresponde a cualquier nucleótido) (**Figura I.10A**) (Kozak, 1986). Durante el escaneo, los factores eIF4A, eIF4A1, eIF4A2 y los cofactores eIF4B o eIF4H despliegan la estructura secundaria del RNA en un proceso acoplado a la hidrólisis de ATP (Parsyan et al., 2011).

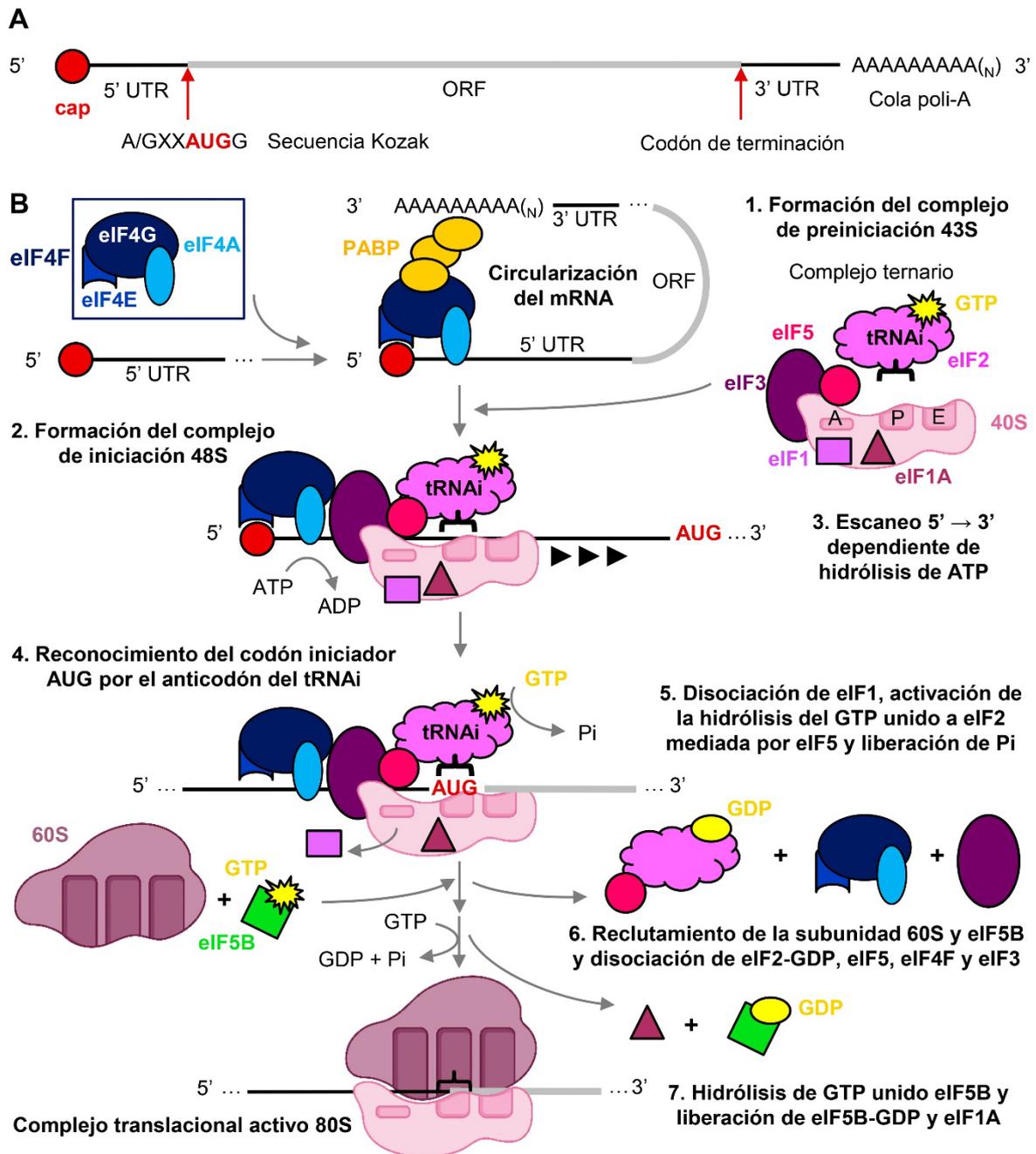


Figura I.10. Inicio de la traducción dependiente de cap. (A) Representación de un mRNA eucariota incluyendo 5' cap, el ORF flanqueado por la 5' y 3' UTR, y la cola poli-A. El codón de inicio está resaltado en rojo en la secuencia de Kozak (Kozak, 1986). (B) Esquema del mecanismo canónico de inicio de la traducción. La presencia de cap en 5' del mRNA permite la unión del complejo eIF4F (eIF4G, eIF4A y eIF4E). La interacción entre eIF4G y PABP forma un puente entre los extremos 5' y 3' favoreciendo la circularización del mRNA. En las siguientes etapas, se omite la circularización: (1) Se forma el complejo de pre-iniciación 43S por la unión de 40S, eIF3, eIF1, eIF1A y el complejo ternario eIF2-tRNA_i-GTP. (2) El complejo 43S recluta a eIF4F a través de eIF3 formando el complejo de inicio de la traducción 48S y (3) escanea el mRNA en sentido 5' a 3' en un proceso dependiente de ATP. (4) El escaneo se detiene tras el reconocimiento del AUG iniciador, lo cual conduce a (5) la disociación de eIF1, permitiendo la hidrólisis mediada por eIF5 del GTP unido a eIF2 y la liberación de fósforo inorgánico (Pi). (6) Esto da lugar a la unión de 60S y de eIF5B, así como a la disociación de eIF2-GDP, eIF3, eIF4F y eIF5). (7) La hidrólisis de GTP por eIF5B permite la liberación de eIF1A y eIF5B-GDP, dando lugar al ribosoma 80S competente para la elongación.

Los factores eIF1 y eIF1A, junto con eIF5, eIF2 y eIF3, estabilizan una conformación del complejo 48S compatible con el escaneo (Lomakin & Steitz, 2013). En ella, eIF1A bloquea el sitio de unión del tRNA de elongación; y eIF1 impide el alojamiento del tRNA_i en el sitio peptidil (P) de la subunidad 40S, lo cual, a su vez, inhibe la función de eIF5, responsable de la actividad GTPasa de eIF2 (Algire et al., 2005; Merrick & Pavitt, 2018; Valášek et al., 2004). De este modo, eIF1, junto con eIF1A, aseguran la fidelidad del reconocimiento del codón AUG al impedir la hidrólisis prematura del GTP unido a eIF2 inducida por eIF5.

El emparejamiento codón:anticodón provoca que el complejo pase a una conformación no apta para el escaneo, la cual permite que el tRNA_i se acomode en el sitio P de 40S (Llácer et al., 2015) y la disociación de eIF1 (Hinnebusch, 2014; Merrick & Pavitt, 2018). En ausencia de eIF1, eIF5 activa hidrólisis del GTP unido a eIF2, lo cual conduce a la liberación de fósforo inorgánico (Algire et al., 2005; Hinnebusch, 2017). Esto permite la unión de eIF5B, una GTPasa dependiente del ribosoma, así como de la subunidad ribosómica 60, y la disociación eIF2-GDP, eIF5, eIF3 y eIF4F del complejo (Acker et al., 2006; Merrick & Pavitt, 2018; Pestova et al., 2000). Finalmente, la hidrólisis del GTP unido a eIF5B permite la liberación de eIF1A y eIF5B (Fringer et al., 2007; Merrick & Pavitt, 2018), dando lugar al complejo traduccionalmente activo 80S, el cual se ubica sobre el codón de inicio del mRNA con el tRNA posicionado en el sitio P (**Figura I.10B**).

I.3.2. MECANISMOS NO CANÓNICOS DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Con objeto de competir con los mRNA celulares por la maquinaria de traducción y así garantizar la síntesis rápida y eficiente de las proteínas virales, algunos virus RNA han desarrollado sistemas de inicio de la traducción alternativos al mecanismo canónico (revisado en (Sorokin et al., 2021)); así como estrategias destinadas a inactivar proteínas del hospedador necesarias para la traducción de los mRNAs celulares (Jan et al., 2016), estimular su degradación para reducir la competencia (Abernathy & Glaunsinger, 2015) y producir RNAs no codificantes que se unen y bloquean factores críticos para la traducción, como eIF4G (Miller et al., 2016).

En este apartado, se ofrecerá una visión general de los mecanismos de inicio de traducción descritos hasta el momento en mRNA virales.

I.3.2.1. DESVIACIONES DEL SISTEMA DE SELECCIÓN DEL CODÓN DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Entre los mecanismos utilizados por los virus para la traducción de su mRNA se han descrito formas no convencionales de escaneo del ribosoma o selección del codón de inicio.

Mecanismos de selección del codón de inicio alternativos. Es muy frecuente en los genomas virales, debido a su elevado grado de compactación de la información, que las proteínas puedan estar codificadas por diferentes marcos de lectura; o por el mismo marco de lectura, pero con origen en diferentes codones de inicio de la traducción. En estos casos, es preciso que el ribosoma pase por el codón más próximo al extremo 5' sin llegar a iniciar la síntesis de proteínas (Sorokin et al., 2021).

Se denomina escaneo con fugas cuando el complejo 43S no reconoce un codón de inicio de la traducción y continúa el escaneo del mRNA (Kozak, 2002). Este proceso depende del contexto nucleotídico del codón. La presencia de pirimidinas en las posiciones -3 y +4 originan un contexto nucleotídico débil (Kozak, 1986), el cual reduce la eficiencia del reconocimiento del codón de inicio y permite que se produzca el escaneo con fugas. Por ejemplo, el mRNA P/C del virus de Sendai codifica simultáneamente ocho productos y el escaneo se utiliza para el inicio de la síntesis de tres de ellos (C', P y C, según el orden de los codones de inicio) (Latorre et al., 1998). Para que el complejo 43S alcance el codón de inicio de C debe saltarse los dos anteriores. Esto es posible porque el codón de inicio de C' es ACG y, en el caso de P, el contexto del codón AUG contiene una pirimidina en la posición -3 (contexto nucleotídico débil).

La existencia de un contexto molecular débil no implica, necesariamente, que se produzca escaneo con fugas. La presencia de una estructura secundaria estable en 3' del codón de inicio aumenta la eficiencia del reconocimiento, dado que ralentiza el avance del complejo 43S, como ocurre en algunos MBFV (I.2.4.1.). En ocasiones, además de favorecer el reconocimiento del codón, la formación de una horquilla estable a una distancia de 14 nt o más en 3' del AUG iniciador reduce los requerimientos de ciertos factores de inicio de la traducción, particularmente eIF2 y eIF4 (Jaafar & Kieft, 2019).

En otros virus, el complejo 43S reconoce el codón AUG 5' proximal y se detiene, pero no llega a iniciar la síntesis de proteínas. Ello se debe a que, para que se produzca la selección definitiva del codón, debe hidrolizarse la molécula de GTP unida a eIF2 y liberar fósforo inorgánico. Si esto no ocurre en un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, en condiciones de inactividad del factor eIF5, el complejo de pre-iniciación retoma el escaneo del mRNA hasta alcanzar el siguiente codón de inicio. Este mecanismo, denominado *43S sliding*, es independiente del contexto nucleotídico (Terenin et al., 2016).

Escaneo no lineal. Mientras que, en el modelo clásico, el complejo 43S recorre cada posición de la 5' UTR hasta alcanzar el codón de inicio, en algunos RNAs virales ciertas regiones no son inspeccionadas, sino que el complejo “esquiva” dichos tramos de la secuencia y se transfiere directamente a un punto distante, localizado en las proximidades del codón de inicio. Este mecanismo se denomina escaneo no lineal (de Breyne et al., 2003; Latorre et al., 1998). En el caso del mRNA tardío 5 de adenovirus humano, la subunidad 40S reconoce cap e inicia el escaneo por el mecanismo canónico pero, posteriormente, “esquiva” una región interna altamente estructurada del mRNA (Yueh & Schneider, 2000).

Maquinaria alternativa de unión a cap. Algunos virus codifican sus propias proteínas de unión a cap. Así, la subunidad PB2 de la RNA polimerasa del virus de la gripe A es capaz de unirse a eIF4G, reemplazando la función del factor eIF4E, el cual se ve inactivado durante la infección viral. En estos casos, el proceso de inicio de traducción en sí mismo no difiere del mecanismo canónico (Jan et al., 2016).

1.3.2.2. INICIO DE TRADUCCIÓN DEPENDIENTE DE VPG.

Ciertos mRNA virales carecen de estructura cap, pero se traducen por el mecanismo canónico. En algunos miembros de la familia *Caliciviridae* la proteína viral VPg (*viral protein genome linked*) se une de forma covalente al extremo 5' del genoma viral y actúa como sustituto de cap, permitiendo la unión de eIF4E, o incluso el reclutamiento directo de eIF4G y PABP (Chung et al., 2014; Leen et al., 2016).

I.3.2.3. INICIO INTERNO DE LA TRADUCCIÓN

Otro mecanismo ampliamente extendido de inicio de la traducción se basa en el empleo de sitios internos de entrada del ribosoma (IRES). Los IRESs son elementos de RNA altamente estructurados que se localizan en la 5' UTR de los mRNAs monocistrónicos o en los espacios intergénicos de los mRNAs policistrónicos. Los IRESs son capaces de reclutar directamente el ribosoma en una región interna del mRNA independientemente de la presencia de cap (**Figura I.11**) (Martinez-Salas et al., 2018; Sorokin et al., 2021). La presencia del IRES reduce los requerimientos en cuanto a factores de inicio de la traducción de los mRNAs, lo cual les permite traducirse en condiciones en las que la traducción celular se encuentra inhibida. Por otra parte, la actividad de los IRESs está regulada por los factores de interacción con el IRES (ITAFs), los cuales actúan como chaperonas, remodelando la estructura del mRNA para potenciar o reprimir la actividad IRES (Kwan & Thompson, 2019).

Los IRES virales se clasifican en función de su estructura secundaria, los requisitos de factores celulares y el mecanismo de inicio de la traducción (**Tabla I.2**):

Tipo I. Fueron los primeros en descubrirse y están presentes en enterovirus y rinovirus. Los IRES de tipo I tienen una longitud de ~490 nt (Pelletier & Sonenberg, 1988) y requieren los factores eIF2, eIF3, eIF4A y eIF4G. eIF1A y eIF4B no son necesarios, pero estimulan la actividad IRES (Sweeney et al., 2014). La subunidad 40S es reclutada en un codón AUG del IRES y escanea el mRNA hasta alcanzar un codón de inicio ubicado en 3' del mismo. eIF1 favorece el reconocimiento del codón de inicio (Kaminski et al., 2010; Sweeney et al., 2014), al igual que en la traducción dependiente de cap (**I.3.1**).

Tipo II. Se encuentran en cardiovirus y aftovirus, como el virus de la encefalomiocarditis (EMCV). Son estructuralmente diferentes a los IRES de tipo I, aunque ambas clases tienen requisitos similares en cuanto a factores (Lomakin et al., 2000; Pestova et al., 1996a, 1996b). Una diferencia clave entre los IRESs de tipo I y II es que no se produce el escaneo hacia 3' del IRES de tipo II (Sweeney et al., 2014). En su lugar, el codón AUG del IRES es funcional y permite el inicio de la traducción sin escaneo e independientemente de eIF1 (Pestova et al., 1996a).

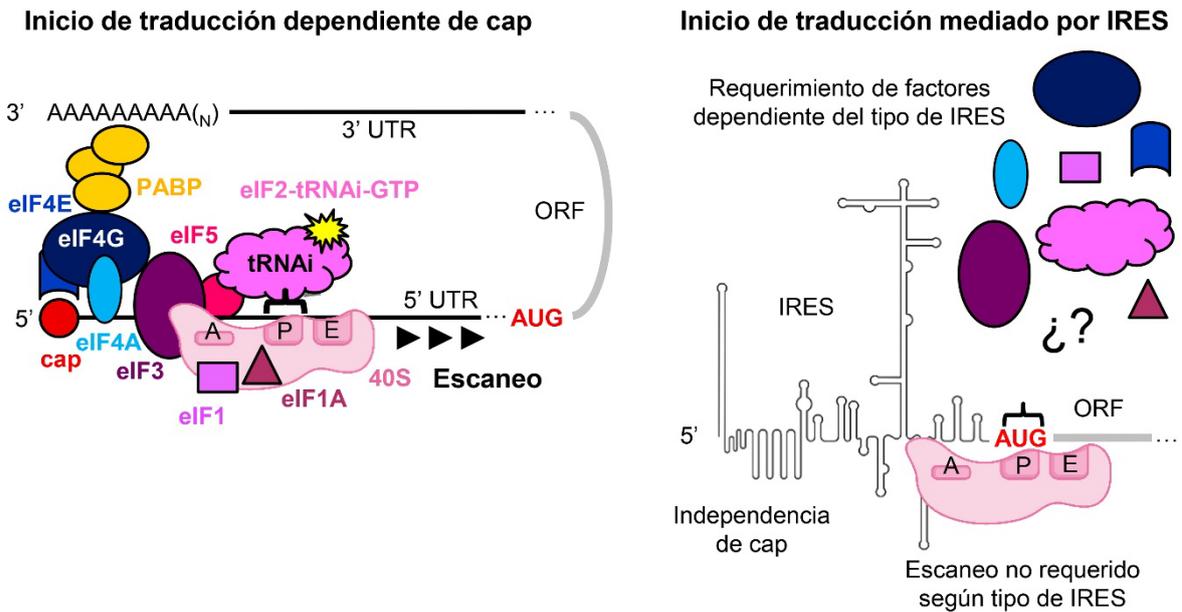


Figura I.11. Comparación del inicio de traducción dependiente de cap y el mediado por IRES. Esquema del inicio de traducción canónico dependiente de cap (izquierda). Los elementos implicados en el proceso se identifican como se describe en la **Figura I.10**. A la derecha se muestra un esquema genérico del inicio de traducción mediado por IRES. El IRES se representa como una región altamente estructurada del mRNA localizada en el extremo 5'. La subunidad 40S se une en una región interna del mRNA. Los requerimientos en cuanto a factores de inicio de la traducción dependen del tipo de IRES. El proceso de escaneo puede no tener lugar según el tipo de IRES, ya que la subunidad 40S puede reclutarse directamente en un codón de inicio funcional, o bien, en posiciones adyacentes al mismo hacia 5'.

Tipo III. Este grupo está formado por el IRES del virus de la Hepatitis C (HCV), perteneciente a la familia *Flaviviridae*, y los IRES de *Picornavirus* (Bakhshesh et al., 2008; Pisarev et al., 2004). El IRES de HCV es el prototipo de esta clase de IRESs. En el modelo más aceptado, el IRES de HCV recluta directamente a la subunidad 40S para formar un complejo binario (Lytle et al., 2002; Pestova et al., 1998). La interacción induce una reorganización estructural del complejo IRES-40S que permite el posicionamiento del codón de inicio AUG en el sitio P de 40S, eludiendo así el proceso de escaneo (Berry et al., 2011). El complejo binario recluta a eIF3 y al complejo ternario para generar el complejo 48S (Berry et al., 2011; Otto et al., 2002; Sizova et al., 1998; Sun et al., 2013). La unión de eIF3 por el IRES no es esencial para la traducción viral, sino que tiene como objetivo desplazar a eIF3 del complejo canónico de pre-iniciación de la traducción 43S, aumentando así la disponibilidad de 40S (Hashem et al., 2013). Finalmente, se produce la unión de la subunidad 60S promovida por la hidrólisis del GTP unido eIF2, inducida por eIF5; la hidrólisis de GTP por eIF5B y la disociación de los factores (Yamamoto et al., 2014).

Además, el IRES de HCV también puede iniciar la traducción cuando eIF2 se encuentra fosforilado, en condiciones de estrés celular (Jaafar et al., 2016). En estas condiciones, tras la unión de la subunidad 40S y eIF3, eIF1A y eIF5B median la selección (mediante la interacción codón-anticodón) y estabilizan la unión del tRNA_i al complejo 48S (González-Almela et al., 2018; Jaafar et al., 2016). En cuanto a ITAFs, el autoantígeno La se une a la 5' UTR de HCV en las proximidades del codón AUG y estimula la traducción (Ali & Siddiqui, 1997).

Tabla I.2. Clasificación de los IRES virales.

IRES	Requisitos de eIFs	Modelo viral	Características del mecanismo
Tipo I	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4G	Enterovirus y rinovirus	Escaneo del ribosoma hasta el codón de inicio funcional (en 3') tras su unión al codón AUG del IRES.
Tipo II	eIF2 eIF3 eIF4A eIF4B eIF4G	Cardiovirus y aptovirus (EMCV)	Inicio de la traducción en el codón AUG de unión de 40S, sin necesidad de escaneo del ribosoma.
Tipo III	eIF2 eIF3	HCV	Unión directa de la subunidad 40S por parte del IRES. La traducción se mantiene con niveles bajos de complejo ternario.
Tipo IV	No	Miembros de la familia <i>Dicistroviridae</i>	Inicio de la traducción en ausencia de eIFs en un codón no-AUG

IRESs clásicos de tipo IV. Los tipos de IRES I–III requieren la participación de algunos factores de inicio de la traducción. Sin embargo, existen IRESs que no requieren de ellos, de ITAFs, o incluso de tRNA_i, para desempeñar su función (Wilson et al., 2000). Estos IRESs se caracterizan por tener una longitud reducida (~200 nt) y, hasta ahora, sólo se han descrito en miembros de la familia *Dicistroviridae* (Mailliot & Martin, 2018). La independencia de los factores de inicio y su interacción con las regiones de contacto entre las subunidades ribosómicas, las cuales se encuentran altamente conservadas, permite a estos IRESs iniciar la traducción en sistemas heterólogos como células de mamífero, insectos, plantas, protozoos, levaduras, e incluso bacterias (Jaafar & Kieft, 2019), algo atípico de los IRESs de tipo I, II y III.

I.3.3. ELEMENTOS POTENCIADORES DE LA TRADUCCIÓN INDEPENDIENTES DE CAP EN LA 3' UTR

I.3.3.1. VIRUS VEGETALES

En virus vegetales, el principal mecanismo descrito para lograr una traducción eficiente del mRNA viral en ausencia de cap y de cola poli-A es el uso de potenciadores de la traducción independiente de cap (CITE) ubicados en la 3' UTR (3'-CITE). Los 3'-CITEs están formados por elementos estructurales del RNA viral que unen factores de inicio de la traducción y/o subunidades ribosómicas, reemplazando así las funciones de cap. La principal diferencia entre los CITEs y los IRES es que los primeros no permiten que el inicio de la traducción tenga lugar en una región interna del mRNA, sino que éste depende del extremo 5' de la molécula (Du et al., 2017).

Generalmente, los 3'-CITE se clasifican en seis tipos en función de los requerimientos de factores (**Tabla I.3**) (Simon & Miller, 2013): i) BTE (*Barley yellow dwarf virus* (BYDF)-like translation enhancer); ii) TED (*translation enhancer domain*); iii) PTE (*Panicum mosaic virus like translation enhancer*); iv) ISS (*I-shaped structure*); v) YSS (*Y-shaped structure*); y vi) TSS (*T-shape structure*).

Tabla I.3. Clasificación de los 3'-CITEs en función de los requerimientos de factores

Tipo	Interacción con el extremo 5' del genoma	Factores reclutados
BTE	Si	eIF4G eIF4F
TED	Si	eIF4F eIFiso4F eIF4E eIF4isoE
PTE	Si	eIF4E eIF4F
ISS	Si	eIF4F
YSS	Si	eIF4F eIFiso4F
TSS	No	60S / 80S

La potenciación de la traducción mediada por la mayoría de los 3'-CITEs requiere su unión al factor eIF4F, el cual está integrado por eIF4E y eIF4G en plantas (Browning, 1996). Mientras que los 3'-CITEs de tipo BTE son capaces de unir directamente eIF4G (Treder et al., 2008); el resto unen el factor eIF4E el cual, a su vez, interacciona con eIF4G (Gazo et al., 2004; Nicholson et al., 2010, 2013; Z. Wang et al., 2009, 2011) (**Tabla I.3**).

Un aspecto común del funcionamiento de los 3'-CITEs tipo BTE, TED, PTE, ISS e YSS es su participación en interacciones RNA-RNA a larga distancia de tipo *kissing-loop* con el lazo apical de una estructura tipo tallo-lazo presente en el extremo 5' del genoma (**Tabla I.3**). Estas interacciones mimetizan la circularización mediada por la interacción entre eIF4F y la PABP descrita en el mecanismo canónico (**I.3.1**). Se desconoce cómo los 3'-CITEs potencian la traducción viral y le confieren ventaja selectiva al genoma del virus frente a los mRNA celulares. Se ha propuesto que dichos elementos podrían intervenir en el reciclaje del ribosoma y/o en el inicio de la traducción (Nicholson et al., 2013; Nicholson & White, 2014). El 3'-CITE mejor estudiado es el elemento BTE de BYDF (*Barley yellow dwarf virus*) (**Figura I.12A**), el cual atrae a la subunidad ribosómica 40S en presencia del factor eIF4F, las helicasas eIF4A y eIF4B, y ATP para, posteriormente, transferir la subunidad 40S al extremo 5' del genoma mediante el establecimiento de interacciones RNA-RNA a larga distancia. Seguidamente, se ha propuesto que la subunidad 40S llevaría a cabo el escaneo del extremo 5' del genoma hasta alcanzar el codón de inicio de la traducción (Das Sharma et al., 2015; Rakotondrafara et al., 2006).

A diferencia de los tipos anteriores, en los 3'-CITEs tipo TSS presentes, por ejemplo, en TCV (*Turnip crinkle virus*), no se ha detectado la existencia de interacciones RNA-RNA entre los extremos del genoma viral que medien el efecto potenciador sobre la traducción viral del 3'-CITE (Stupina et al., 2008, 2011). En su lugar, se ha propuesto un modelo de comunicación entre el extremo 5' y 3' del RNA viral mediado por el ribosoma, en el cual la subunidad 60S unida a TSS interacciona con la subunidad 40S unida a una secuencia rica en pirimidinas presentes en la 5' UTR viral para facilitar la traducción (Stupina et al., 2011) (**Figura I.12B**).

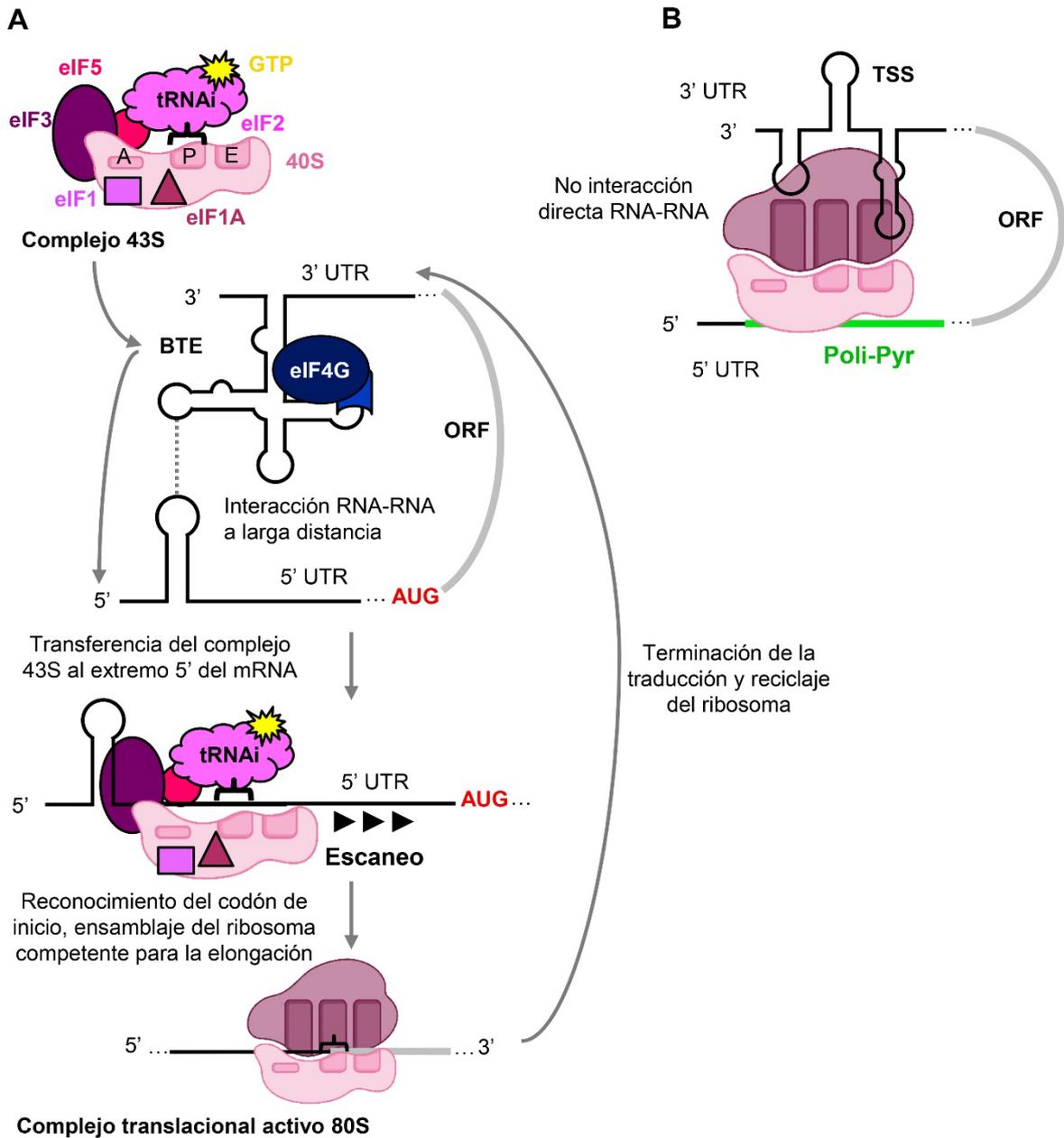


Figura I.12. Mecanismo de potenciación de la traducción a través de 3'-CITEs. (A) Representación del modelo propuesto para BYDV. El elemento BTE establece una interacción a larga distancia con una estructura tipo tallo-lazo en la 5' UTR del genoma, representada por una línea de puntos. El factor eIF4G es reclutado por el elemento BTE; eIF4E permanece unido a eIF4G, aunque no se requiere en la unión. La maquinaria de traducción es reclutada por eIF4G en el extremo 3' y transferida hacia el extremo 5' del mRNA a través de la interacción RNA-RNA a larga distancia, de forma independiente de cap. En el extremo 5', la maquinaria de traducción inicia el escaneo del mRNA hasta que se produce el reconocimiento del codón de inicio de la traducción. (B) Representación del modelo propuesto para TCV. El elemento TSS reclutaría a la subunidad 60S mientras que la subunidad 40S se une a través de una secuencia rica en pirimidinas (Poli-Pyr) presente en la 5' UTR. De este modo, el ribosoma media la comunicación entre los extremos del genoma.

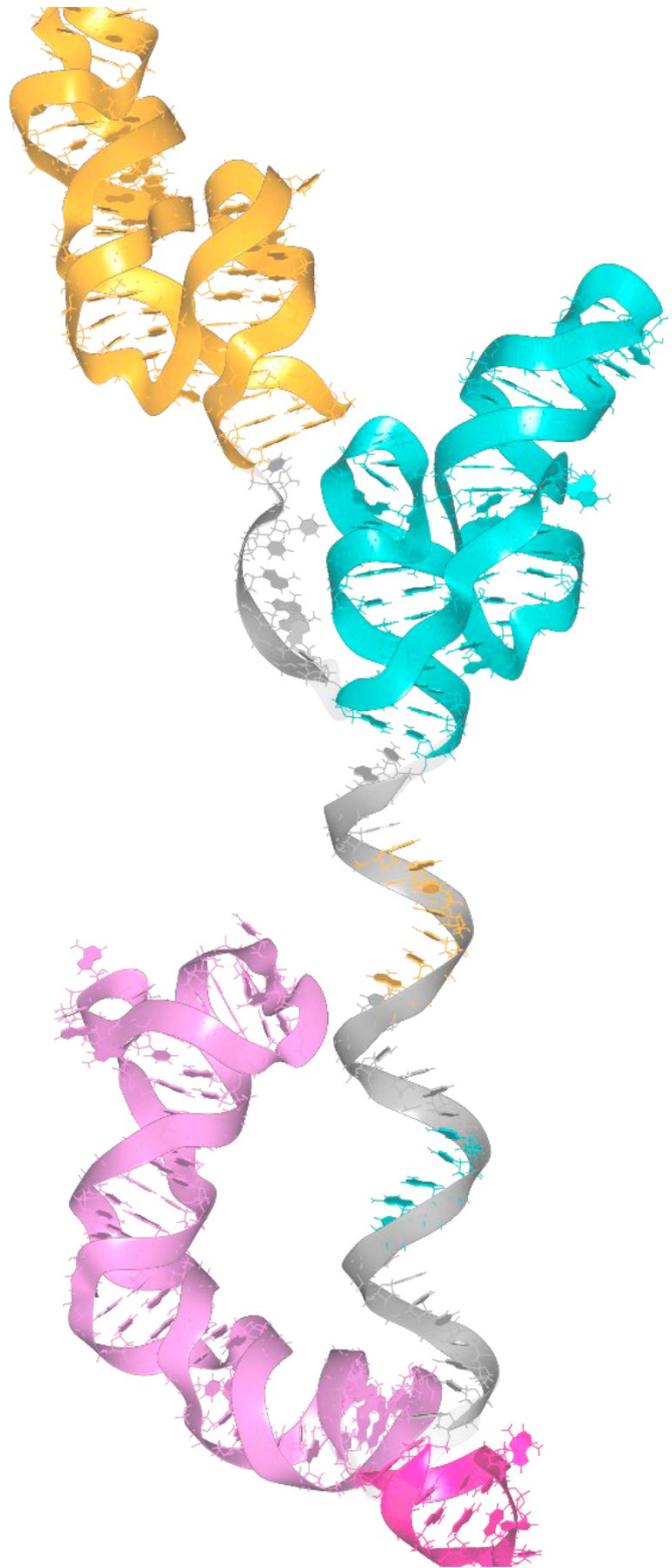
I.3.3.2. VIRUS ANIMALES

En la 3' UTR de numerosos virus RNA animales se han identificado elementos estructurales que podrían actuar de forma análoga a los 3'-CITEs de los virus vegetales. Por ejemplo, el genoma de algunos rotavirus contiene en su extremo 3' una secuencia consenso que se une de forma específica al dominio N-terminal de NS3 (Poncet et al., 1994), mientras que el dominio C-terminal de dicha proteína interacciona con eIF4G. Dado que NS3 ha demostrado ser un potenciador muy eficiente de la traducción viral (Vende et al., 2000), se ha propuesto que NS3 podría favorecer la adquisición de una topología circular del RNA viral en rotavirus, emulando la circularización de los mRNAs celulares. Además, NS3 inhibe la traducción de los mRNA celulares al competir con la proteína PABP por la interacción con el eIF4G (Vende et al., 2000).

Otro caso ampliamente estudiado es la regulación de la traducción en HCV, cuya actividad IRES también se encuentra modulada por elementos RNA presentes en el extremo 3' del genoma. La 3' UTR viral estimula el inicio de la traducción mediado por IRES (Bradrick et al., 2006; Ito et al., 1998). Dado que la 3' UTR de HCV es capaz de reclutar a la subunidad 40S (Bai et al., 2013), este efecto podría estar mediado por la transferencia de 40S hacia el extremo 5' del genoma, permitiendo así el reciclaje del ribosoma (Bai et al., 2013). Además, en el extremo 3' del ORF se ha identificado una región con secuencias y estructura conservadas, denominada CRE (*cis-acting replication element*), que inhibe la síntesis de proteínas virales a la par que potencia la replicación viral (revisado en (Romero-López & Berzal-Herranz, 2020)). El elemento CRE consta de tres elementos tipo tallo-lazo: 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. La interacción RNA-RNA a larga distancia de 5BSL3.2 con la 3' UTR viral y con una secuencia ubicada en 5' del mismo es fundamental para la síntesis eficiente de la hebra negativa durante la replicación (H. Lee et al., 2004; Tuplin et al., 2004; You et al., 2004). La regulación negativa de la traducción viral mediado por el CRE es un proceso multifactorial. Por una parte, la interacción a larga distancia entre 5BSL3.2 y el IRES inhibe el inicio de la traducción incluso en presencia de la 3' UTR (Romero-López & Berzal-Herranz, 2012). Por otra parte, los dominios 5BSL3.2 y 5BSL3.3 reclutan la subunidad 40S (Romero-López et al., 2018), impidiendo su transferencia al extremo 5' desde la 3' UTR e inhibiendo la traducción viral (Romero-López et al., 2018).

En flavivirus también se ha demostrado que la 3' UTR actúa como un regulador positivo de la traducción dependiente de cap. La 3' UTR de DENV ha demostrado incrementar la estabilidad de los mRNA, aunque dicho efecto es menor que el aumento inducido sobre la eficiencia de traducción. Por tanto, se ha sugerido que la 3' UTR de flavivirus exhibe propiedades reguladoras de la traducción similares a las de una cola poli-A (Chiu et al., 2005; Holden & Harris, 2004). Además, el efecto potenciador de la traducción de la 3' UTR de DENV se mantiene tanto en presencia de la 5' UTR del virus como en presencia de la 5' UTR de genes no relacionados, lo que sugiere que no existe una codependencia entre las secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma viral para el inicio de traducción (Chiu et al., 2005). Por otra parte, aunque se encuentra ampliamente aceptado que la síntesis de proteínas en flavivirus se produce principalmente por el mecanismo canónico de traducción dependiente de cap, se ha demostrado que en varios MBFV, como DENV (Edgil et al., 2006), ZIKV (Song et al., 2019), DTMUV (*Duck Tembusu virus*), TMUV (*Tembusu virus*) y JEV (T. Wang et al., 2020), la síntesis de proteínas virales tiene lugar incluso cuando se inhibe la traducción dependiente de cap, lo que indica la existencia de un mecanismo alternativo independiente de cap. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular subyacente.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Durante la elaboración de mi Trabajo de Fin de Máster se exploró la posibilidad de que la 3' UTR de flavivirus fuese capaz de reclutar a la subunidad ribosómica 40S, como se ha demostrado en HCV (Bai et al., 2013), también miembro de la familia *Flaviviridae*. Mediante un estudio cualitativo utilizando como modelo WNV, demostramos que la 3' UTR del virus une a la subunidad 40S en ausencia de otros factores proteicos. Esto nos llevó a proponer que el reclutamiento de 40S podría contribuir al efecto regulador que ejerce la 3' UTR sobre la traducción viral. Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular de regulación de la traducción en flavivirus mediado por la 3' UTR genómica, abordamos los siguientes objetivos:

- 1. Caracterización bioquímica y estructural de la unión de la subunidad ribosómica 40S por la 3' UTR de WNV *in vitro*.**
 - 1.1. Determinación de la afinidad, eficiencia y especificidad de la interacción 3' UTR-40S.
 - 1.2. Identificación de los elementos estructurales de la 3' UTR y mapeo de los nucleótidos implicados en el reclutamiento de 40S.
 - 1.3. Determinación o implicación de los elementos ribosomales implicados en la interacción con el RNA viral.
- 2. Estudio de las implicaciones funcionales de la 3' UTR de WNV en la regulación de la traducción.**
 - 2.1. Análisis del efecto de la 3' UTR sobre la traducción dependiente e independiente de cap en células de mamífero y de mosquito.
 - 2.2. Construcción de mutantes deletéreos de la 3' UTR y caracterización funcional en cultivos celulares.
 - 2.3. Estudio de la interacción entre los extremos 5' y 3' del genoma de WNV en el reclutamiento eficiente de la subunidad 40S.
- 3. Detección del reclutamiento de la subunidad 40S a través de la 3' UTR en otros miembros del género *Flavivirus*: DENV y YFV.**

MATERIALES Y MÉTODOS



M.1. MATERIALES

M.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos utilizados se obtuvieron de las casas comerciales Promega (Madison, WI, EE.UU.), Invitrogen (Waltham, MA, EE.UU.), Applied Biosystems (Waltham, MA, EE.UU.), Takara Bio (Shiga, Japan), Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.), Roche (Basilea, Suiza), Vazyme (Nanjing, China), Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, Reino Unido), Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), New England BioLabs (Ipswich, MA, EE.UU.) y SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Alemania), salvo aquellos que se indican específicamente.

M.1.2. ISÓTOPOS RADIATIVOS

El marcaje interno de las construcciones de RNA se realizó con el isótopo ^{32}P en forma de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP con actividades específicas entre 3000 y 5000 Ci/mmol. Los oligonucleótidos (ODNs) empleados en los ensayos de inhibición de extensión de cebador se fosforilaron con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Todos los isótopos fueron suministrados por PerkinElmer (Waltham, MA, EE.UU.).

M.1.3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se adquirieron principalmente de las firmas New England BioLabs y Fermentas (Vilnius, Lituania). Las reacciones de digestión se realizaron según las instrucciones del fabricante en cuanto a tampón y temperatura de incubación. Se utilizaron 2–5 U de enzima por 1 μg de DNA y el tiempo de incubación osciló entre 2–24 h.

Las digestiones dobles se llevaron a cabo simultáneamente cuando las condiciones requeridas por ambas enzimas eran compatibles. Cuando no fue posible, la digestión se realizó de forma secuencial y con un paso intermedio de extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.). La digestión se verificó en un gel de agarosa (M.2.16.1.1.).

M.1.4. MEDIOS DE CULTIVO

M.1.4.1. DE BACTERIAS

Medio Luria-Bertani (LB) líquido. Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L (pH=7,0).

Medio LB-agar. Medio LB líquido y agar al 15%.

Medio de congelación de bacterias. Medio LB con glicerol 25%.

Medio SOC. Tripton 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM.

M.1.4.2. DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Medio esencial mínimo (MEM) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB, Gibco® de LifeTechnologies™, Invitrogen) inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM.

Medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM) suplementado con un 10% de SFB, triptosa fosfato 0,1 mM y tampón HEPES 10 mM.

Medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-LG) suplementado con un 10% de SFB inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco® de LifeTechnologies™).

Medio M3 para células de insecto suplementado con un 10% de SFB inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM.

M.1.5. TAMPONES

M.1.5.1. PARA ELECTROFORESIS

Tampón de electroforesis Tris-Acetato EDTA (TAE) 1X. Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM; pH~8,5.

Tampón de electroforesis Tris-Borato EDTA (TBE) 1X. Tris-Borato 45 mM y EDTA 1 mM; pH~8,3.

Tampón L para SDS-PAGE 1X. Tris Base 350 mM y SDS 0,1% (p/v); pH=8,8.

Tampón M para SDS-PAGE 1X. Tris Base 150 mM y SDS 0,1% (p/v); pH=6,8.

Tampón *running* para SDS-PAGE 1X. Tris Base 250 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v); pH~8,5.

Tampón no desnaturizante para la carga de geles de agarosa 10X. Glicerol 50% (v/v), xilencianol 0,4% (p/v) y azul de bromofenol 0,4% (p/v).

Tampón desnaturizante para la carga de geles desnaturizantes de agarosa y poliacrilamida 2X. Formamida desionizada 94% (v/v), xilencianol 0,025% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v) y EDTA 17 mM.

Tampón de carga desnaturizante para SDS-PAGE 2X. Tris-HCl (pH=6,8) 20 mM, SDS 4% (p/v), EDTA 4 mM, glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) y azul de bromofenol 0,002% (p/v).

Tampón de elución de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa y poliacrilamida 1X. Acetato de amonio 20 mM, SDS 0,1% (p/v) y EDTA 17 mM.

M.1.5.2. PARA REACCIONES DE UNIÓN

Tampón de unión 5X. HEPES/NaOH (pH=7,4) 500 mM, NaCl 500 mM y acetato de magnesio 25 mM.

Tampón de *cross-linking*. HEPES/NaOH (pH=7,6) 100 mM, DTT 10 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 400 mM, tRNA 50 ng/ μ L y glicerol 5% (v/v).

M.1.5.3. PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD 40S

Tampón isotónico. HEPES/NaOH (pH=7,6) 35 mM, NaCl 146 mM y glucosa 11 mM.

Tampón hipotónico. HEPES/NaOH (pH=7,6) 20 mM, DTT 1 mM, acetato de magnesio 1,5 mM, KCl 10 mM e inhibidor de proteasas cOmplete™ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Tampón S10. HEPES/NaOH (pH=7,6) 100 mM, DTT 25 mM, acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 600 mM e inhibidor de proteasa cOmplete™ (Merck KGaA).

Tampón A. Tris-HCl (pH=7,6) 20 mM, DTT 2 mM, acetato de magnesio 6 mM, KCl 500 mM.

Tampón B. Tris-HCl (pH=7,6) 20 mM, DTT 2 mM, acetato de magnesio 6 mM y KCl 150 mM.

M.1.6. CEPAS BACTERIANAS

***E. coli* cepa DH5 α ,** genotipo F'/endA1hsdR17(r_k-m_k⁺)supE44thi-1recA1gyrA(Nal^r)relA1 Δ (LacZYA-argF)U169deoR(Φ 80dlac Δ (lacZ)M15).

Las células competentes se obtuvieron de Invitrogen (*Subcloning Efficiency*[™] DH5 α [™]).

***E. coli* cepa HST08,** genotipo F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), Δ mcrA, λ . Las células competentes se obtuvieron de Takara Bio (*Stellar*[™])

M.1.7. LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

Células de mamífero Vero, línea celular derivada de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*).

Células de mamífero HeLa, línea celular proveniente de carcinoma de cuello uterino humano.

Células de mamífero HEK-293T, línea celular obtenida a partir de células embrionarias de riñón humano.

Células de mamífero BHK-21, línea celular procedente de fibroblastos de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*) recién nacido.

Células de mosquito C6/36, línea celular originaria de la glándula salival de *Aedes albopictus*.

M.1.8. MARCADORES DE MASA MOLECULAR

M.1.8.1. PARA DNA

DNA del plásmido pUC19 digerido con *SaullAI*. Fragmentos de 943, 585, 258, 153, 105, 78, 46, 36, 18, 12 y 8 pb.

DNA del plásmido pUC18 digerido con *MspI*. Fragmentos de 509, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 111, 67, 46 pb.

DNA del fago λ digerido con *Eco130I (Styl)*. Fragmentos de 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421 pb.

M.1.8.2. PARA RNA

Marcador de RNA ***RiboRuler High Range*** (Thermo Fisher Scientific). Fragmentos de 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 y 200 bases.

Marcador de RNA ***RiboRuler Low Range*** (Thermo Fisher Scientific). Fragmentos de 1000, 800, 3000, 600, 1500, 400, 300, 200 y 100 bases.

Marcador de RNA **Century™-Plus Markers** (Ambion™, Applied Biosystems). Fragmentos de 1000, 750, 500, 400, 300, 200 y 100 bases.

M.1.8.3. PARA PROTEÍNAS

Marcador de proteínas ***Precision Plus Protein™ All Blue*** (Bio-Rad). Proteínas de masa molecular 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

M.1.9. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Se recogen los programas informáticos más empleados durante la Tesis Doctoral:

Sequence Scanner Software v2.0. Applied Biosystems.

Image Lab™ Software. Bio-Rad.

ND 1000 v3.30 Software. NanoDrop Technologies, Inc.

CFX Manager™ Software. Bio-Rad.

ImageQuant© 5.2. Molecular Dynamics.

SigmaPlot® 14.5. Systat Software.

CCP4 molecular-graphics. Desarrollado por McNicholas, S. (Universidad de York).
BioRender. Disponible en: <https://www.biorender.com/>
Mendeley 1.19.8. Elsevier.
QuShape. Desarrollado por Karabiber, F. (Universidad Técnica de Yildiz).
DiffShape. Desarrollado por Rice, G. M. (Universidad de Carolina del Norte).
RNAComposer. Desarrollado por Popenda, M. (Academia Polaca de Ciencias).
RNAstructure. Desarrollado por Reuter, J. S. y Mathews, D. H. (Universidad de Rochester).
Primer-BLAST. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
Clustal Omega. European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
GenBank®. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

M.1.10. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los ODNs utilizados a lo largo del presente trabajo se adquirieron principalmente de la casa comercial Metabion (Planegg, Alemania). El ODN as3'WNV marcado en 5' con los fluoróforos NED (NED-as3'WNV), 6-FAM (FAM-as3'WNV) y VIC (VIC-as3'WNV) se obtuvo de la firma Integrated DNA Technologies.

ODN	Secuencia (5'–3')
3'WNV-XbaI	TAT TCTAGA ATATTTAATTAATTGTAATATGACAA
5'LUC_deIAUG	GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA
as3'DB_DENV	ATTGTTGCTGCGATTTGTAAGGGA
as3'DENV-SaI	TCAG GTGAC AGAACCTGTTGATTCAACAGC
as3'WNV	ACTGTGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCC
as3'WNV-PK3-10765	TGGGGCGTTGGTTTGCCTTTGTT
asFLuc-BamHI	GGATCC TTACACGGCGATCTTTCCGCCCTT
asWNV-10590	GCTTTGTTACCCAGTCCTCCT
asWNV-10660	GCCTGAAGTTACAACATGT
asWNV-10740	TGTTACCCAGTCCTCCTGGGGCA

ODN	Secuencia (5'–3')
asWNV-10830	AGAACGCGGGGTCTCCTCTAA
asWNV-10842	CACTTTAAACCGCGGGGTCTCCTCTA
asWNV-10904	GCGGCACGGGGTCTCCACTAA
asWNV-10904	GCGGCACGGGGTCTCCACTAA
asWNV-10950	CCTAGTCTATCCCAGGTGTCA
asWNV158_HindIII+G	CAAGCTT GCATTCCGCGTTTTAAGCAT
asWNV158-HindIII	TAT AAGCTT GCATTCCGCGTTTTAAGC
asWNV-BamHI	TAT GGATCC AGATCCTGTGTTCTCGCACCA
FwBamHI-3'DENV	CT GGATCC AAGCAAACTAACATGAAACAA
FwSalI-pGL	ACTGT GTCGAC CGATGCCCTTGAGAGCC
GL2 *	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC
hABL_Fw	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
hABL_Rv	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
qFLuc_Fw	ACTGGGACGAAGACGAACAC
qFLuc_Rv	GCGGACGTAATCCACGATCT
s3'WNV-PK3-10823	GTTTAAAGTGCACGGCCCAGCCT
T7GG	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u>
T7p3'WNV	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ATACTTTATTAATTGTAATAGACAA
T7p-5'WNV	ATAGAATTCTAATACGACTCACTATAGTTCGCCTGTGTGA
T7pWNV-10500	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAGAAAGUCAGGCCGGGAA
T7pWNV-10586	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAAAGCCGCGAAGTGATCCAT
T7pWNV-10659	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCCCAATGTCAGACCACGCT
T7pWNV-10743	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCAAACCAACGCCCA
T7pWNV-10831	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAAAGTGCACGGCCCAGCCT
T7pWNV-10922	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAGCATATTGACACCTGGGAT
T7pWNV-KpnI	TAT GGTACC <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TAGTTCGCCTGTGTGA
WNV-10666	GCCCAATGTCAGACCACGCTA
WNV-10907	CCACAAAACACCACAACAAAACAGCAT
WNV-10925	AACAGCATATTGACACCTGGGATAGACT

La secuencia promotora T7 se encuentra subrayada, los sitios de corte de las enzimas de restricción están señalados en rojo. (*) ODN comercial de la casa Promega.

M.1.11. CONSTRUCCIONES DE RNA

M.1.11.1. A PARTIR DEL PLÁSMIDO pGL-WNV

Procede del vector pGL3 Basic (Promega), en el cual se insertó la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (FLuc) flanqueada por el extremo 5' y la 3' UTR de la cepa NY99-flamingo382-99 de WNV con las modificaciones descritas por Martín-Acebes y Saiz (Acceso a *GeneBank* [AF196835](#)) (Lanciotti et al., 1999; Martín-Acebes & Saiz, 2011). La secuencia codificante del extremo 5' del genoma de WNV (posiciones genómicas de 1 a 160) incluye la 5' UTR junto con el elemento cHP y el motivo de ciclación 5'CYC completo. Este fragmento se amplificó por PCR (**M.2.11.1.**) utilizando el par de ODNs T7pWNV-KpnI y asWNV158-HindIII (**M.1.10.**) que incorporaban un sitio de corte para la enzima *KpnI* seguido de la secuencia promotora de la RNA polimerasa del fago T7 (T7p) en el extremo 5' del producto de amplificación, y un sitio de la enzima de restricción *HindIII* en su extremo 3'. Los ODNs 3'WNV-*XbaI* y asWNV-*BamHI* (**M.1.10.**) utilizados para amplificar la secuencia codificante de la 3' UTR genómica (posiciones genómicas de 10400 a 11029) introdujeron un sitio *XbaI* y un sitio *BamHI* en los extremos 5' y 3' del producto de amplificación, respectivamente.

El plásmido pGL-WNV se generó en tres etapas. Primero, se clonó el producto de amplificación 5' en los sitios *KpnI-HindIII* del vector pGL3 Basic. A continuación, el producto de amplificación 3' se introdujo en los sitios *XbaI-BamHI* del plásmido resultante. Por último, el codón AUG del gen codificante de FLuc se eliminó mediante mutagénesis dirigida (**M.2.12.**) utilizando los ODNs 5'LUC_deAUG y asWNV158_ *HindIII*+G (**M.1.10.**), de modo que, en el plásmido resultante, la secuencia codificante de FLuc está en fase con el codon AUG del extremo 5' del genoma de WNV. Esta construcción, previamente digerida con la correspondiente enzima de restricción (**M.1.3.**), se utilizó como molde de transcripción (**M.2.11.2.**) para la síntesis de los RNAs: WNV y m⁷G-WNV (linearización con *BamHI*); WNV_Δ3'UTR y m⁷G-WNV_Δ3'UTR (linearización con *XbaI*); y 5'WNV y m⁷G-5'WNV (linearización con *HindIII*).

Los moldes de DNA de las construcciones FLuc-3'WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV se obtuvieron a partir del plásmido pGL-WNV por PCR (**M.2.11.1.**) usando los ODNs

T7pFLuc y as3'WNV (**M.1.10.**). La delección de los diferentes elementos estructurales para obtener los DNAs molde de las construcciones: m⁷G-WNV_dSLIII (delección de las posiciones 10591 a 10558), m⁷G-WNV_d5'DB (delección de las posiciones 10760 a 10827), m⁷G-WNV_d3'DB (delección de las posiciones 10837 a 10902), m⁷G-WNV_d3'PK3 (delección de las posiciones 10905 a 10919) y m⁷G-WNV_d3'SL (delección de las posiciones 10951 a 10929), se realizó mediante mutagénesis dirigida (**M.2.12.**) utilizando los pares de ODNs indicados en la **Tabla M.1**. Los plásmidos de DNA resultantes se digirieron con la enzima de restricción *Bam*HI antes de emplearlos como molde para la síntesis de los RNAs (**M.2.11.2.**).

Tabla M.1. Oligonucleótidos empleados en la obtención del DNA molde para la síntesis de las construcciones de RNA deletéreas.

Construcción	ODN 5'	ODN 3'
m ⁷ G-WNV_dSLIII	WNV-10666	asWNV-10590
m ⁷ G-WNV_d5'DB	s3'WNV-PK3-10823	as3'WNV-PK3-10765
m ⁷ G-WNV_d3'DB	WNV-10907	asWNV-10842
m ⁷ G-WNV_d3'PK3	WNV-10925	asWNV-10904
m ⁷ G-WNV_d3'SL	T7p-5'WNV	asWNV-10950
3'WNV_10400-10950	T7p3'WNV	asWNV-10950
3'WNV_10400-10900	T7p3'WNV	asWNV-10904
3'WNV_10400-10826	T7p3'WNV	asWNV-10830
3'WNV_10400-10740	T7p3'WNV	asWNV-10740
3'WNV_10400-10666	T7p3'WNV	asWNV-10666
3'WNV_10400-10605	T7p3'WNV	asWNV-10586
3'WNV_10498-11029	T7pWNV-10500	as3'WNV
3'WNV_10583-11029	T7pWNV-10586	as3'WNV
3'WNV_10656-11029	T7pWNV-10659	as3'WNV
3'WNV_10742-11029	T7pWNV-10743	as3'WNV
3'WNV_10828-11029	T7pWNV-10831	as3'WNV
3'WNV_10922-11029	T7pWNV-10922	as3'WNV
3'WNV_10742-10950	T7pWNV-10743	asWNV-10950

M.1.11.2. A PARTIR DEL PLÁSMIDO pUC-3'WNV

Deriva del vector pUC19, en el cual se clonó el cDNA de la 3' UTR de WNV como se describe en el apartado **M.1.11.1.** para el plásmido pGL-WNV. La construcción pUC-3'WNV se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI para obtener como molde para la síntesis (**M.2.11.2.**) del RNA 3'WNV. También se obtuvieron a partir de pUC-3'WNV los DNA moldes de una batería de mutantes secuencialmente deletados por 5', 3', o por ambos extremos de la 3' UTR; mediante PCR (**M.2.11.1.**) utilizando los ODNs indicados en la **Tabla M.1.** Estas construcciones se nombraron como 3'WNV_N_i-N_f, donde N_i indica la posición genómica de inicio de la molécula y N_f, la posición final.

M.1.11.3. A PARTIR DEL PLÁSMIDO PBS SK(+) DIGERIDO CON *Xba*I

El DNA molde para la síntesis mediante transcripción *in vitro* (**M.2.11.2.**) de la construcción RNA-100 se generó, como se describe en (Romero-López et al., 2018), mediante el corte con la enzima *Xba*I del plásmido pBS SK(+).

M.1.11.4. A PARTIR DEL PLÁSMIDO pUC-3'DENV

Procede del pUC19, en el cual se insertó el DNA codificante de la 3' UTR de DENV mediante recombinación (**M.2.13.**) en el sitio de corte *Bam*HI. El DNA codificante de la 3' UTR de DENV incluye del nucleótido 10273 al 10723 del genoma de la cepa 16681 del subtipo 2 del virus (acceso a *GeneBank* **NC_001474.2**) y se adquirió de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE.UU.). Para la síntesis del RNA 3'DENV (**M.2.11.2.**), el plásmido se linearizó previamente con *Xba*I.

M.1.11.5. A PARTIR DEL PLÁSMIDO pUC-3'YFV

Generado mediante la inserción por recombinación (**M.2.13.**) de la secuencia codificante de la 3' UTR de YFV (adquirida de Integrated DNA Technologies) en el sitio de restricción *Bam*HI del plásmido pUC19. La 3' UTR de YFV contiene las posiciones genómicas de 10345 a 10833 de la cepa Asibi (acceso a *GeneBank* **KF769016.1**). El plásmido pUC-3'YFV se digirió con la enzima *Sal*I para su utilización como molde de transcripción (**M.2.11.2.**) en la síntesis de la construcción 3'YFV.

M.1.11.6. A PARTIR DEL PLÁSMIDO pGL-5'WNV-3'DENV

El molde de DNA empleado para la síntesis de las construcciones de RNA quiméricas 5'WNV_3'DENV y m⁷G-5'WNV_3'DENV (pGL-5'WNV-3'DENV) se obtuvo sustituyendo la secuencia codificante de la 3' UTR de WNV en el plásmido pGL-WNV (M.1.11.1.) por la secuencia correspondiente a la 3' UTR de DENV (M.1.11.4.). La síntesis del plásmido pGL-5'WNV-3'DENV se llevó a cabo en las siguientes etapas: (i) eliminación de la secuencia codificante de la 3' UTR de WNV en la construcción pGL-WNV por mutagénesis dirigida (M.2.12.) utilizando los ODNs Fw*Sall*-pGL y asFLuc-*Bam*HI (M.1.10.), los cuales añaden los sitios de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sall* en el extremo 3' de la secuencia codificante de FLuc; (ii) digestión doble del plásmido resultante con las enzimas *Bam*HI y *Sall* (M.1.3.); (iii) obtención del fragmento codificante de la 3' UTR de DENV partir del plásmido pUC-3'DENV (M.1.11.4.) mediante PCR (M.2.11.1.) utilizando los ODNs Fw*Bam*HI-3'DENV y as3'DENV-*Sall* (M.1.10.), los cuales incorporan los sitios de corte *Bam*HI y *Sall* en los extremos 5' y 3' de la 3' UTR de DENV, respectivamente; (iv) digestión doble del producto amplificado por PCR con *Bam*HI y *Sall*; y (v) ligación del DNA codificante de la 3' UTR de DENV en el plásmido resultante de (ii).

La digestión de la construcción pGL-5'WNV-3'DENV con *Sall* dio lugar a la obtención del DNA molde para la síntesis (M.2.11.2.) de los RNAs 5'WNV_3'DENV y m⁷G-5'WNV_3'DENV.

M.2. MÉTODOS

M.2.1. CULTIVO DE BACTERIAS

El cultivo de *E. coli* se realizó en medio LB líquido (M.1.4.1.) a partir de clones previamente aislados en medio sólido (LB-agar) (M.1.4.1.) a fin de obtener poblaciones homogéneas. Ambos medios fueron suplementados con ampicilina a 50 µg/mL. Los cultivos se incubaron a 37°C y bajo agitación en el caso de los cultivos en medio líquido.

M.2.2. CRIOCONSERVACIÓN DE BACTERIAS

Se inoculó medio LB líquido (M.1.4.1.) suplementado con ampicilina a 50 µg/mL con una colonia previamente aislada en LB-agar (M.2.4.) y se incubó a 37°C toda la noche bajo agitación. El cultivo saturado se diluyó 1000 veces en medio fresco y se incubó nuevamente a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O.₆₀₀ 0,4–0,6). Las células se diluyeron a la mitad con medio de congelación de bacterias (M.1.4.1.), se repartieron en tubos de 1,5 mL y se congelaron a -80°C para su conservación.

M.2.3. TRANSFORMACIÓN

La transformación de las células competentes se realizó mediante choque térmico siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Generalmente, se emplearon las células competentes *Subcloning Efficiency*[™] *DH5α*[™] (Invitrogen). Se mezclaron 50 µL de células competentes con 1–10 ng de DNA, o bien, con 2,5 µL de reacción de ligación cuando la construcción se había generado por mutagénesis dirigida (M.2.12.). Se incubaron 30 min en hielo para permitir la adhesión del DNA a la superficie celular y se realizó un choque térmico de 20 s a 42°C para permitir la entrada del DNA en la célula. A continuación, las células se incubaron 2 min en hielo. Se añadieron 950 µL de medio LB (M.1.4.1.) precalentado y las células se incubaron durante 1 h más a 37°C bajo agitación suave (160–225 rpm). El cultivo se sembró (aproximadamente 100 µL por placa) en placas de LB-agar (M.1.4.1.) con ampicilina a 50 µg/mL y se incubó toda la noche a 37°C.

El protocolo seguido con las células *Stellar*TM (Takara Bio), empleadas cuando la construcción se había generado por recombinación, es igual, salvo por que el choque térmico se realiza incubando 45 s a 42°C y las células se recuperan en medio SOC (Takara Bio) (M.1.4.1.).

M.2.4. SELECCIÓN DE COLONIAS RECOMBINANTES

En primer lugar, las células transformadas se seleccionaron por la resistencia a antibiótico conferida por el plásmido vector de la construcción mediante su cultivo en medio LB-agar (M.1.4.1.) suplementado con ampicilina a 50 µg/mL (M.2.3.). Para verificar la presencia del inserto en el vector, se obtuvieron cultivos en medio líquido de los clones aislados en medio sólido y se extrajo el DNA plasmídico (M.2.10.). Éste se digirió, en cada caso, con enzimas de restricción (M.1.3.) cuyo patrón de corte permitiese identificar las construcciones de interés. Los fragmentos resultantes se resolvieron mediante una electroforesis en gel de agarosa (M.2.16.1.1.). Una vez verificada la presencia del inserto en el plásmido, éste se secuenció por el método Sanger (M.2.19.) para comprobar la integridad de la secuencia y la ausencia de mutaciones.

M.2.5. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

La línea celular Vero se mantuvo en medio MEM suplementado con SFB al 5%, L-Glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM (M.1.4.1.). Las células BHK-21, se cultivaron en medio G-MEM suplementado con SFB al 10%, triptosa fosfato 0,1 mM y tampón HEPES 10 mM (M.1.4.1.). Las líneas HEK-293T y HeLa se mantuvieron en medio DMEM-LG suplementado con SFB al 10%, L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (M.1.4.1.). Todos los cultivos de células de mamífero se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Las células de mosquito C6/36 se mantuvieron en medio M3 suplementado con SFB al 10%, L-glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (M.1.4.1.) a 28°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂.

M.2.6. TRANSFECCIÓN

La transfección se realizó básicamente como se describe en (Romero-López et al., 2007) . Brevemente, 24 h antes de la transfección, se sembraron 30000 células/cm² y se crecieron hasta alcanzar el 80% de confluencia. A cada pocillo se añadió una mezcla con 1,5 µg del RNA transcrito de estudio, 300 ng del RNA normalizador m⁷G-RLuc, 100 µL de medio *Opti-MEM*[®] (Gibco[®] de LifeTechnologies[™]) y 2 µL del reactivo de transfección *TransFectin*[™] (Bio-Rad).

M.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

A las 4 h post-transfección (M.2.6.), se lisaron las células y se midió la actividad luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (FLuc) y de *Renilla* (RLuc) utilizando *Dual-Luciferase Reporter Assay Kit* (Vazyme, Nanjing, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención del lisado, se descartó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron 100 µL del *Cell Lysis Buffer* 1X por pocillo y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Los lisados se transfirieron a tubos de centrifuga, se centrifugaron durante 2 min a 1200xg a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80°C para su posterior análisis. Para la medida de la actividad FLuc, se añadió al tubo de detección 100 µL de *Luciferase Substrate* a temperatura ambiente, preparado previamente en *Reaction Buffer II*, y 20 µL de lisado celular. Se mezcló e inmediatamente se midió la actividad luciferasa a 560 nm en un *FB 12 Luminometer* (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany). Para medir la actividad RLuc, se añadió al tubo de detección 100 µL del Sustrato de *Renilla*, se mezcló y se midió la luminiscencia a 465 nm.

Las medidas de luminiscencia FLuc y RLuc emplearon para calcular la eficiencia relativa de traducción como la relación FLuc/RLuc. Se realizaron, al menos tres réplicas independiente de cada ensayo y, a partir de los datos obtenidos, se obtuvo la eficiencia relativa de traducción media y la correspondiente desviación estándar. El resultado obtenido para cada RNA ensayado se referenció con respecto a la construcción indicada en cada caso. Las diferencias significativas en la eficiencia de traducción se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

M.2.8. ENSAYO DE ESTABILIDAD INTRACELULAR

La estabilidad intracelular de las construcciones de RNA se evaluó mediante RT-qPCR. A las 4 h post-transfección (M.2.6.), se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. A continuación, se extrajo el RNA total con *TRIzol* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se añadieron 200 μ L de *TRIzol* a cada pocillo y las células se incubaron 3 min a temperatura ambiente para permitir la lisis. Tras resuspender, el lisado se transfirió a un tubo y se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo. Se agitó y se incubó 2–3 min más a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 12000xg a 4°C y se recuperó la fase acuosa con el RNA con cuidado de no arrastrar el DNA de la interfase. Se trató con 2 U de DNasa RQ1 (Promega) 30 min a 37°C para eliminar el DNA restante. El RNA extraído se purificó mediante extracción fenólica y se precipitó con etanol como se describe en el M.2.15.1., salvo porque, en este caso, el RNA precipitado se secó a 37°C en lugar de por centrifugación al vacío. Se resuspendió en 16 μ L de agua *Milli-Q*® estéril. La concentración de la suspensión se determinó por espectrofotometría (M.2.18.1.) y la calidad del RNA total obtenido se verificó en una electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído (M.2.16.1.1.).

Se retrotranscribieron 150 ng de RNA total con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) utilizando hexámeros aleatorios a una concentración final de 10 μ M. Brevemente, el RNA total junto con los hexámeros aleatorios se desnaturalizaron 2 min a 95°C y se enfrió lentamente a 16°C para permitir la hibridación. A continuación, se añadieron el resto de los componentes de la reacción: *RT Buffer* 1X, dNTPs 0,8 mM y *MultiScribe Reverse Transcriptase* a una concentración final de 1,5 U/ μ L. La reacción se incubó durante 30 min a 16°C para iniciar la síntesis del DNA complementario (cDNA) y posteriormente, 30 min a 42 °C para la extensión rápida de los ODNs. Finalmente, se inactivó la retrotranscriptasa 5 min a 85°C.

La amplificación del cDNA de las construcciones de estudio se realizó con el kit *TB Green® Premix Ex Taq* (Takara Bio) utilizando los ODNs qFLuc_Fw y qFLuc_Rv (M.1.10.). Las reacciones de qPCR se prepararon en una placa de 96 pocillos con *SyBER Mix* 1X, 1,5 pmol de cada ODN y una fracción 3/20 de la reacción de retrotranscripción en un volumen final de 15 μ L.

El programa de amplificación constó de etapa inicial de 30 s a 95°C para activar la mezcla de DNA polimerasas; y 40 ciclos de las etapas de: (i) desnaturalización 5 s a 95°C e (ii) hibridación y extensión de los ODNs 30 s a 60°C. La normalización se realizó mediante RT-qPCR del mRNA del gen *abl*, empleando los cebadores hABL_Fw y hABL_Rev (Barroso-delJesus et al., 2011) para el paso de amplificación. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por triplicado en un dispositivo CFX96™ (Bio-Rad), y el nivel medio de expresión relativa se calculó con el software CFX Manager™ (Bio-Rad). Se aplicó la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes construcciones.

M.2.9. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD 40S

La obtención de lisados S10 para la extracción de 40S se realizó a partir de la línea celular Vero como se describe en (Ríos-Marco et al., 2016). Se partió de un cultivo al 100% de confluencia ($\sim 3 \cdot 10^9$ células). Las células se trataron con tripsina 2 min a 37°C, se sedimentaron mediante centrifugación a 1000xg durante 5 min a 4°C y se lavaron con 10 volúmenes de tampón isotónico (M.1.5.3.). La lisis se realizó incubando las células a 4°C durante 20 min con 1,5 volúmenes de tampón hipotónico (M.1.5.3.) pre-enfriado. El lisado celular se homogeneizó en un homogeneizador Dounce de vidrio refrigerado (25 golpes) y se equilibró con 0,2 volúmenes de tampón S10 (M.1.5.3.). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 10000xg durante 10 min. La cantidad de proteína se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm. Los lisados se congelaron a -80°C.

La subunidad ribosómica 40S se aisló a partir de los lisados S10 como se describe en (Pestova et al., 1996a). En un tubo de ultracentrífuga, se añadieron 3 mL de sacarosa 1 M en tampón A (M.1.5.3.) sobre los que se dispusieron 500–650 μ L de lisado. Los tubos se completaron con tampón hipotónico (M.1.5.3.) y se ultracentrifugaron en un rotor Beckman 70.1 Ti a 40000 rpm y 4°C durante 4 h. El sedimento de polisomas se resuspendió en tampón B (M.1.5.3.) a una concentración final de 50-150 unidades de A_{260} y se trató con puromicina 4 mM para su desensamblaje. El tratamiento se llevó a cabo durante 10 min a 4°C seguidos de 30 min a 37°C. Se añadió una concentración de KCl 0,5 M para favorecer la

liberación del factor eIF3 de las subunidades ribosómicas. La suspensión resultante se resolvió en un gradiente lineal continuo de sacarosa 10–30% en tampón A mediante ultracentrifugación a 28000 rpm y 4°C durante 18 h en un rotor *Beckman SW40*. Los gradientes de sacarosa se prepararon utilizando el *BioComp Gradient Master 108* (BioComp Instruments, Fredericton, NB, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cargaron 200–250 µL de suspensión en cada gradiente. Se recogieron fracciones de 500 µL desde la parte superior del gradiente y se comprobó la presencia de rRNA en cada una mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (M.2.16.1.1.). Para ello, 5 µL de cada fracción fue desnaturalizados 2 min a 95°C de forma independiente en presencia de tampón desnaturalizante para la carga de geles desnaturalizantes de agarosa y poliacrilamida 1X (M.1.5.1.), previo a su carga en el gel. Las fracciones que contenían la subunidad 40S aislada se unificaron y la suspensión resultante se concentró mediante el sistema *Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Unit 30 kDa MWCO* (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). La concentración final se determinó por espectrofotometría UV (1 unidad A₂₆₀ equivale a 30 pmol/mL). La suspensión de 40S purificada se conservó a -80°C en alícuotas.

M.2.10. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

La extracción del DNA plasmídico se llevó a cabo a partir de los cultivos de *E. coli* crecidos en medio LB líquido hasta saturación (M.2.1.) mediante *E.Z.N.A® Plasmid Mini Kit I* (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE.UU). El kit se basa en una lisis alcalina de las células seguida de la retención del DNA plasmídico en una resina, para su posterior elución en una solución de baja fuerza iónica. Se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante con algunas modificaciones. Se sedimentaron las células por centrifugación a 10000xg durante 1 min. El sedimento se resuspendió en 250 µL de *Solution 1*, a la cual previamente se le añadió la RNasa del kit. Se añadieron 250 µL de *Solution 2* y se incubó durante 2-3 min en hielo para favorecer la formación del precipitado en el siguiente paso. A continuación, se añadieron 350 µL de *Solution 3* y se invirtió varias veces hasta obtener un precipitado blanco. Para separar el DNA plasmídico del precipitado de proteínas y DNA genómico se centrifugó a 13000xg durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una columna previamente equilibrada con 100 µL de NaOH 3M y se centrifugó 1 min a 13000xg

para recoger el DNA en la resina. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron a la columna 700 μ L de *DNA Wash Buffer* y se centrifugó 30 s a 13000xg. Este paso se realizó dos veces. Por último, se centrifugó la columna vacía 2 min a 13000xg para eliminar los restos de solución de lavado y se transfirió a un tubo limpio para la elución del DNA plasmídico en 50 μ L de agua *Milli-Q*[®]. La concentración de DNA plasmídico se determinó por espectrofotometría (M.2.18.1.) y la integridad del plásmido se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante (M.2.16.1.1.).

M.2.11. SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.11.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el kit *FastStart[™] Taq DNA Polymerase* (Roche) en un termociclador *T100[™] Thermal Cycler* (Bio-Rad). Se utilizaron cantidades entre 10 pg–100 ng de DNA molde dependiendo de la longitud del mismo; 0,5 μ M de cada ODN (M.1.10.); dNTPs 200 μ M, *PCR Reaction Buffer* 1X (MgCl₂ a 2 mM incluido) y 2 U de enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* para 50 μ L de reacción. Se emplearon diferentes protocolos de amplificación, pero todos constaron de una etapa inicial de desnaturalización y activación de la DNA polimerasa de 2–5 min a 95°C; 30 ciclos de las etapas de: (i) desnaturalización 30 s a 95°C, (ii) hibridación de los ODNs 30 s a 45–65°C y (iii) elongación 45 s–1 min a 72°C (1 min por cada 1 kb de fragmento a amplificar); y una fase final de elongación de 10 min a 72°C. La fase de hibridación de los ODNs se realizó a la temperatura de desnaturalización (T_m) más baja de los dos ODNs utilizados. En el caso de las reacciones de PCR en las que los ODNs incorporaban extensiones al producto de amplificación, se emplearon programas con dos etapas de amplificación. En la primera etapa, de 5 ciclos, la temperatura de hibridación se seleccionó en base a la T_m de los ODNs excluyendo las extensiones. En la segunda etapa, de 25 ciclos, se aumentó la temperatura de la etapa de hibridación al incluir las extensiones en el cálculo de la T_m .

La amplificación del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (M.2.16.1.1.) y el producto resultante se purificó, de forma preferente, por extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.).

En los casos en los que se obtuvo el fragmento de interés contaminado por productos de amplificación inespecíficos o dímeros de ODNs, la purificación se realizó en gel de agarosa (M.2.15.2.). En todos los casos, el DNA purificado se cuantificó mediante espectrofotometría (M.2.18.1.).

M.2.11.2. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

La mayoría de las construcciones de RNA se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* (M.1.11.) a partir de DNA plasmídico previamente linearizado con la correspondiente enzima de restricción o de fragmentos de DNA de doble cadena obtenidos mediante PCR. En ambos casos, antes de su utilización como molde de la reacción de transcripción, el DNA fue purificado mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.), o bien, mediante gel de agarosa (M.2.15.2.). Las reacciones de transcripción se llevaron a cabo con diferentes kits comerciales dependiendo de la longitud del transcrito resultante.

Todas las transcripciones *in vitro* utilizando moldes derivados del plásmido pGL-WNV se realizaron con el kit *HighYield T7 RNA Synthesis* (Jena Bioscience, Jena, Alemania). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 µL. Los componentes se añadieron a temperatura ambiente (salvo el *HighYield T7 RNA Polymerase Mix*, enfriado a 4°C) y en el orden especificado por el fabricante: agua Milli-Q® estéril, *HighYield T7 Reaction Buffer* 1X y DTT, NTPs a 7,5 mM cada uno, 1 µg de DNA molde y 2 µL de *HighYield T7 RNA Polymerase Mix*. Las reacciones se incubaron 2 h a 37°C en oscuridad. El grupo cap en el extremo 5' de los transcritos se añadió suplementando la reacción con *Ribo m⁷G Cap Analog* (Promega) 5 mM y reduciendo la concentración de GTP a 1,5 mM.

El resto de los RNAs se sintetizaron utilizando *T7 RNA polymerase* (Takara Bio). Las reacciones se prepararon en 20 µL con *T7 RNA Polymerase Buffer* 1X, DTT 50 mM, NTPs a 2,5 mM cada uno, 200 ng de DNA molde amplificado por PCR o 1,5 µg de DNA plasmídico linearizado, 20 U de inhibidor de RNasa (Ambion) y 200 U de *T7 RNA polymerase*. Se incubaron 2 h a 42°C.

Independientemente del kit utilizado, las reacciones de transcripción se trataron 30 min a 37°C con DNasa RQ1 (Promega) para la eliminación del DNA molde.

Los transcritos se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (M.2.15.4.) seguida de una extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.). El RNA se resuspendió en un volumen apropiado de agua Milli-Q® estéril. La concentración de la suspensión se determinó por espectrofotometría (M.2.18.1.) y la calidad del RNA obtenido se verificó en una electroforesis en gel de agarosa desnaturizante con formaldehído (M.2.16.1.1.).

M.2.11.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción del RNA para obtener el DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 20 µL y siguiendo las instrucciones del fabricante: *First-Strand Buffer* 1X, DTT 50 mM, dNTPs a 0,5 mM cada uno y *SuperScript™ III RT* 10 U/µL. La cantidad de RNA molde utilizada y de cebador varió dependiendo del ensayo, por lo que se especifica en cada caso. Todas las reacciones de retrotranscripción se incubaron durante 30 min a 52°C. El RNA molde se eliminó tratando las reacciones de retrotranscripción con NaOH 0,3 M durante 5 min a 95°C. Seguidamente, se neutralizó con Tris-HCl 1 M no tamponado durante 5 min a 95°C.

M.2.12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Las deleciones se llevaron a cabo mediante mutagénesis dirigida a partir de construcciones de DNA plasmídico preexistentes. Para ello, se fosforiló el extremo 5' de los ODNs indicados en el apartado M.1.11. para cada construcción. Estos ODNs hibridan en las secuencias flanqueantes a la región que se va a deletar en el plásmido y son divergentes entre sí, de manera que la región queda excluida de la posterior amplificación por PCR. Los extremos fosforilados del producto de amplificación se someten a una reacción de ligación para dar lugar al DNA plasmídico portador de la deleción.

La **fosforilación de los ODNs** se llevó a cabo con la enzima comercial *T4 Polynucleotide Kinase* (New England BioLabs). Las reacciones se prepararon en 50 µL con 300 pmol de ODN defosforilado, *NEBuffer for T4 Polynucleotide kinase* 1X, ATP 1 mM y *T4 Polynucleotide Kinase* 20 U. Se incubaron 1 h a 37°C y se inactivó la encima calentando a 75°C durante 10 min.

Los ODNs fosforilados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (M.2.15.4.) seguida de una extracción con fenol y precipitación con etanol (M.2.15.1.). Se resuspendieron en 12 μ L de agua *Milli-Q*[®] y se determinó la concentración de la suspensión por espectrofotometría (M.2.18.1.).

La **amplificación por PCR** del fragmento de interés se realizó con el kit *Phusion*[™] *Site-Directed Mutagenesis* (Thermo Scientific[™]) en un volumen de 25 μ L y las siguientes condiciones de reacción: *Phusion*[™] *HF Buffer* 1X, dNTPs 200 μ M, ODNs fosforilados 5' y 3' a 0,5 μ M cada uno, 0,5 ng de DNA molde y *Phusion*[™] *Hot Start II DNA polymerase* 0,5 U. El protocolo de amplificación utilizado consistió, generalmente, en una etapa inicial de desnaturalización de 30 s a 98°C; 25 ciclos de las etapas de: (i) desnaturalización 5–10 s a 98°C, (ii) hibridación de los ODNs 10–30 s a 65–72°C y (iii) elongación 15–30 s/Kb a 72°C; y una fase final de elongación de 5 min a 72°C. La temperatura usada en la etapa de hibridación se definió a partir del cálculo de la T_m de los ODNs, y se hizo utilizando el [calculador del sitio web de Thermo Scientific](#)[™], el cual se basa en la secuencia del par de ODNs utilizado, la concentración de los mismos en la reacción y el kit empleado. En los casos en los que la temperatura de hibridación calculada era próxima a 72°C, se realizó una etapa conjunta de hibridación–elongación de 45 a 72°C, como indica el fabricante.

El producto de PCR se resolvió por electroforesis en gel de agarosa (M.2.16.1.1.) para verificar la amplificación y se cuantificó la concentración del mismo por espectrofotometría. En aquellos casos en los que se obtuvo más de un producto de amplificación, la construcción de interés se purificó en gel de agarosa (M.2.15.2.) antes de proceder a la religación del plásmido.

Para la **circularización del producto de ligación** se utilizó la DNA ligasa T4 incluida en el kit *Phusion*[™] *Site-Directed Mutagenesis*. Para ello, se prepararon las reacciones con 10–20 ng de DNA, *Rapid Ligation Buffer* 1X y 0,5 μ L de *T4 DNA Ligase* en un volumen final de 10 μ L. Se incubaron 5 min a 25°C y se enfriaron en hielo antes de proceder a la transformación (M.2.3.) de 50 μ L de células competentes con 2,5 μ L de la reacción de ligación.

M.2.13. CONSTRUCCIÓN DE HÍBRIDOS SUBGENÓMICOS VIRALES POR RECOMBINACIÓN

Las secuencias codificantes de la 3' UTR de DENV y YFV se adquirieron como *gBlocks*[™] (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA), es decir, fragmentos de DNA de doble cadena constituidos por la secuencia de interés flanqueada por 15 pb en ambos extremos, que corresponden a las secuencias que flanquean el sitio de inserción en el plásmido donde se va a clonar el DNA.

Los *gBlocks*[™] se insertaron en el sitio de corte *Bam*HI del plásmido pUC19 mediante recombinación usando el kit *In-Fusion*[®] *HD Cloning* (Takara Bio). Para ello, se linearizó el DNA plasmídico con *Bam*HI y se purificó mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.). La reacción de ligación se preparó con *In-Fusion Enzyme Premix* 1X, 100 ng del plásmido linearizado y 40 ng del DNA inserto en un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó 15 min a 50°C antes de proceder a la transformación (M.2.3.) de las células competentes.

M.2.14. MARCAJE DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.14.1. MARCAJE RADIATIVO EN EL EXTREMO 5'

El marcaje de los ODNs en su extremo 5' con ³²P se realizó con el kit *T4 Polynucleotide Kinase* (New England Biolabs). La reacción de fosforilación se preparó en un volumen de 30 µL con 50 pmol del ODN, 50 µCi de [γ -³²P] ATP (M.1.2.), *NEBuffer for T4 Polynucleotide kinase* 1X y 20 U de *T4 Polynucleotide Kinase*; y se incubó 30 min a 37°C. El ODN marcado en 5' se purificó mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (M.2.15.3.) seguida de una extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.) y se resuspendió en 20 µL de agua *Milli-Q*[®] estéril.

M.2.14.2. MARCAJE RADIATIVO INTERNO

La síntesis de RNA marcado internamente se realizó mediante transcripción *in vitro* con el kit *T7 RNA polymerase* (Takara Bio), como se describe en el apartado M.2.11.2., pero reduciendo la concentración de UTP de 2,5 mM a 1,5 mM y añadiendo 10 µCi de [α -³²P] UTP (M.1.2.) a la reacción. Las reacciones fueron

incubadas 2 h a 42°C y, seguidamente, el DNA molde se eliminó tratando con DNasa RQ1 (Promega) durante 30 min a 37°C.

El RNA marcado internamente se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (M.2.15.4.) o electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (M.2.15.3.) seguida de una extracción con fenol y precipitación con etanol (M.2.15.1.). El RNA se resuspendió en 10 µL de agua *Milli-Q*® estéril y se determinó su concentración como se indica en el apartado M.2.18.2.

M.2.15. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.15.1. EXTRACCIÓN FENÓLICA Y PRECIPITACIÓN CON ETANOL

Las muestras se llevaron a un volumen final de 200 µL con agua *Milli-Q*® y se les añadió 1 volumen igual de fenol equilibrado a pH 8,0. Las fases se mezclaron agitando vigorosamente y se separaron por centrifugación 3 min a 11200xg. Se recuperó la fase acuosa y se añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para repetir el proceso. La fase acuosa resultante se precipitó con 0,1 de volumen acetato sódico 3 M (pH = 6,0 para DNA y pH = 5,2 para RNA) y 3 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C o 30 min a -80°C. A continuación, se centrifugó durante 30 min a 4°C y 16000xg. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaron con 250 µL de etanol al 70% en el caso del DNA, y al 80% para el RNA. Tras centrifugar 15 min más, se decantó el sobrenadante y el precipitado se secó por centrifugación al vacío durante 10 min. El sedimento se resuspendió en un volumen apropiado de agua *Milli-Q*® estéril.

M.2.15.2. EN GEL DE AGAROSA

La muestra, generalmente un producto de amplificación por PCR, se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa (M.2.15.1.1.). Por epi-iluminación a 250 nm se localizó el fragmento de interés en el gel y se extrajo para llevar a cabo la elución del DNA con *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el bloque de agarosa con el fragmento de DNA se incubó a 65°C en un volumen suficiente de *Binding Buffer* hasta fundir por completo la agarosa. La solución resultante se transfirió a una columna con resina y se centrifugó 60 s a 8000xg a temperatura ambiente, para permitir la unión del

DNA a la resina. Seguidamente, se realizaron dos lavados con *Wash Buffer* para eliminar las impurezas del DNA. En cada uno, se añadieron 400 μL de solución y ésta se eluyó centrifugando 60 s a 8000 $\times g$. Los restos de la solución de lavado se eliminaron centrifugando la columna vacía 1 min a 8000 $\times g$. Finalmente, el DNA se eluyó en un volumen adecuado de agua *Milli-Q*® estéril.

M.2.15.3. EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Los transcritos marcados internamente (M.2.14.2.), así como los ODNs marcados en su extremo 5' (M.2.14.1.) con ^{32}P se purificaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (M.2.15.1.2.) para eliminar la contaminación por nucleótido no incorporado y productos de extensión incompletos. Tras la electroforesis, el gel de poliacrilamida se expuso durante 1–2 min con una película autorradiográfica. Superponiendo la película se identificó en el gel la región correspondiente a la molécula de interés, la cual se escindió para proceder a la elución del ácido nucleico. El fragmento de gel se incubó con 300 μL de tampón de elución (M.1.5.1.) durante toda la noche: a 4°C, para la elución de las construcciones de RNA, o a 37°C, en el caso de los ODNs de DNA. El ácido nucleico se recuperó del tampón de elución mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (4.2.15.1.).

M.2.15.4. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Las reacciones de transcripción *in vitro*, amplificación por PCR y marcaje interno de RNA con ^{32}P en las que no se obtuvieron productos de síntesis incompleta se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño para la eliminación de nucleótidos libres, sales, etc. Con este fin se usaron columnas de *Sephadex*™ G-25 *superfine* (GE Healthcare) con un lecho de aproximadamente 0,8 mL empaquetado por centrifugación a 1000 $\times g$ durante 2 min a 4°C. Las columnas fueron equilibradas con 100 μL de agua *Milli-Q*®. Seguidamente, se cargaron las muestras en un volumen de 100 μL y el ácido nucleico se recuperó mediante centrifugación 4 min a 800 $\times g$ a 4°C.

M.2.16. ELECTROFORESIS

M.2.16.1. DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.16.1.1. EN GEL DE AGAROSA

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 0,8–2% con el fin de visualizar y/o purificar ácidos nucleicos. En todos los casos, la agarosa se fundió en tampón TAE 1X (M.1.5.1.) y, durante la preparación del gel, se adicionó el reactivo *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 20000X* (iNtRON Biotechnology, Kirkland, WA, EE.UU.) a concentración final 1X. Éste contiene un agente intercalante capaz de emitir fluorescencia tras la irradiación con luz UV, permitiendo así visualizar los ácidos nucleicos. Como tampón de electroforesis se utilizó TAE 0,5X. La duración de la electroforesis se determinó en base a la migración de los colorantes del tampón de carga. Para las muestras de DNA se utilizó tampón no desnaturizante para la carga de geles de agarosa 1X (M.1.5.1.). Para las muestras de RNA se empleó tampón desnaturizante para la carga de geles desnaturizantes de agarosa y poliacrilamida 1X (M.1.5.1.) y éstas se desnaturalizaron 2 min a 95°C antes de cargarlas en el gel de electroforesis. Finalizada la electroforesis, los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 312 nm, o bien, mediante epi-iluminación a 254 nm para la escisión de la banda correspondiente en el gel y posterior purificación del ácido nucleico (M.2.15.2.).

M.2.16.1.2. EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para la **purificación de las construcciones de RNA** marcadas internamente con ^{32}P (M.2.14.2.) se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida de grosor 0,8 mm. Los geles se prepararon al 4% (p/v) de acrilamida a partir de una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida:bisacrilamida (19:1), a una concentración final de urea 7 M y en TBE 1X (M.1.5.1.). Como catalizadores de la polimerización se utilizaron persulfato amónico (PSA) 0,0625% (p/v) y tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,0625% (v/v). Tras la polimerización, los geles se sometieron a una pre-electroforesis de 30 min, con una intensidad de corriente continua de 36 mA. Las muestras se prepararon en tampón desnaturizante para la carga de geles desnaturizantes de agarosa y poliacrilamida 1X (M.1.5.1.), se desnaturalizaron 2 min a 95°C y se enfriaron en hielo

antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó a la misma intensidad de corriente que en la pre-electroforesis y durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las moléculas de RNA, el cual se estimó en función de la migración del xilencianol y azul de bromofenol presentes en el tampón de carga. La **purificación de los ODNs de DNA** marcados en su extremo 5' con ^{32}P (**M.2.14.1.**) mediante electroforesis se realizó en las mismas condiciones descritas para las construcciones de RNA, pero aumentando el porcentaje de poliacrilamida del gel al 15%. En ambos casos, la molécula de interés se detectó y se aisló a partir del gel como se indica en el apartado **M.2.15.3.**

En los **ensayos de inhibición de extensión de cebador** (**M.2.22.**), el cDNA se resolvió en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% con un grosor de 0,4 mm. Las muestras se prepararon igual que en los casos anteriores. La electroforesis se llevó a cabo usando tampón TBE 0,5X y fijando la potencia a 35 W.

M.2.16.1.3. ELECTROFORESIS CAPILAR

Las reacciones de electroforesis capilar fueron llevadas a cabo por el servicio de Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" en un *Genetic analyzer capillary electrophoresis DNA sequencer* 3130xl (Applied Biosystems).

M.2.16.2. DE PROTEÍNAS

Los complejos formados con la subunidad ribosómica 40S se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Se utilizaron geles de 0,8 mm de grosor en los que la sección inferior del gel (separador) se preparó al 12,5% de poliacrilamida a partir de una solución al 30% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) en tampón L para SDS-PAGE 1X (**M.1.5.1.**). Como catalizadores de la polimerización se emplearon PSA 0,05% (p/v) y TEMED 0,30% (v/v). La parte superior del gel (concentrador) se preparó al 4,5% (p/v) de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1), en tampón M para SDS-PAGE 1X (**M.1.5.1.**), y se polimerizó con PSA 0,05% (p/v) y TEMED 0,15% (v/v). Las muestras se desnaturizaron en tampón de carga desnaturizante para SDS-PAGE 1X (**M.1.5.1.**) durante 2 min a 95°C y se enfriaron en hielo antes de cargarlas

en el gel. La electroforesis se realizó en tampón *running* para SDS-PAGE 1X (M.1.5.1.) aplicando una intensidad de corriente continua de 36 mA.

Para la detección de la emisión radiactiva procedente de las muestras marcadas con ^{32}P , el gel se secó (M.2.17.) y se visualizó como se describe en el apartado M.2.18.3. La visualización de las proteínas se hizo mediante la tinción del gel con el reactivo SYPRO® *Ruby Protein Gel Stain* (Casa comercial). Para ello, el gel se sumergió en el colorante, protegido de la luz, y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y bajo agitación suave (50 rpm). El exceso de colorante se eliminó lavando el gel 30 min con una solución de etanol 10% y ácido acético 7% bajo agitación; seguidos de dos lavados de 5 min con agua destilada. Los geles teñidos se visualizaron en el escáner *Typhoon™ Biomolecular Imager* (Molecular Dynamics).

M.2.17. SECADO DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Para su conservación a largo plazo, los geles de electroforesis se secaron aplicando vacío en un SE 1160 *DryGel Sr. Slab Gel Dryer* (Hoefer, Inc., Holliston, MA, EE.UU.) durante 30 min a 80°C seguidos de 30 min de enfriamiento.

M.2.18. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M.2.18.1. DE DNA Y RNA NO MARCADO EN SOLUCIÓN

La concentración de las suspensiones de ácidos nucleicos se determinó a partir de la medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro tipo *NanoDrop®* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) por la aplicación de la ley de Lambert-Beer. Para DNA se aplicó un coeficiente de extinción molar de $0,02 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ y, para RNA, de $0,025 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$. Además de la absorbancia a 260 nm, se obtuvieron las medidas a 280 y 230 nm para determinar la pureza de la muestra. La relación A_{260}/A_{280} se empleó como indicador de la contaminación por proteínas; debe tener un valor de 1,8–2 para considerar pura la muestra. Cuando la relación presenta un valor inferior a 1,5, se considera que la suspensión está contaminada por proteínas. La relación A_{260}/A_{230} indica el grado de contaminación por polisacáridos y disolventes orgánicos. Su valor óptimo está por encima de 1,8.

M.2.18.2. DE RNA MARCADO RADIATIVAMENTE INTERNAMENTE EN SOLUCIÓN

La concentración de las suspensiones de RNA marcado internamente con ^{32}P (M.2.14.2.) se determinó cuantificando su emisión radiactiva en el contador de radioisótopos *Quick-Count QC-2000* (BioScan, Washington D.C., WA, EE.UU.). A partir del número de desintegraciones por minuto (DPM), se determinó la concentración del RNA marcado en solución a partir de los siguientes datos: (i) moles de UTP no marcado empleado en la reacción de transcripción *in vitro*; (ii) actividad teórica de la muestra en función a la cantidad de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ añadido a la reacción, (iii) actividad real de la muestra, estimada tras aplicar a la actividad teórica de la misma el factor de decaimiento de la actividad radiactiva $e^{-b \cdot t}$, donde $b = 0,0495$ para el ^{32}P y t es el número de días transcurrido desde que la actividad empieza a decaer, (iv) actividad de la muestra respecto a los moles de UTP no marcado, ya que la cantidad de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ añadida se considera despreciable; (v) la actividad específica de la molécula de RNA ($\mu\text{Ci}/\text{pmol}$), teniendo en cuenta el número de posibles incorporaciones del nucleótido marcado en la molécula, es decir, el número de uridinas presentes en la secuencia de la molécula; y (vi) concentración de moléculas de RNA marcadas internamente aplicando la relación $1 \mu\text{Ci} = 2,2 \cdot 10^6 \text{ DPM}$.

M.2.18.3. DE RNA MARCADO RADIATIVAMENTE INMOVILIZADO EN SOPORTE SÓLIDO

Los geles de poliacrilamida resultantes de los ensayos de inhibición de extensión de cebador, así como los filtros procedentes de la retención diferencial en filtro, previamente secados, se expusieron con una pantalla de almacenamiento de fósforo (GE HealthCare) durante toda la noche. Estas pantallas capturan imágenes latentes producidas por las emisiones radiactivas del ^{32}P incorporado a los ácidos nucleicos. Así, tras la estimulación inducida por láser, emiten una cantidad de fluorescencia proporcional a la emisión radiactiva de la muestra. La emisión fluorescente fue detectada con el escáner *Storm 820 Phosphor Imager* (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE.UU.) o, para la obtención de imágenes de alta resolución, con el escáner *Typhoon™ Biomolecular Imager* (Molecular Dynamics). En ambos casos, la señal radiactiva procedente de los productos marcados se cuantificó con el programa *Image Quant 5.2© software* (Molecular Dynamics).

M.2.19. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA

La secuenciación de DNA por el método Sanger fue llevada a cabo en *Genetic analyzer capillary electrophoresis DNA sequencer 3130xl* (Applied Biosystems) por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Las secuencias proporcionadas por el servicio se analizaron mediante el programa *Sequence Scanner Software v2.0.* (Applied Biosystems).

M.2.20. REACCIONES DE ASOCIACIÓN

M.2.20.1. ENSAYOS DE UNIÓN

Los ensayos de unión *in vitro* para calcular las constantes bioquímicas de las reacciones de unión entre las diferentes construcciones de RNA y la subunidad ribosómica 40S se realizaron como se describe en (Romero-López et al., 2018). Brevemente, se desnaturalizaron trazas del RNA marcado internamente con ^{32}P (M.2.14.2.) durante 2 min a 95°C y se renaturalizaron durante 15 min a 4°C. Las reacciones de unión se prepararon añadiendo concentraciones crecientes de la subunidad 40S purificada (0–400 nM) (M.2.9.) con tampón de unión 1X (M.1.5.2.) en un volumen final de 10 μL . Tras incubar 30 min a 37°C, se fraccionaron los complejos RNA-proteína formados mediante retención diferencial en filtro (M.2.21.).

La señal procedente de los complejos y del RNA libre se cuantificó utilizando el programa *Image Quant 5.2*© (GE Healthcare). Para cada concentración de 40S ensayada, se calculó la suma de la señal procedente de los complejos y del RNA libre y, en base a este dato, la proporción de complejo RNA-40S formada a dicha concentración. Se realizaron, al menos, tres réplicas independientes de cada ensayo, a partir de las cuales se obtuvo el valor medio y la desviación estándar. El ajuste de los datos a una curva de unión se hizo mediante el software *SigmaPlot* para *Windows* versión 14.5. En primera instancia, los datos se ajustaron a una ecuación sigmoideal de segundo orden cuya expresión es $y = (a \cdot x^b) / (c^b + x^b)$, donde: y es la proporción de RNA que se encuentra formando complejo, x es la concentración de ligando (en este caso, de subunidad 40S), b es el coeficiente de Hill, el cual proporciona una medida cuantitativa de la cooperatividad de unión del ligando, y c es la constante de semisaturación, que puede asumirse igual a

constante de disociación (K_d) en las condiciones experimentales aplicadas. En los casos en los que se especifica, se realizó un segundo ajuste a una curva de unión de dos sitios con ecuación $y = ((B_{max1})/(K_{d1} + x)) + ((B_{max2})/(K_{d2} + x))$, donde: y es la proporción de RNA formando complejo con 40S, B_{maxn} es el rendimiento máximo de la reacción en cada sitio de unión, x es la concentración de subunidad 40S, y K_{dn} , la concentración de 40S necesaria para alcanzar la formación máxima de complejo.

M.2.20.2. ENSAYOS DE COMPETICIÓN DE LA UNIÓN

Para los ensayos de competición, se incubaron trazas del RNA 3'WNV (**M.1.11.2.**) marcado internamente con ^{32}P (**M.2.14.2.**) con un exceso molar de 30 veces de subunidad ribosómica 40S purificada (**M.2.9.**) y concentraciones crecientes del RNA competidor no marcado (0–1 μM) en tampón de unión 1X (**M.1.5.2.**). Las reacciones se prepararon en un volumen de 10 μL y se incubaron 30 min a 37°C. Previamente, todos los RNAs fueron desnaturalizados por separado 2 min a 95°C y renaturalizados a 4°C durante 15 min. Los complejos RNA-proteína resultantes se separaron del RNA libre mediante retención diferencial en filtro (**M.2.21.**). Se cuantificó la señal radiactiva en los filtros y se determinó la proporción de complejo 3'WNV-40S formada para cada concentración de RNA competidor ensayada, como se describe en el apartado **M.2.20.1.**

Los datos de unión resultantes se referenciaron con respecto a la proporción de complejo formada en ausencia de competidor, fijada como 1. Los resultados obtenidos constituyen la media \pm desviación estándar de, al menos, tres réplicas independientes de cada ensayo. Las diferencias significativas en la competición se determinaron mediante la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

M.2.21. SEPARACIÓN DE COMPLEJOS RNA-40S DEL RNA LIBRE

Los complejos RNA-40S se fraccionaron mediante retención diferencial en filtro. Este método se basa en una membrana superior de nitrocelulosa (*GE Healthcare*) con un tamaño de poro de 0,45 μm , en la que quedan retenidos los complejos RNA-proteína; bajo la cual se dispone una membrana de nylon con carga positiva (*GE Healthcare*), en la que se recuperan las moléculas de RNA libre. Los filtros se humedecieron en tampón de unión 1X (**M.1.5.2.**) y se ensamblaron en el sistema

Bio-Dot™ Apparatus (Bio-Rad). Las muestras se llevaron a un volumen final de 100 µL con tampón de unión 1X, se aplicaron como una gota sobre la membrana de nitrocelulosa y se sometieron a vacío para favorecer la filtración. Seguidamente, ambos filtros se secaron al aire.

M.2.22. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE EXTENSIÓN DE CEBADOR

Para los ensayos de inhibición de extensión de cebador, se prepararon reacciones de unión con 0,1–0,2 pmol de RNA, desnaturalizado como se indica en el apartado **M.2.20.2.**, y un exceso molar de subunidad 40S (**M.2.9.**) de 75, 25 o 5 veces, o en condiciones equimolares. Las reacciones se prepararon en tampón de unión 1X (**M.1.5.2.**), en un volumen final de 10 µL, y se incubaron 30 min a 37°C. En paralelo, se llevó a cabo la reacción en ausencia de 40S. A continuación, el RNA se retrotranscribió (**M.2.11.3.**) en presencia de 250–500 cuentas por segundo (CPS) del ODN marcado en su extremo 5' con ³²P (**M.2.14.1.**) indicado en cada caso. Las reacciones de secuenciación se prepararon añadiendo a la reacción de retrotranscripción cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddNTPs) a 1 nM. El cDNA resultante se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes y de alta resolución (**M.2.16.1.2.**). Los geles se secaron (**M.2.17.**) y se cuantificó la señal radiactiva emitida por cada producto de extensión utilizando el programa *Image Quant 5.2©* (GE Healthcare). La señal obtenida en presencia de 40S para cada producto se refirió a la señal obtenida en la reacción sin 40S. Aquellos productos de cDNA en los que la intensidad relativa obtenida fue superior al cuartil Q₃ se consideraron paradas específicas de la retrotranscripción, es decir, paradas de la extensión del cebador originadas por los impedimentos estéricos asociados a la unión de 40S al RNA.

M.2.23. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL A GRAN ESCALA

M.2.23.1. SELECTIVE 2'-HYDROXYL ACYLATION ANALYZED BY PRIMER EXTENSION (SHAPE)

El ensayo de SHAPE (*Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension*) se realizó con los reactivos anhídrido N-metilisatoico (NMIA) y anhídrido 1-metil-6-nitroisatoico (1M6) (Romero-López et al., 2017, 2018).

Para ello, se prepararon reacciones de unión con 6,5 pmol del RNA 3'WNV (M.1.11.2.), 560 nM de subunidad 40S (M.2.9.) y tampón de unión 1X (M.1.5.2.) en un volumen final de 10 μ L; o bien, con 1 pmol de los transcritos m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV (M.1.11.1.) y 700 nM de subunidad 40S. En paralelo, se llevaron a cabo las reacciones en ausencia de 40S. Todas las reacciones se incubaron 15 min a 37°C. A continuación, se realizó la modificación química del RNA añadiendo NMIA 6 mM o 1M6 16 mM en un volumen final de 15 μ L e incubando a 37°C durante 30 o 5 min más, respectivamente. Para cada ensayo, se prepararon las disoluciones madre de NMIA y 1M6 en dimetilsulfóxido (DMSO) frescas y se añadieron a las reacciones de unión junto en tampón de unión 1X. Como control negativo, el RNA, en presencia y en ausencia de 40S, se incubó con DMSO de forma paralela. La modificación química se detuvo mediante la precipitación con etanol del RNA (M.2.15.1.). El RNA precipitado se sometió a retrotranscripción (M.2.11.3.) en presencia de 1,5 pmol del ODN fluorescente NED-as3'WNV (M.1.10.). Las reacciones de secuenciación se prepararon con 6,5 pmol del RNA 3'WNV o 1 pmol de los RNAs m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV y 3 pmol de los ODNs fluorescentes FAM-as3'WNV o VIC-as3'WNV (M.1.10.) en presencia de 1,5 nM de 2',3'-Dideoxicitidina-5'-Trifosfato (ddCTP) o 2',3'-Dideoximidina-5'-Trifosfato (ddTTP), respectivamente. El cDNA resultante se resolvió junto con las reacciones de secuenciación por electroforesis capilar (M.2.16.1.3.) para identificar las posiciones modificadas. Los electroferogramas fueron analizados con el programa *QuShape* (Karabiber et al., 2013).

Para el **RNA 3'WNV**, se obtuvieron los valores de reactividad normalizados NMIA y 1M6, en presencia y en ausencia de 40S, como se describe en (Karabiber et al., 2013; Romero-Lopez et al., 2014). A partir del conjunto de datos generado, se determinó el valor de reactividad promedio (\bar{N}) y la desviación estándar (DS). Estos parámetros se utilizaron para definir tres intervalos de reactividad: $<\bar{N}+DS$, reactividad nula; $>\bar{N}+DS$ y $<\bar{N}+2\cdot DS$, reactividad media; y $>\bar{N}+2\cdot DS$, reactividad alta. Los datos de reactividad relativa NMIA y 1M6 además se emplearon para obtener el perfil de SHAPE diferencial (SHAPE-dif). Con este fin, se empleó el módulo de SHAPE-dif (Rice et al., 2014), mediante el cual se escalan los valores de reactividad para cada agente de SHAPE y se derivan mediante ventanas deslizantes de 25 nt. A los valores escalados de reactividad NMIA se le sustraen los

valores escalados obtenidos para 1M6. Los resultados proceden de una única réplica del ensayo.

Para las **construcciones m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV**, se obtuvieron los valores de reactividad relativa NMIA de cada nucleótido y se procesaron como se describe en (Banijamali et al., 2023). Se seleccionó una secuencia reactiva de referencia (>0,4 unidades de reactividad) que sufriese poca variación entre ambas construcciones, en ausencia y en presencia de 40S, y se calculó su reactividad media. Este dato se utilizó para normalizar los datos de reactividad obtenidos en cada posición. Los valores resultantes se escalaron a 1. Este análisis se llevó a cabo por separado para las tres réplicas de cada ensayo y, posteriormente, se obtuvo el valor medio de reactividad NMIA normalizada para cada posición. Se definió como umbral de reactividad el valor (Q₃+RIQ), donde RIQ indica el rango intercuartil. Las diferencias significativas para cada nucleótido entre las diferentes condiciones experimentales se detectaron mediante la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

M.2.23.2. 2'-HYDROXYL MOLECULAR INTERFERENCE

Los ensayos de HMX (*2'-Hydroxyl Molecular Interference*) se realizaron esencialmente como se describe en (Romero-López et al., 2018). Brevemente, 5 pmol de RNA 3'WNV (**M.1.11.2.**) se trataron con 5 mM de NMIA en HEPES/NaOH 100 mM (pH 7,4), utilizando un volumen de reacción de 20 µL, 3 min a 95°C. Las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo durante 2 min y se repitió el tratamiento químico dos veces más. Tras cada ronda de tratamiento, se repuso el volumen de agua evaporado. En paralelo, se realizó el tratamiento del RNA con el disolvente DMSO como control negativo. El tratamiento químico se detuvo mediante la adición de acetato sódico 0,3 M (pH 5,2) frío seguida de precipitación con etanol (**M.2.15.1.**). A continuación, se prepararon las reacciones de unión con 2,5 pmol de RNA modificado y un exceso molar de tres veces de la subunidad 40S en tampón de unión 1X (**M.1.5.2.**) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Los complejos RNA-proteína y el RNA libre se separaron mediante retención diferencial en filtro (**M.2.21.**) y se purificaron a partir de las membranas de nitrocelulosa y nylon. Con este fin, se escindieron las áreas de los filtros en las que se encontraban las moléculas de estudio y se incubaron con 350 µL de tampón de elución (**M.1.5.1.**) durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación suave, o bien, toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se recuperó el ácido nucleico del tampón mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.15.1.). Las modificaciones se detectaron como paradas en una reacción retrotranscripción con el ODN fluorescente 5' NED-as3'WNV (M.1.10.). En paralelo, se prepararon las reacciones de secuenciación del RNA de estudio como se describe en el apartado M.2.23.1. El cDNA resultante se resolvió por electroforesis capilar (M.2.16.1.3.) junto con las reacciones de secuenciación. Utilizando el programa *QuShape* (Karabiber et al., 2013), se determinó la reactividad NMIA relativa para cada nucleótido tanto en el RNA libre como en el complejo RNA-40S. Se obtuvo la reactividad media y la desviación estándar para cada posición a partir de los datos de tres experimentos independientes. Se calculó la diferencia en la reactividad NMIA relativa en presencia con respecto a la ausencia de 40S y se aplicó la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para identificar los cambios significativos en la reactividad (Romero-López et al., 2017).

M.2.24. ANÁLISIS PROTEÓMICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las reacciones de unión se prepararon en tampón de *cross-linking* (M.1.5.2.) con RNA 3'WNV (M.1.11.2.) marcado internamente con ^{32}P (M.2.14.2.) y la subunidad 40S (M.2.11.), a las concentraciones indicadas en cada caso. Previamente, el RNA se desnaturalizó 2 min a 95°C y se incubó 15 min a 4°C. Las reacciones se incubaron durante 30 min a 37°C y se sometieron a *cross-linking* mediante irradiación con luz UV a 365 nm (800 mJ/cm²) durante 15 min en el *CL-1000 ultraviolet cross-linker* (Analytik Jena GmbH, Jena, Alemania). Durante el *cross-linking*, las reacciones se mantuvieron en un bloque metálico refrigerado para evitar el sobrecalentamiento. Posteriormente, se trató con 1 µg/µL de RNasa A durante 15 min a 37°C para eliminar el RNA no protegido por proteínas. Como control, cuando se indica, se realizó un tratamiento adicional con 2 µg/µL de proteinasa K en SDS al 0,5% durante 30 min a 65°C.

Las reacciones resultantes se resolvieron mediante SDS-PAGE y se detectó la emisión radiactiva en el gel (M.2.16.2.). Los fragmentos del gel que contenían proteínas marcadas radiactivamente, como resultado de su unión al RNA, se cortaron y fueron analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a

espectrometría de masas (LC-MS/MS, por sus siglas inglés) por el Servicio de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. El análisis proteómico fue llevado a cabo como se describe en (Romero-López et al., 2018). En primer lugar, las proteínas se redujeron con DTT, se derivatizaron con yodoacetamida y se digirieron con tripsina durante 18 h a 30°C. Los péptidos resultantes se extrajeron a partir de los sobrenadantes con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,2% y acetonitrilo (AcN) al 30%. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo líquido de nanoflujo *EASY-nLC™* (Proxeon/ Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica *amaZon speed ETD* (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.). La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 utilizando un flujo de 300 nL/min con gradientes de 5 a 35% B en 60 min (tampón A, 0,1% FA en agua; tampón B, 0,1% FA en AcN). El análisis de masas se realizó en el intervalo 390–1400 (m/z). Se seleccionaron diez precursores por ciclo para la fragmentación, estableciendo una exclusión dinámica de 0,5 min. La identificación de las proteínas se realizó utilizando los motores de búsqueda *ProteinScape* (Bruker) y *MASCOT* (Matrix Science, Londres, Reino Unido) en la base de datos *SwissProt* aplicando el filtro de humano, considerando la carbamidometilación como modificación fija y la oxidación como modificación variable.

RESULTADOS



R.1. LA 3' UTR DE WNV REGULA LA TRADUCCIÓN VIRAL

La síntesis de proteínas en flavivirus se produce principalmente por un mecanismo de traducción dependiente de cap (Ray et al., 2006; Y. Zhou et al., 2007) y se ha demostrado que la 3' UTR de DENV actúa como un regulador positivo de dicho proceso (Chiu et al., 2005; Holden & Harris, 2004) (**I.3.3.2**). Para determinar si la 3' UTR de WNV también potencia la traducción viral se realizó un **ensayo de traducción en cultivo celular** con el RNA subgenómico m⁷G-WNV (**M.1.11.1**). Esta construcción contiene la secuencia codificante de la luciferasa FLuc flanqueada por el extremo 5' del genoma viral (posiciones 1–160, es decir, la 5' UTR más el elemento cHP) y por la 3' UTR (posiciones de 10400 a 11029) de la cepa NY99-flamingo382-99 (**Figura R.1A**). También se ensayó la construcción m⁷G-WNV_Δ3'UTR (**M.1.11.1**), la cual carece de la 3' UTR de WNV (**Figura R.1A**). Ambas construcciones se sintetizaron en presencia de un análogo de cap de tipo 1 (m⁷G) (**M.2.11.2**). Se cotransfectaron células Vero (**M.2.6**) con los transcritos junto con el mRNA m⁷G-RLuc, el cual codifica la luciferasa RLuc y cuya traducción es dependiente de cap. Los valores de actividad RLuc se utilizaron para normalizar la eficiencia de transfección. La eficiencia de traducción de cada RNA se determinó cuantificando la actividad luciferasa a las 4 h post-transfección. Los datos de actividad FLuc normalizados fueron calibrados con respecto a la construcción de referencia, m⁷G-WNV (**M.2.7**). La eficiencia de traducción se redujo al 50% en ausencia de la 3' UTR (**Figura R.1B**), lo cual indica que dicha región potencia la traducción dependiente de cap. Este efecto no puede explicarse por diferencias en la estabilidad intracelular de las construcciones ensayadas (**Figura R.1C**), puesto que el análisis mediante RT-qPCR (**M.2.8**) indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la cantidad relativa de los distintos RNAs. Esto implica la existencia de un efecto específico de la 3' UTR en la síntesis de proteínas mediado por el extremo 5' del genoma de WNV.

Con el fin de investigar si el efecto de la 3' UTR sobre la traducción viral está limitado al contexto intracelular de la línea utilizada, se repitió el ensayo de traducción en **otras líneas celulares de mamífero**: HeLa, procedentes de carcinoma de cuello uterino humano; HEK-293T, obtenidas a partir de células embrionarias de riñón humano; y BHK-21, derivadas de fibroblastos de riñón de hámster; así como en

células de mosquito C6/36. El experimento confirmó que la 3' UTR de WNV, en presencia de la 5' UTR, es un potenciador de la traducción dependiente de cap en células de mamífero y mosquito; si bien su efecto está condicionado por el contexto celular. Así, el aumento en la eficiencia de traducción en presencia de la 3' UTR fue de ~12 veces en células HeLa, ~38 veces en HEK-293T, ~36 veces en BHK-21 y ~11 veces en C6/36 (**Figura R.1D**). Esto hace suponer que la potenciación de la traducción ejercida por la 3' UTR es dependiente, al menos en parte, de factores celulares que se encuentran diferencialmente presentes en las líneas utilizadas.

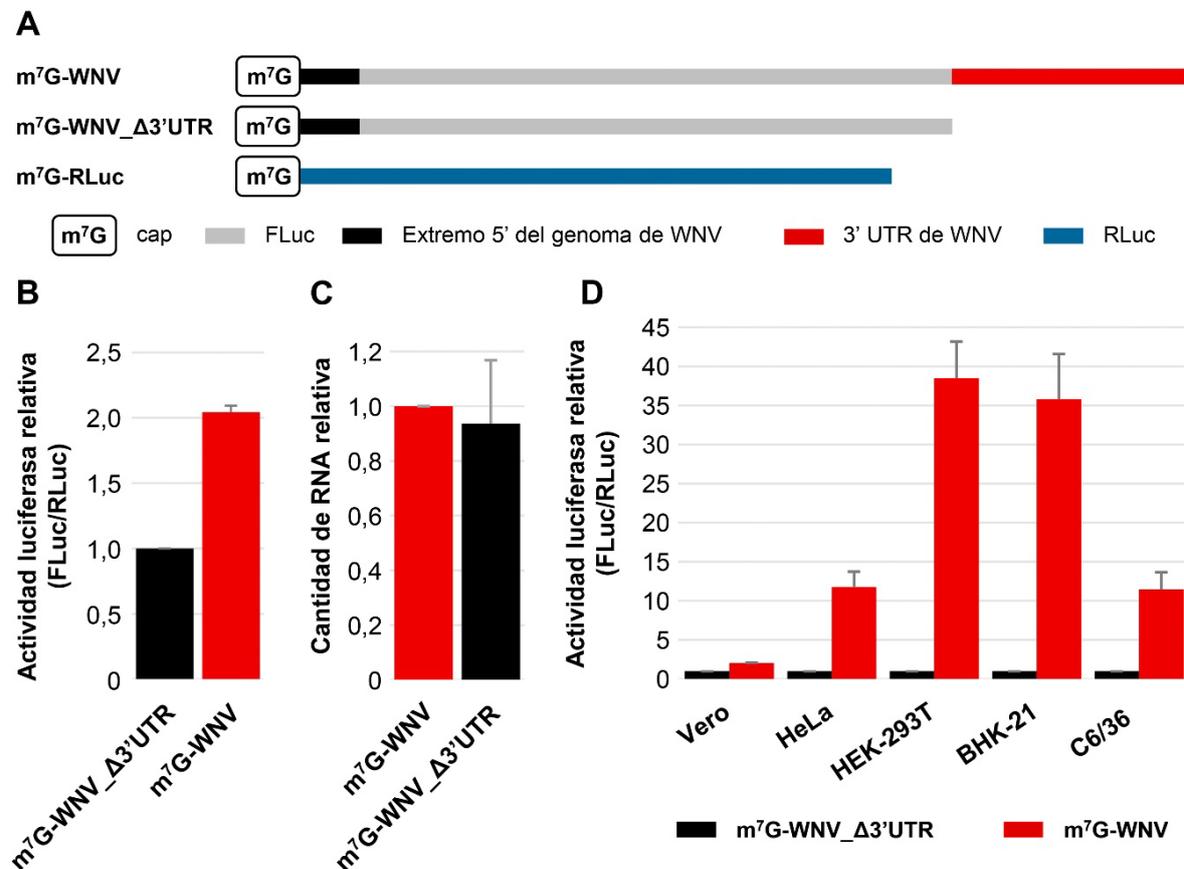


Figura R.1. La 3' UTR de WNV potencia la traducción dependiente de cap. (A) Esquema de las construcciones ensayadas. (B) Representación de la actividad luciferasa relativa en células Vero. Las células se cotransfectaron con las construcciones m7G-WNV y m7G-WNV_Δ3'UTR junto m7G-RLuc. Se cuantificó la actividad FLuc a las 4 h post-transfección y los datos se normalizaron con respecto a los obtenidos con m7G-RLuc. La eficiencia de traducción de m7G-WNV se referenció a la obtenida con m7G-WNV_Δ3'UTR. (C) Representación de la cantidad relativa de los RNAs m7G-WNV y m7G-WNV_Δ3'UTR en células Vero. A las 4 h post-transfección, se extrajo el RNA total y se determinó la cantidad relativa de cada construcción mediante RT-qPCR sobre el gen *fluc*, normalizada con respecto a la obtenida para *abl*. La cuantificación se realizó con el método $\Delta\Delta C_T$ (Pfaffl, 2001). (D) Representación de la eficiencia de traducción de m7G-WNV y m7G-WNV_Δ3'UTR en las líneas celulares de mamífero HeLa, HEK-293T y BHK-21 y en células de mosquito C6/36. La actividad luciferasa se cuantificó y los datos se normalizaron como en (B). En todos los casos, se representa la media de al menos tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

En varios MBFV se ha descrito que la síntesis de proteínas virales se produce incluso en condiciones celulares en las que la traducción dependiente de cap está bloqueada (Edgil et al., 2006; Song et al., 2019; T. Wang et al., 2020), lo cual indica la existencia de un mecanismo alternativo de **traducción independiente de cap**. Pese a que se desconoce cómo funciona dicho mecanismo, existe consenso sobre la implicación de la 3' UTR en el mismo (Edgil et al., 2006; Song et al., 2019; T. Wang et al., 2020) (**I.3.3.2.**). Con objeto de estudiar si la 3' UTR de WNV puede potenciar la traducción en ausencia de cap, se sintetizaron las construcciones WNV y WNV_Δ3'UTR sin cap. Además, se generó el transcrito FLuc-3'UTR (**M.1.11.1.**), el cual carece del extremo 5' del genoma de WNV (**Figura R.2A**). Las construcciones se ensayaron en células Vero como se ha descrito previamente para los RNAs con cap y los niveles de traducción se referenciaron con respecto a WNV_Δ3'UTR. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre WNV_Δ3'UTR y FLuc-3'UTR mientras que, en presencia de la 3' UTR, la eficiencia de traducción aumentó ~2,5 veces con respecto a WNV_Δ3'UTR (**Figura R.2B**). Este resultado indica que, al igual que en otros flavivirus, la 3' UTR de WNV potencia la traducción viral incluso en ausencia de cap.

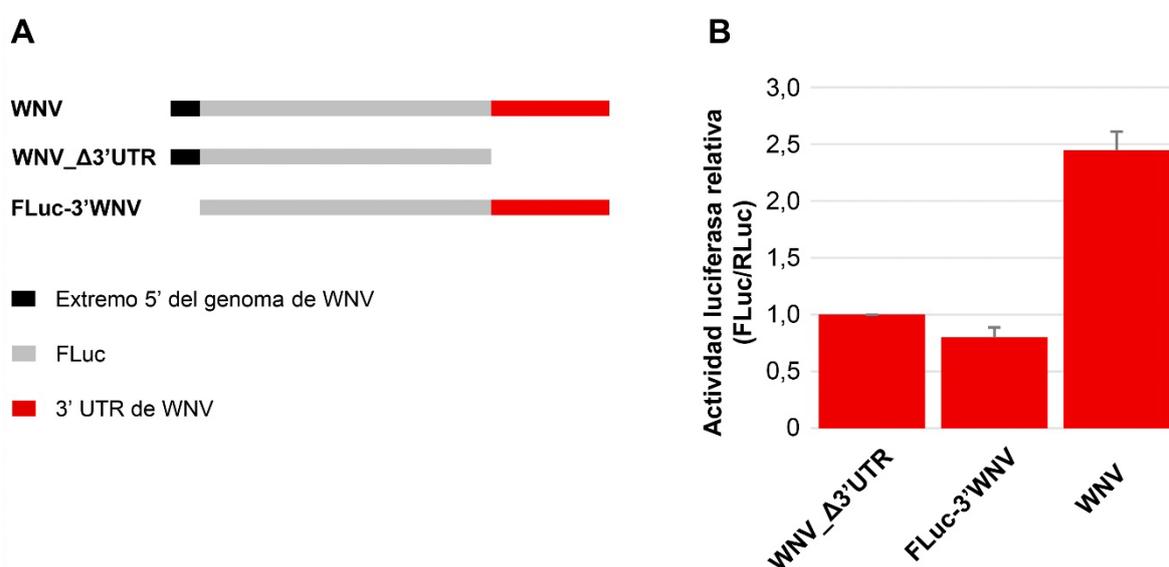


Figura R.2. La 3' UTR de WNV regula la traducción independiente de cap. (A) Esquema de las construcciones ensayadas. (B) Representación de la actividad luciferasa relativa obtenida para los RNAs mostrados en (A) en células Vero. La actividad FLuc se cuantificó como se describe en la **Figura R.1.** y los datos resultantes se normalizaron con respecto a la actividad RLuc. La actividad traduccional de WNV y FLuc-3'WNV se referenció a la obtenida con el RNA WNV_Δ3'UTR. Se obtuvo la media de al menos tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

R.2. ESTUDIO DE LA AFINIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN DE LA 3' UTR DE WNV A LA SUBUNIDAD RIBOSÓMICA 40S

Previamente habíamos observado en el laboratorio que la 3' UTR de WNV es capaz de interactuar directamente a la subunidad ribosómica 40S, por lo que se planteó que este proceso pudiese estar implicado en la potenciación de la traducción viral mediada por la 3' UTR, como ocurre en HCV (Bai et al., 2013).

R.2.1. LA 3' UTR DE WNV INTERACCIONA CON LA SUBUNIDAD 40S CON ELEVADA AFINIDAD

La afinidad y eficiencia de la interacción entre la 3' UTR de WNV y la subunidad 40S se analizaron mediante ensayos de unión *in vitro* (M.2.20.1.) utilizando el RNA 3'WNV, el cual contiene la 3' UTR del virus completa (M.1.11.2.). Brevemente, se incubaron cantidades traza del RNA 3'WNV marcado internamente con ³²P con concentraciones crecientes de subunidad 40S purificada (M.2.9.) a 37°C y en presencia de Mg²⁺ (M.2.20.1.). Los complejos 3'WNV-40S resultantes se separaron del RNA libre mediante retención diferencial en filtro (M.2.21.). Para ello, se cargaron las reacciones de unión en un sistema constituido por un primer filtro de nitrocelulosa (0,45 µm), en el que quedan retenidos los complejos RNA-proteína, y un segundo filtro de *nylon*, en el que se recupera el RNA libre (Figura R.3A). A continuación, se cuantificó la señal radiactiva emitida en ambos filtros (M.2.18.3.) para determinar la proporción de complejo formado.

Los datos de unión se ajustaron a una ecuación del tipo:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X^h}{K_d^h + X^h} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde Y es la proporción de complejo 3'WNV-40S formado; X, la concentración de subunidad 40S (nM); B_{max}, la unión máxima; h, el coeficiente de Hill, el cual informa sobre la cooperatividad de la interacción; y K_d, la constante de semisaturación, equivalente a la constante de disociación en las condiciones experimentales establecidas.

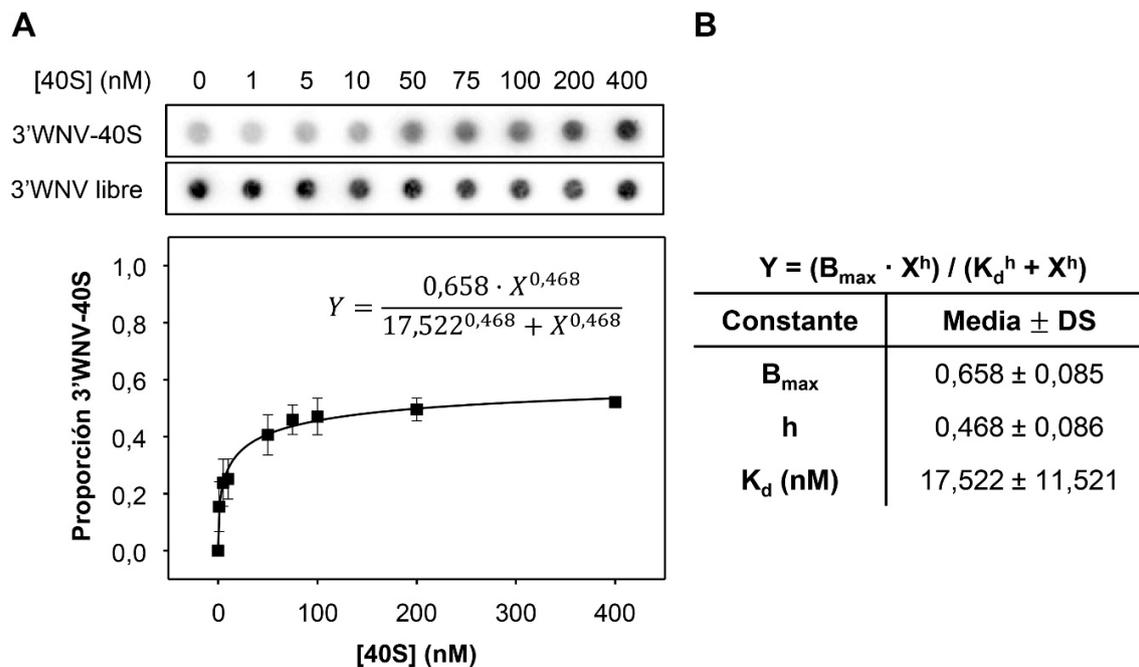


Figura R.3. La 3' UTR de WNV recluta la subunidad 40S con elevada afinidad y a través de más de un sitio de unión. (A) Autorradiografías representativas de los ensayos de unión el RNA 3'WNV marcado internamente con ^{32}P con la subunidad 40S. A partir de la cuantificación de la emisión radiactiva en los filtros se determinó la proporción de complejo 3'WNV-40S formado. Los datos representados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DS). (B) Constantes del ajuste de los datos a la [Ec.1](#) \pm desviación estándar.

Se obtuvo un coeficiente de Hill de $0,468 \pm 0,101$ (**Figura R.3B**). Este resultado indica la existencia de más de un sitio de unión, pero no permite diferenciar entre un fenómeno de cooperatividad negativa o la presencia de sitios de unión independientes (Martini & Habeck, 2015; Sevlever et al., 2020). El posterior ajuste de los datos experimentales a una ecuación que contempla dos sitios de unión ([Ec.2](#)) permitió determinar los valores de K_{d1} y K_{d2} .

$$Y = \frac{B_{max1} \cdot X}{K_{d1} + X} + \frac{B_{max2} \cdot X}{K_{d2} + X} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde Y es la proporción de complejo RNA-40S formado; X, la concentración de subunidad 40S (nM); B_{maxN} , la eficiencia de la unión RNA-40S; y K_{dN} , la constante de disociación en equilibrio para cada sitio teórico de interacción.

En ambos casos, éstos se encuentran en el rango nanomolar bajo (**Tabla R.1**), lo cual indica que la 3' UTR de WNV une a 40S con una afinidad comparable a la que exhibe el IRES ($K_d = 1,9 \pm 0,3$ nM) (Kieft et al., 2001) o la 3' UTR ($K_d = 1,8 \pm 0,2$ nM)

(Bai et al., 2013) de HCV por la subunidad ribosómica. El hecho de que no se haya podido determinar una cooperatividad positiva, junto con la diferencia de ~100 veces entre K_{d1} y K_{d2} , sugiere que, de confirmarse la existencia de dos o más sitios de unión a 40S en la 3' UTR de WNV, éstos podrían tener implicaciones funcionales diferentes.

Tabla R.1. Constantes obtenidas para la unión 3'WNV-40S según la Ec.2.

$$Y = (B_{MAX1} \cdot X) / (K_{D1} + X) + (B_{MAX2} \cdot X) / (K_{D2} + X)$$

Constante	Media ± DS
K_{d1} (nM)	0,231 ± 0,241
B_{max1}	17,642 ± 3,188
K_{d2} (nM)	28,832 ± 8,094
B_{max2}	37,294 ± 2,657

Los valores mostrados constituyen la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar (DS).

R.2.2. LA UNIÓN ENTRE LA SUBUNIDAD 40S Y LA 3' UTR DE WNV ES ESPECÍFICA

La especificidad de la interacción 3'WNV-40S se evaluó mediante ensayos de competición. Para ello, se incubó el RNA 3'WNV marcado con ^{32}P y la subunidad 40S en condiciones de subsaturación (M.2.20.2.) en presencia de concentraciones crecientes del RNA sin marcar o de un RNA no relacionado, el RNA-100 (M.1.11.3.). Previamente, se había demostrado en el laboratorio que el RNA-100 no forma complejo con 40S (Romero-López et al., 2018). Se observó que la proporción de complejo radiomarcado disminuyó un ~80% en presencia del RNA 3'WNV sin marcar; mientras que la competición con RNA-100 provocó una reducción significativa ($p < 0,05$) de ~20%, a la máxima concentración ensayada. Este resultado demuestra la especificidad de la unión de 40S a la 3' UTR de WNV. La competición mediada por RNA-100 podría explicarse por la saturación de la superficie del 40S a través de uniones inespecíficas, la cual podría interferir con los contactos débiles entre elementos estructurales específicos de la 3' UTR de WNV y la subunidad ribosómica, dificultando el reclutamiento. Este fenómeno ya había sido descrito previamente por otros autores en relación a la unión de la 3' UTR de HCV a 40S (Bai et al., 2013).

Con el fin de valorar si la unión 3'WNV-40S se ve afectada por el extremo 5' del genoma, se llevaron a cabo nuevos experimentos de competición en presencia del RNA 5'WNV (**M.1.11.1.**) con (m⁷G-5'WNV) y sin cap (5'WNV). Esta molécula contiene los primeros 160 nt del genoma de WNV, los cuales incluyen la 5' UTR íntegra y el elemento cHP junto con la secuencia de ciclación 5'CYC (**Figura R.4A**). El RNA 5'WNV disminuyó la formación de complejo 3'WNV-40S en un ~20% (**Figura R.4B**), por lo que no compitió de forma significativamente ($p < 0,05$) diferente al control RNA-100. Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la competición de 5'WNV en presencia o en ausencia de cap (**Figura R.4B**). Estos datos sugieren que, en ausencia de otros factores, la 3' UTR de WNV presenta mayor eficiencia de unión por 40S que el extremo 5' del genoma viral.

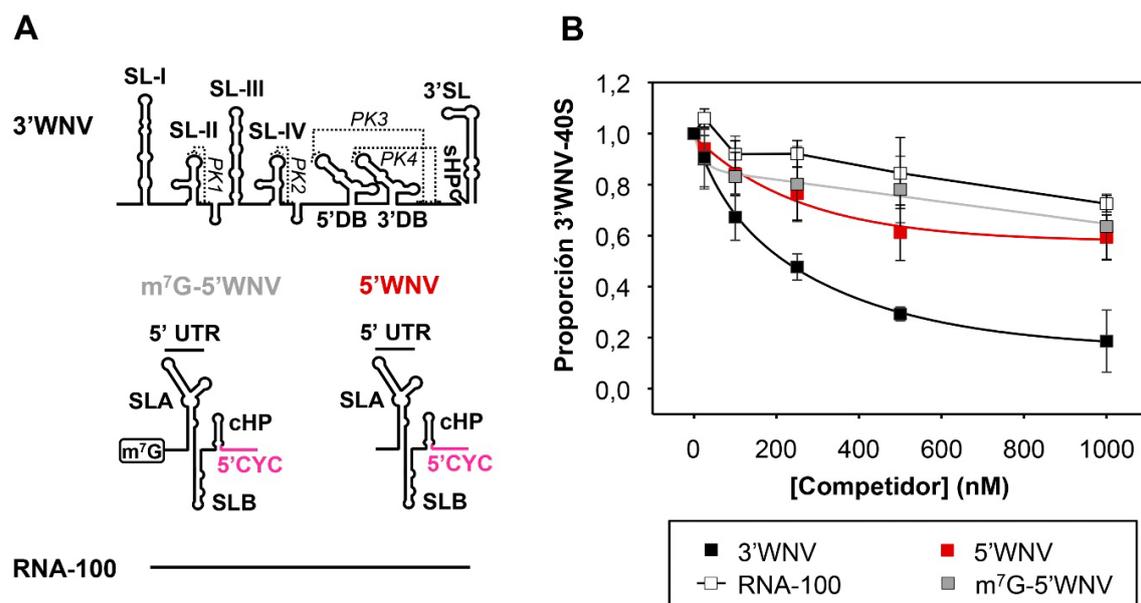


Figura R.4. La interacción entre la 3' UTR de WNV y la subunidad 40S es específica. (A) Diagrama de la estructura secundaria teórica de las construcciones utilizadas en los ensayos de competición. En rosa se indica la secuencia de ciclación 5'CYC. **(B)** Representación de la proporción de complejo 3'WNV-40S formado en presencia de concentraciones crecientes de los RNAs indicados en (A). Los datos representados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

R.3. EL RECLUTAMIENTO DE 40S ESTÁ INFLUIDO POR ELEMENTOS DE LA 3' UTR DE WNV

A fin de identificar la región mínima de la 3' UTR de WNV requerida para la interacción con 40S, se realizaron ensayos de unión, como se describe en el apartado R.2.1., utilizando mutantes con **deleciones secuenciales en su extremo 3'** (Figura R.5A) (M.1.11.2.). Las deleciones se diseñaron considerando elementos que, teóricamente, presentan plegamiento autónomo para minimizar distorsiones sobre la arquitectura global de la molécula. Los datos de unión se ajustaron a la ecuación Ec.1 (Figura R.5B y Tabla R.2).

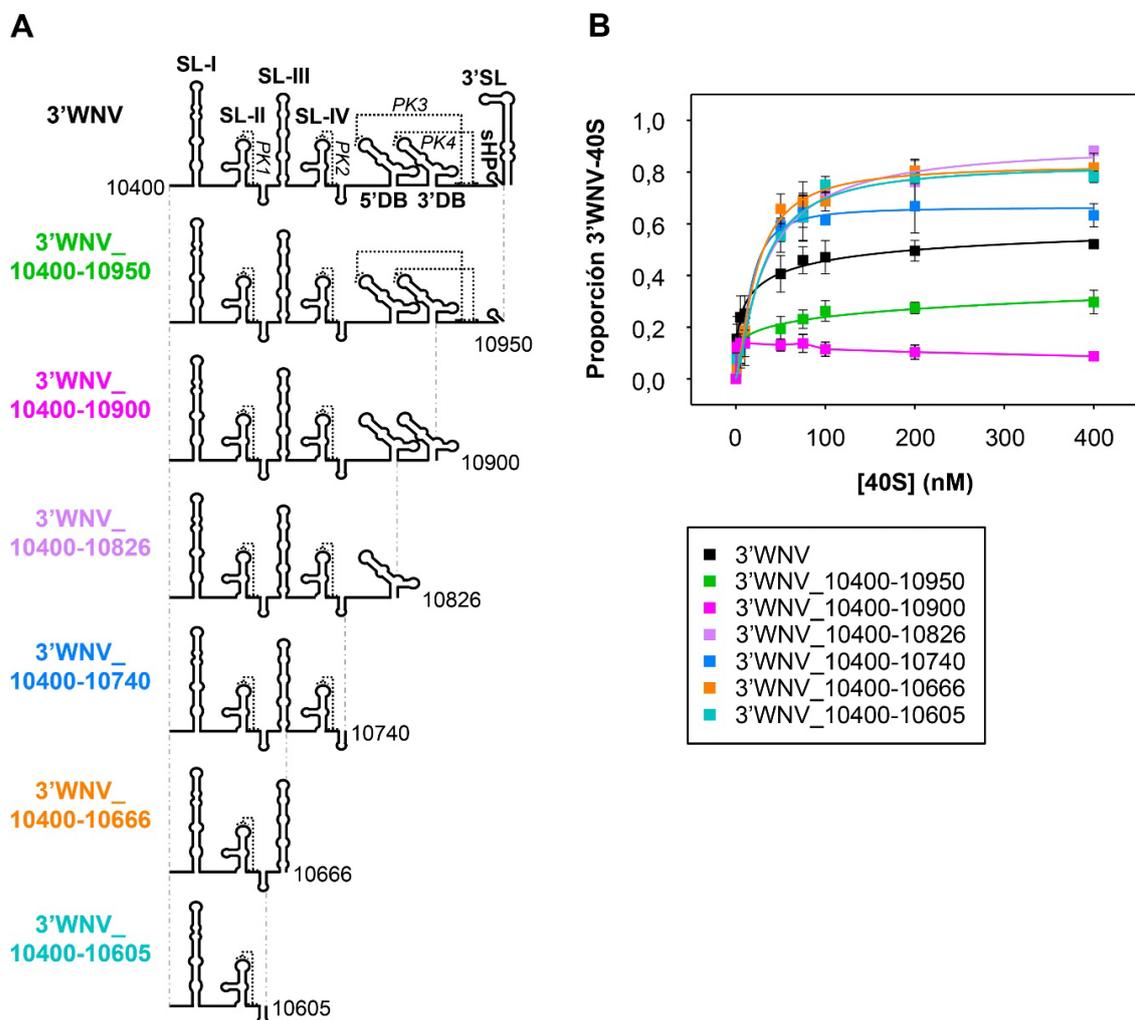


Figura R.5. En la 3' UTR de WNV existe un sitio de unión a 40S en 5' del elemento 5'DB. (A) Diagrama de la estructura secundaria teórica de las construcciones secuencialmente deletéreas por 3' obtenidas a partir de 3'WNV. Se indica la posición final de cada RNA según la numeración referida en la Figura I.6. (B) Representación de la proporción de complejo RNA-40S formado a concentraciones crecientes de 40S para las construcciones mostradas en (A). Los datos de unión se ajustaron a la Ec.1. Se representa la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Tabla R.2. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S de las construcciones deletéreas por 3' a partir de la Ec.1.

RNA	$B_{max} \pm DS$	$h \pm DS$	$K_d \pm DS$ (nM)
3'WNV	$0,658 \pm 0,085$	$0,468 \pm 0,086$	$17,522 \pm 11,521$
3'WNV_10400-10950	N.C.	N.C.	N.C.
3'WNV_10400-10900	N.C.	N.C.	N.C.
3'WNV_10400-10826	$0,910 \pm 0,048$	$1,130 \pm 0,132$	$34,207 \pm 5,195$
3'WNV_10400-10740	$0,663 \pm 0,030$	$1,661 \pm 0,348$	$15,594 \pm 2,803$
3'WNV_10400-10666	$0,827 \pm 0,029$	$1,376 \pm 0,144$	$22,559 \pm 2,695$
3'WNV_10400-10605	$0,830 \pm 0,046$	$1,329 \pm 0,197$	$28,653 \pm 4,820$

Los valores mostrados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DS). N.C., no calculado. h, coeficiente de Hill.

La delección del elemento 3'SL (RNA 3'WNV_10400-10950) provocó una disminución de la eficiencia de unión a 40S que impidió realizar el ajuste de los datos a la **Ec.1 (Tabla R.2)**, lo cual sugiere que dicho elemento es esencial para la interacción. La supresión adicional de sHP y de la secuencia ubicada en 3' del elemento 3'DB (RNA 3'WNV_10400-10900), implicada en la formación de los *pseudoknots* PK3 y PK4, anuló por completo la capacidad de la molécula para reclutar la subunidad ribosómica (**Figura R.5B**). La unión se recuperó en la construcción RNA 3'WNV_10400-10826 (**Figura R.5B**), con la delección del elemento 3'DB. El coeficiente de Hill obtenido para la construcción 3'WNV_10400-10826 es 1,130 (**Tabla R.2**), lo cual indica la ausencia de cooperatividad y podría sugerir la existencia de un único sitio de unión en 5' del elemento 3'DB. Del mismo modo, en los RNAs 3'WNV_10400-10740, 3'WNV_10400-10666 y 3'WNV_10400-10605, en los que la delección se extendió a los elementos 5'DB, SL-IV y CS3, y SL-III, respectivamente, se confirmó la ausencia de cooperatividad (**Tabla R.2**). Estos resultados apoyan la existencia de, al menos, dos sitios de unión a 40S en la 3' UTR de WNV y demuestran que uno de ellos se encuentra en 5' del elemento 5'DB.

Se generó una nueva batería de construcciones basadas en el RNA 3'WNV portadoras de **delecciones secuenciales de su extremo 5'** (**Figura R.6A (M.1.11.2.)**) para ensayar su capacidad de reclutar a la subunidad 40S, y así mapear los requerimientos para la unión de 40S por el extremo 5' de la región.

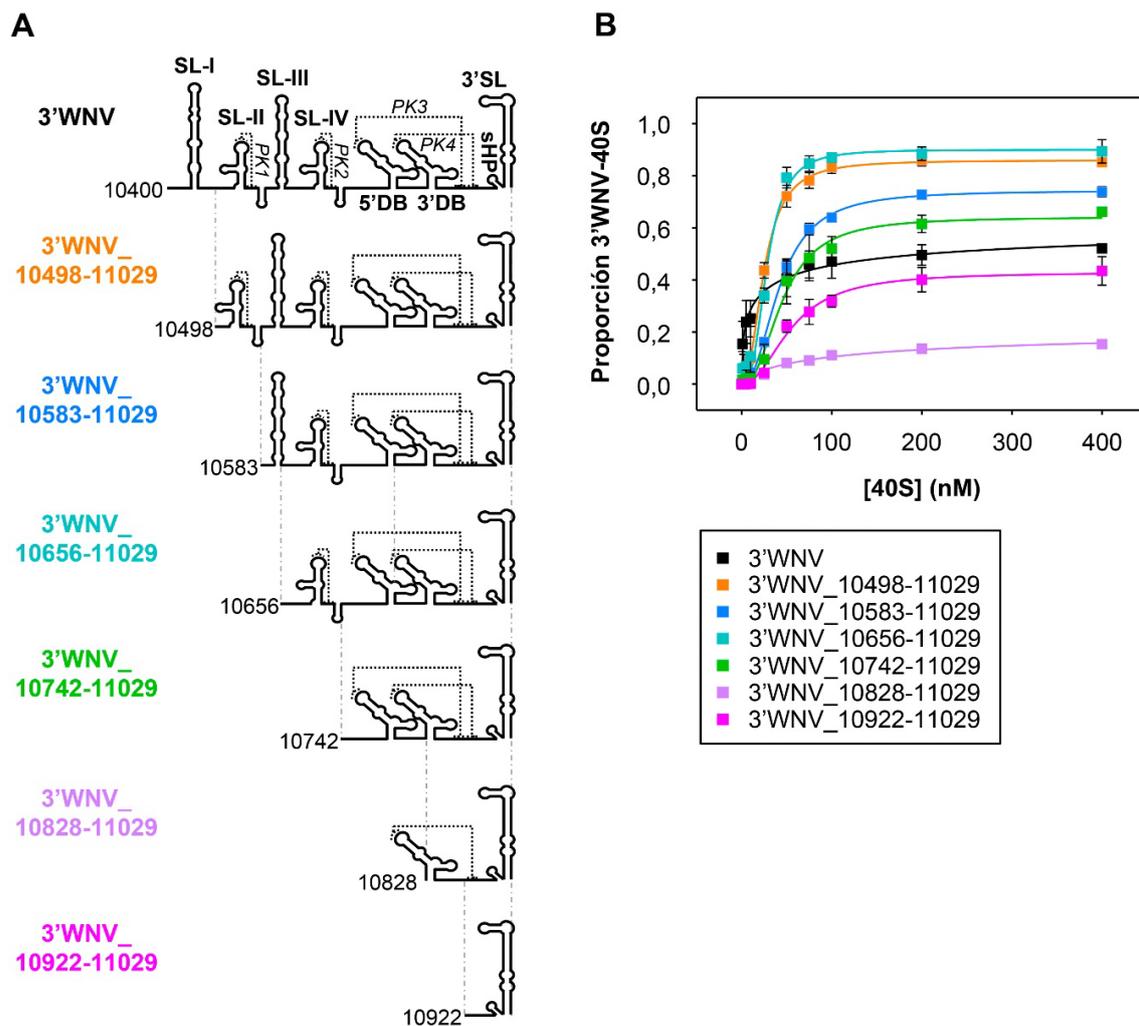


Figura R.6. La subunidad 40S se une a los elementos sHP-3'SL de la 3' UTR de WNV. **(A)** Diagrama de la estructura secundaria teórica de las construcciones secuencialmente deletéreas por 5' obtenidas a partir de 3'WNV. Se indica la posición de inicio de cada RNA según la numeración referida en la **Figura I.6**. **(B)** Representación de la proporción de complejo RNA-40S formado a concentraciones crecientes de 40S para las construcciones mostradas en (A). Los datos de unión se ajustaron a la **Ec.1**. Se representa la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

La delección del elemento SL-I (RNA 3'WNV_10498-11029) provocó un aumento en la eficiencia de unión (**Figura R.6B**) con respecto a 3'WNV y en el coeficiente de Hill (**Tabla R.3**), lo que indica cooperatividad positiva entre más de un sitio de unión. Este fenómeno se mantuvo en los mutantes 3'WNV_10583-11029, 3'WNV_10656-11029 y 3'WNV_10742-11029, en los que secuencialmente la delección se extiende a los elementos SL-II+PK1, SL-III y SL-IV+PK2 (**Figura R.6** y **Tabla R.3**). Esto sugiere que el elemento SL-I podría actuar como modulador del comportamiento de los sitios de reclutamiento de 40S presentes en la 3' UTR de WNV. La supresión adicional del elemento 5'DB junto con PK3 en el RNA 3'WNV_10828-11029

prácticamente anuló la interacción con la subunidad 40S (**Figura R.6B**), lo cual es consistente con la observación de que la eliminación de PK3 por su extremo 3' en el RNA 3'WNV_1400-10900 (**Figura R.5**) bloquea la unión a 40S. Este resultado apunta a que el *pseudoknot* PK3 juega un papel relevante en el reclutamiento de la subunidad ribosómica. El reclutamiento de 40S se recupera en el RNA 3'WNV_10922-11029 (**Figura R.6B**), constituido por los elementos sHP-3'SL. Esto señala la existencia de interacción con 40S en sHP-3'SL y está de acuerdo con la reducción de la eficiencia de unión observada al delecionar 3'SL (**Figura R.5B**, RNA 3'WNV_10400-10950).

Tabla R.3. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S de las construcciones deletéreas por 5' a partir de la Ec.1.

RNA	$B_{max} \pm DS$	$h \pm DS$	$K_d \pm DS$ (nM)
3'WNV	$0,658 \pm 0,085$	$0,468 \pm 0,086$	$17,522 \pm 11,521$
3'WNV_10498-11029	$0,860 \pm 0,005$	$2,270 \pm 0,062$	$24,626 \pm 0,349$
3'WNV_10583-11029	$0,744 \pm 0,010$	$2,279 \pm 0,121$	$42,012 \pm 1,152$
3'WNV_10656-11029	$0,900 \pm 0,030$	$2,808 \pm 0,542$	$28,081 \pm 2,085$
3'WNV_10742-11029	$0,642 \pm 0,040$	$2,339 \pm 0,278$	$45,521 \pm 2,677$
3'WNV_10828-11029	$0,021 \pm 0,046$	$0,734 \pm 0,132$	$117,071 \pm 73,534$
3'WNV_10922-11029	$0,430 \pm 0,015$	$2,139 \pm 0,257$	$55,298 \pm 3,364$

Los valores mostrados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DS). h, coeficiente de Hill.

Con objeto de confirmar la existencia de un sitio de unión a 40S en el **dominio II** (**Figura I.6**) se diseñó la construcción 3'WNV_10742-10950 (**Figura R.7A**) (**M.1.11.2.**), la cual incluye los elementos 5' y 3'DB junto con los *pseudoknots* PK3 y PK4. En los experimentos de unión, este RNA se comportó de forma similar a 3'WNV, mostrando una eficiencia de $\sim 60\%$ (**Figura R.7B**), lo cual confirma la existencia de un sitio de unión en el dominio II. Por otra parte, al comparar estos resultados con los obtenidos con los RNAs 3'WNV_10400-10900 y 3'WNV_10828-11029, los cuales carecen de la secuencia 3' de PK3 y PK4, y de 5'DB+PK3, respectivamente, se deduce que los elementos 5' y 3'DB, por sí mismos, no son suficiente para reclutar la subunidad ribosómica, sino que existe una dependencia

de la formación de PK3. Además, el hecho de que no se detecte formación de complejo en la construcción 3'WNV_10400-10900 (**Figura R.7**), pese a que se ha predicho la existencia de, al menos, otro sitio de unión a 40S en 5' de 5'DB, sugiere que la formación del doble *pseudoknot* regula el reclutamiento de la subunidad 40S a través de toda la 3' UTR. Este hecho correlaciona con lo que se ha descrito en HCV, en cuyo IRES se forma un doble *pseudoknot* (Berry et al., 2011; C. Wang et al., 1995) que actúa como una plataforma para el reclutamiento directo de 40S.

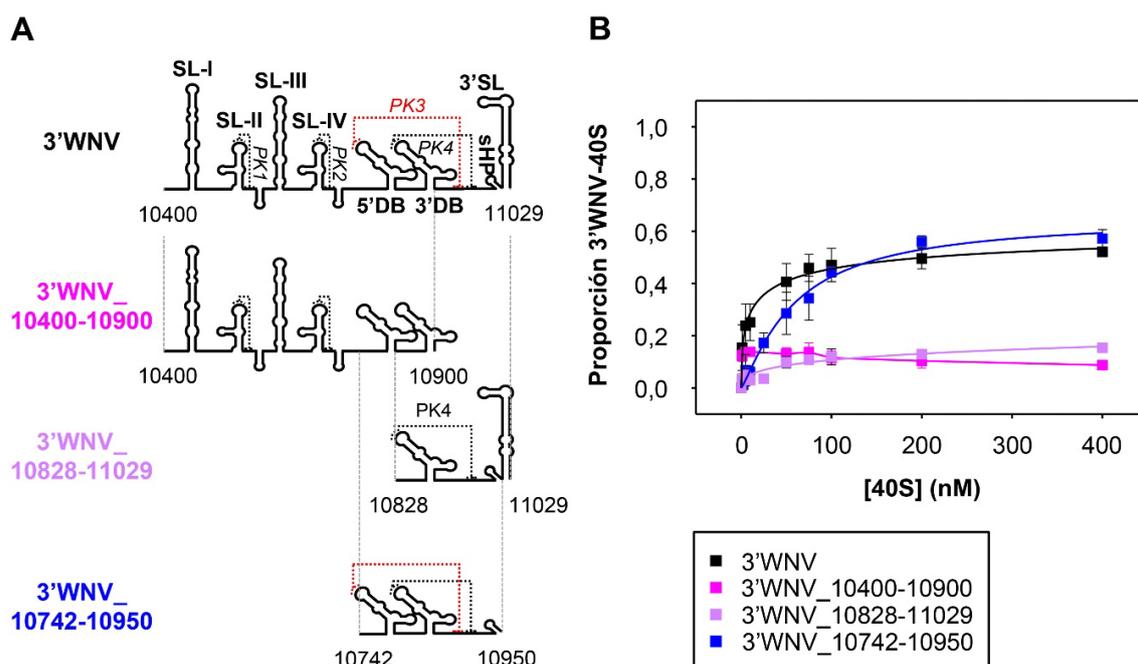


Figura R.7. El *pseudoknot* PK3 es crítico para la interacción 3' UTR-40S. (A) Diagrama de la estructura secundaria teórica de las construcciones portadoras de diferentes deleciones del dominio II de la 3' UTR de WNV ensayadas. Se indican la posición de inicio y final de cada RNA según la numeración referida en la **Figura I.6**. El *pseudoknot* PK3 se representa con una línea roja punteada. (B) Representación de la proporción de complejo RNA-40S formado a concentraciones crecientes de 40S para las construcciones mostradas en (A). Los datos de unión se ajustaron a la **Ec.1**. Se representa la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Además de estos resultados, cabe destacar que la presencia del elemento SL-III promueve un aumento significativo ($p < 0,05$) de la eficiencia de unión a concentraciones elevadas de 40S (**Figura R.8**), si bien su efecto sobre el valor K_d y el coeficiente de Hill es marginal (**Tabla R.3**). Esto se deduce de los resultados obtenidos con las construcciones 3'WNV_10742-11029, que incluye los dominios II y III, pero carece del dominio I; y 3'WNV_10583-11029, que contiene los elementos SL-III y SL-IV además de los dominios II y III (**Figura R.8A**).

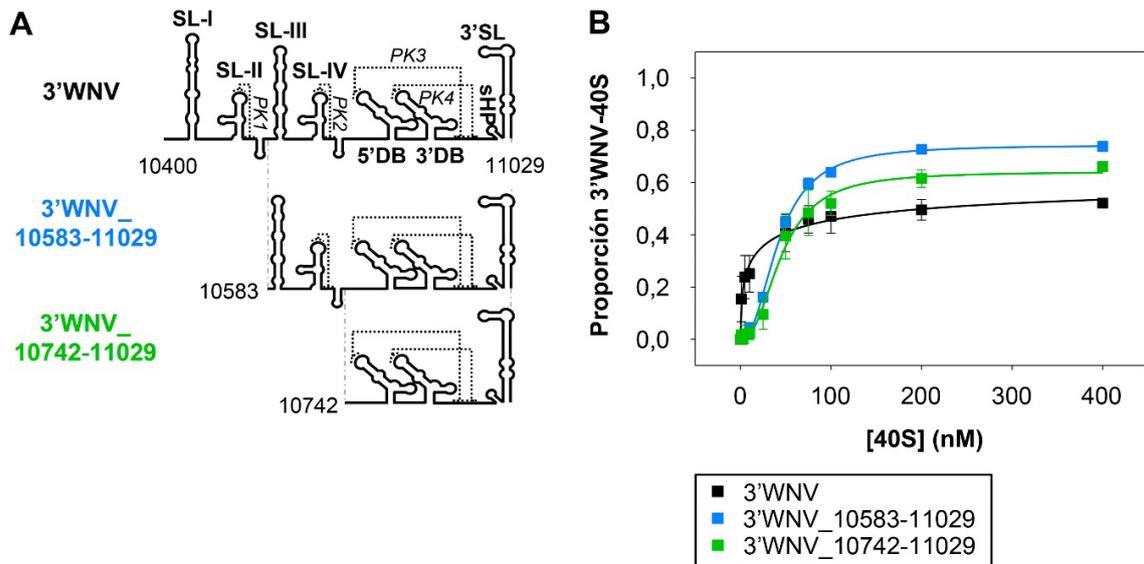


Figura R.8. La presencia de SL-III incrementa la eficiencia de unión a 40S, pero no la afinidad. (A) Diagrama de la estructura secundaria teórica de las construcciones analizadas. (B) Representación de la proporción de complejo RNA-40S formado para los RNAs mostrados en (A). Datos extraídos de la [Figura R.6](#).

R.4. LA 3' UTR DE WNV UNE LA SUBUNIDAD 40S A TRAVÉS DE SL-III Y DEL DOMINIO II

La localización de los sitios de unión a 40S en la 3' UTR se realizó mediante ensayos de inhibición de extensión de cebador (M.2.22.) sobre el RNA 3'WNV en ausencia y en presencia de un exceso de 25 veces de 40S. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo con un ODN marcado en su extremo 5' con ^{32}P . Los productos de cDNA resultantes se resolvieron mediante electroforesis desnaturalizante de alta resolución en paralelo con una reacción de secuenciación obtenida con el mismo ODN sobre el RNA en estudio. La unión de 40S provoca la detención de la retrotranscriptasa debido a un impedimento estérico, por lo que la comparación del patrón de bandas obtenido en presencia y en ausencia de la subunidad ribosómica permite identificar el sitio de unión (Figura R.9). Las paradas en la retrotranscripción originadas por la subunidad 40S se encuentran desplazadas 15–17 nt hacia el extremo 3' del RNA con respecto al sitio de unión (Pisarev et al., 2007). Los ensayos se llevaron a cabo con diferentes ODNs con objeto de mapear la 3' UTR completa.

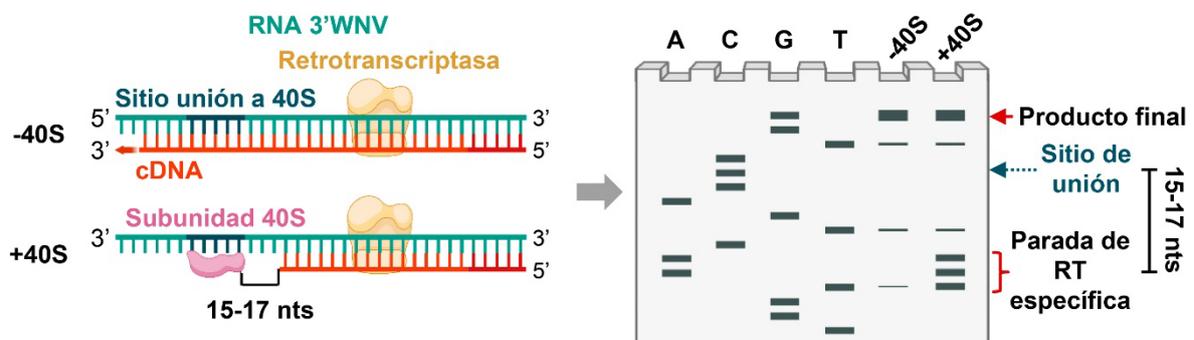
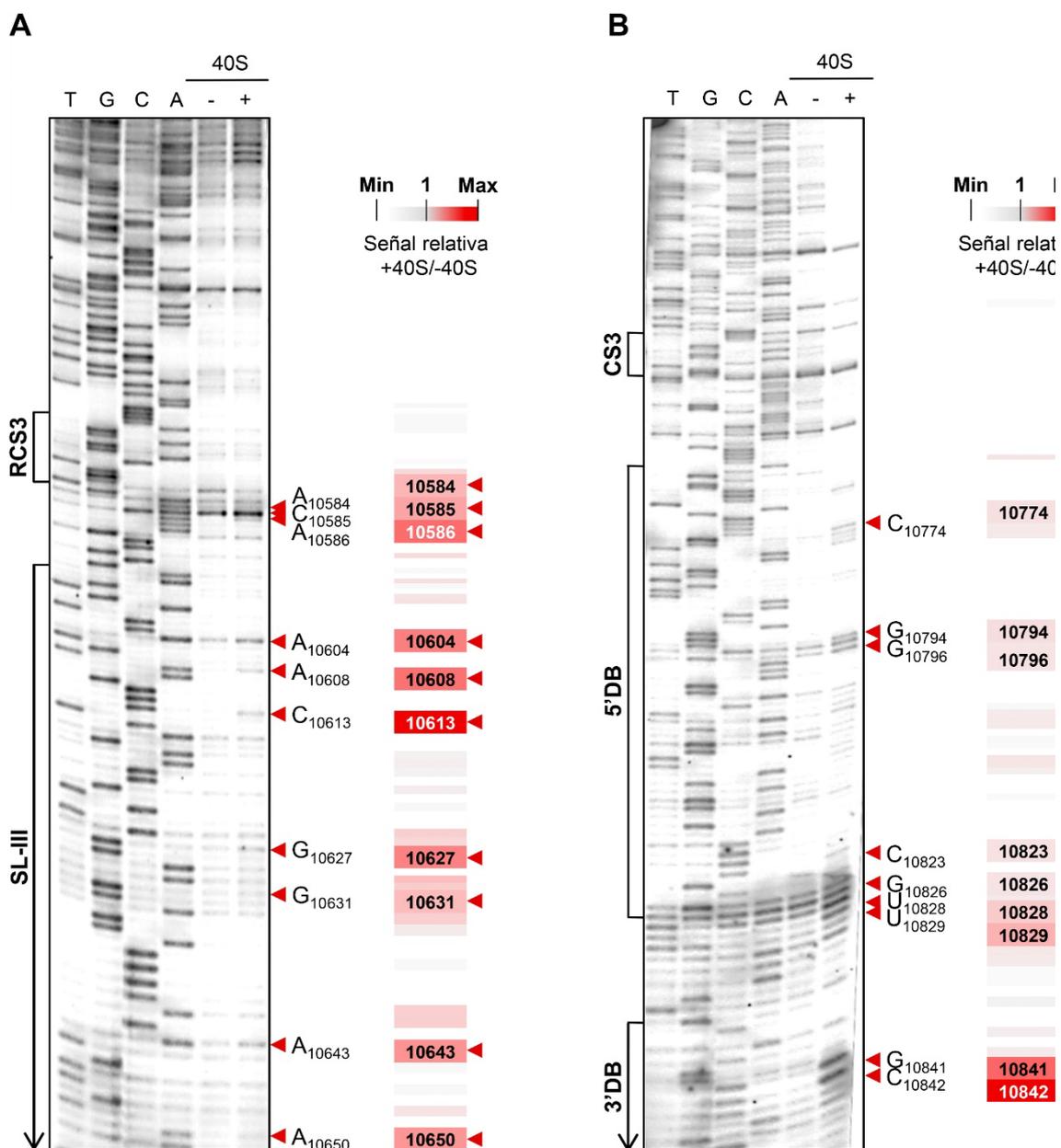


Figura R.9. Representación esquemática del ensayo de inhibición de extensión de cebador. El RNA 3'WNV se retrotranscribió utilizando un ODN marcado con ^{32}P en su extremo 5' en presencia y en ausencia de la subunidad 40S. Las moléculas de cDNA resultantes se encuentran, por tanto, marcadas radiactivamente, y presentan longitudes correspondientes a posiciones en los que se ha producido la retención de la retrotranscriptasa. Los productos de cDNA resultantes se resuelven mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución en condiciones desnaturalizantes junto con una reacción de secuenciación del RNA en estudio obtenida con el mismo ODN. La comparación del perfil de bandas en presencia (+40S) y ausencia (-40S) de 40S permiten identificar las paradas en la retrotranscripción (RT) específicas, originadas por impedimentos estéricos asociados a la unión de 40S. La subunidad 40S provoca paradas en la retrotranscripción 15–17 nt en 3' del sitio de unión en el RNA (Pisarev et al., 2007).

Se cuantificó la señal emitida por cada producto de extensión en presencia de 40S y se refirió al valor obtenido en la reacción control, en ausencia de la subunidad. Se estableció como valor umbral la señal correspondiente al valor Q_3 con el fin de identificar las paradas específicas de retrotranscripción, es decir, aquellas derivadas de los impedimentos estéricos asociados a la unión de 40S al RNA. La mayoría de estas paradas se encontraron repartidas a lo largo de los elementos SL-III (Figura R.10A) y 5'DB, así como en la base de 3'DB ($G_{10841}C_{10842}$) (Figura R.10B y C). También se detectó una parada específica en el nucleótido A_{10951} , el cual conecta los elementos sHP y 3'SL (Figura R.10D). No se observaron otras paradas específicas de 40S en el resto de la molécula (Figura R.10).



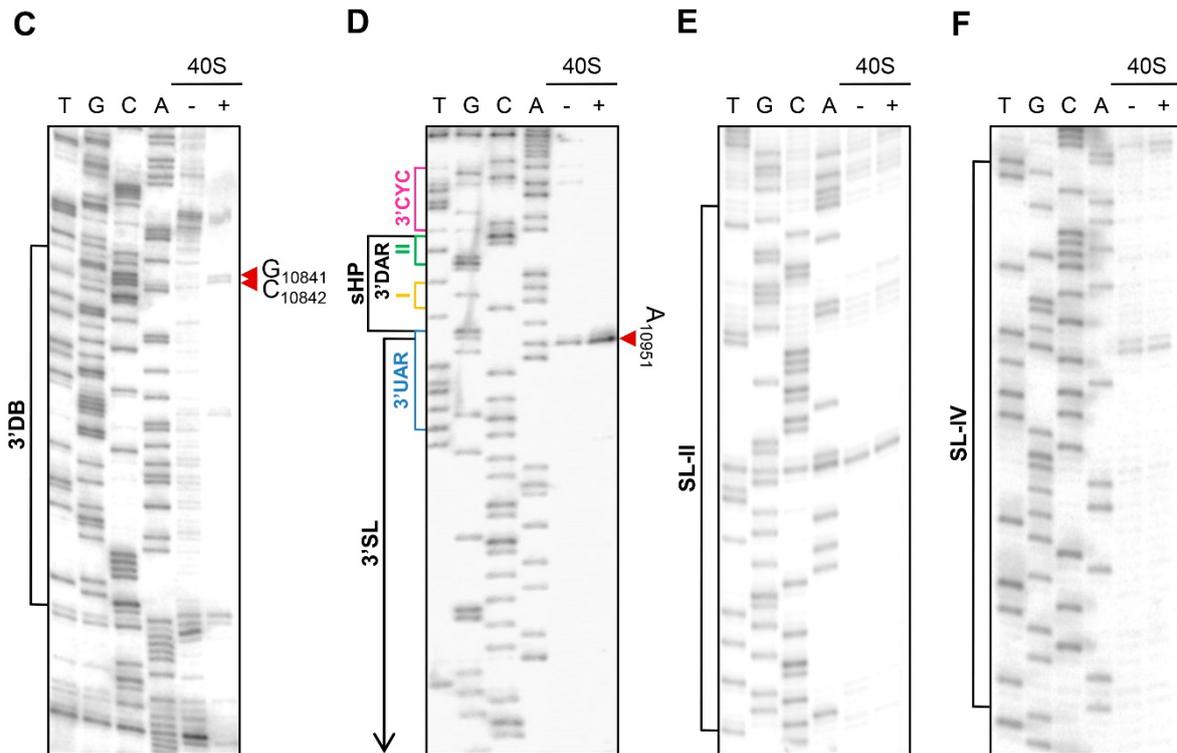


Figura R.10. La subunidad 40S es reclutada a través del dominio II y del elemento SL-III. Autorradiografías representativas de los ensayos de inhibición de extensión de cebador realizados sobre la construcción 3'WNV en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso molar de 25 veces de 40S. Las reacciones se realizaron utilizando los ODNs: as3'WNV-10681 para analizar RCS3 y SL-III (A) y SL-II (E); as3'WNV-10883, para CS3 y 5'DB (B), así como SL-IV (F); y as3'WNV, para 3'DB (C) y sHP-3'SL (D), marcados en su extremo 5' con ^{32}P (M.1.10.). Los productos de extensión se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de alta resolución. En paralelo se resolvieron las reacciones de secuenciación del RNA obtenidas con el mismo ODN con objeto de identificar las paradas de retrotranscripción. Se cuantificó la señal de cada producto de extensión en presencia de la subunidad 40S y se refirió a la obtenida en la reacción sin 40S. Los resultados de (A) y (B) se representan como un gradiente de color. Aquellos productos de cDNA de intensidad relativa superior al valor Q_3 del conjunto de datos se consideraron paradas específicas derivadas de la presencia de 40S y se indican con cabezas de flecha rojas. La numeración se refiere a las posiciones indicadas en la **Figura I.6**.

Estos resultados apoyan los datos obtenidos en los ensayos de unión (R.3.) y confirman la existencia de uno o más sitios de unión a la subunidad 40S en el dominio II. También permiten proponer al elemento SL-III como un candidato para la unión de 40S. El patrón disperso de las paradas específicas en el dominio II y en el elemento SL-III puede deberse al plegamiento tridimensional de la 3' UTR, que facilita que nucleótidos alejados dentro de la secuencia se ubiquen espacialmente próximos entre sí, formando parte del mismo sitio de unión.

Se trataron de asignar diferencias en la afinidad por 40S entre los sitios de unión detectados reduciendo el exceso molar de la subunidad ribosómica (RNA:40S 1:5 o 1:1). En ambos casos, se detectaron paradas específicas coincidentes con las detectadas previamente tanto en SL-III (Figura R.11A) como en 5'DB (Figura R.11B), si bien en SL-III se observó que el número e intensidad de las paradas eran inferiores a las detectadas a mayor concentración de 40S, lo que podría sugerir que SL-III presenta menos afinidad por la subunidad ribosómica.

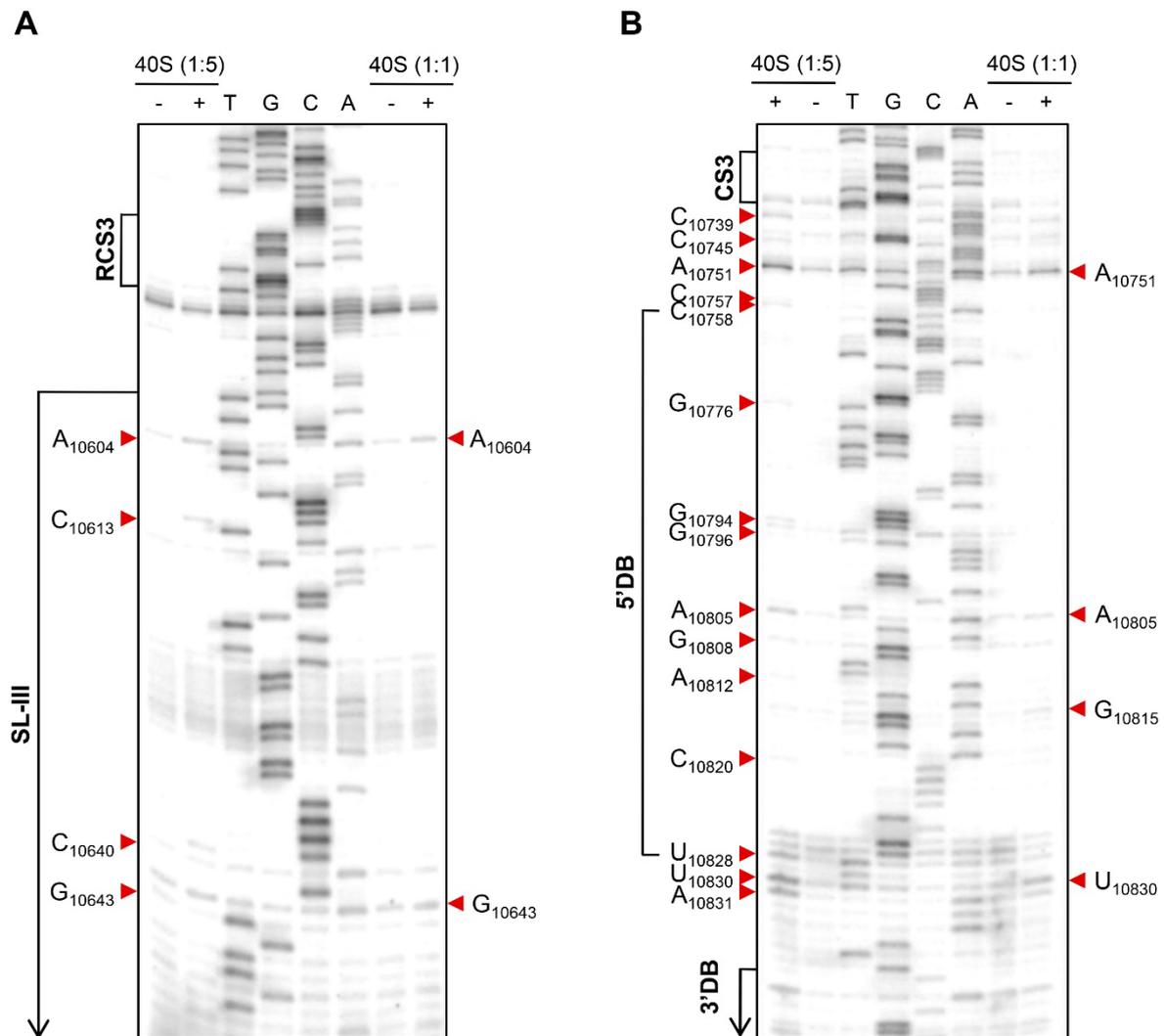


Figura R.11. La subunidad 40S se une a SL-III y 5'DB en condiciones equimolares. Autorradiografías representativas de los ensayos de inhibición de extensión de cebador realizados para analizar los elementos SL-III (A) y 5'DB (B). Los ensayos se realizaron como se describe en la Figura R.10 en ausencia (-) y presencia (+) de un exceso molar de 5 veces de subunidad 40S (1:5), así como en condiciones equimolares (1:1). Las paradas específicas se indican con cabezas de flecha rojas. La numeración corresponde con la indicada en la Figura I.6.

R.5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA INTERACCIÓN 3'WNV-40S

R.5.1. LA UNIÓN DE 40S INDUCE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN LA 3' UTR DE WNV

Se llevó a cabo un estudio mediante SHAPE-dif (M.2.23.1.) para evaluar las posibles consecuencias en la conformación de la 3' UTR derivadas de su interacción con 40S. Esta técnica permite el estudio de la estructura secundaria y terciaria del RNA mediante el mapeo químico de la molécula, el cual proporciona información sobre la reactividad de cada nucleótido. En la técnica de SHAPE convencional, el RNA se somete a tratamiento con alguno de los denominados “reactivos de SHAPE”, los cuales tienen en común su capacidad de reaccionar con el grupo 2'OH de nucleótidos flexibles e introducir una modificación covalente, la cual puede ser detectada como una parada de retrotranscripción. En el caso del SHAPE-dif, se aprovechan las preferencias singulares por distintas conformaciones electrónicas de los diferentes reactivos de SHAPE. En este estudio se utilizaron los reactivos NMIA y 1M6. NMIA tiene una vida media relativamente larga en solución, es decir, se hidroliza lentamente y, por tanto, reacciona preferentemente con nucleótidos que experimentan dinámicas electrónicas lentas. A menudo estos residuos se encuentran en una conformación C2'-endo, una estructura poco común que está implicada en el control conformacional en moléculas largas de RNA (Gherghe et al., 2008; Mortimer & Weeks, 2009). Por el contrario, 1M6 presenta un corto tiempo de hidrólisis y es capaz de reaccionar con las nucleobases que no están apiladas con otros residuos (Steen et al., 2012), algo poco frecuente (Leontis et al., 2006). Estas bases suelen encontrarse en estructuras del tipo *U-turn* o *tetraloops* GNRA. El cálculo del perfil de reactividad diferencial para ambos reactivos proporciona una imagen plana para la mayoría de las moléculas, salvo en aquellas posiciones en las que exista una implicación selectiva en distintos aspectos conformacionales de la molécula. En resumen, la aplicación de la metodología de SHAPE-dif permite identificar interacciones terciarias y no canónicas, por lo que ofrece una visión dinámica de la estructura más allá de las técnicas clásicas de mapeo estructural.

Se llevaron a cabo reacciones de unión del RNA 3'WNV con un exceso molar de 40S y se trataron con cada uno de los reactivos de SHAPE de forma independiente. En paralelo, se prepararon reacciones control en ausencia de reactivo. Se separaron los complejos 3'WNV-40S y el RNA libre mediante retención diferencial

en filtro y se retrotranscribieron utilizando el ODN NED-as3'WNV, el cual está marcado con el fluoróforo NED en su extremo 5' (**M.1.10.**). Los productos de cDNA se resolvieron por electroforesis capilar en paralelo con reacciones de secuenciación del RNA de estudio para identificar las posiciones modificadas. Se obtuvieron los valores de reactividad relativa normalizados en cada posición para NMIA y 1M6. A partir del conjunto de datos generado con ambos reactivos, tanto en el RNA libre como en el complejo, se obtuvo el valor de reactividad promedio (\bar{N}) y la desviación estándar (DS). En base a estos parámetros se definieron tres intervalos: $<\bar{N}+DS^2$ (<0,26), reactividad nula; $>\bar{N}+DS^2$ y $<\bar{N}+2\cdot DS$ (0,26–0,76), reactividad media; y, $>\bar{N}+2\cdot DS$ (>0,76), reactividad alta.

Los resultados del **análisis con NMIA** en el RNA 3'WNV libre (**Figura R.12**) fueron coherentes con el modelo de estructura secundaria actualmente aceptado para la región 3' UTR del virus. La molécula presenta un perfil de reactividad bajo, especialmente a lo largo del dominio I (**Figura R.12A**), lo cual sugiere un alto grado de compactación. Se detectaron posiciones discretas sensibles al tratamiento principalmente en SL-III (U₁₀₆₀₁C₁₀₆₀₂, A₁₀₆₁₆GAA₁₀₆₁₉, U₁₀₆₂₅C₁₀₆₂₆, A₁₀₆₃₀G₁₀₆₃₁, U₁₀₆₄₆ y G₁₀₆₄₈) (**Figura R.12B**). En el dominio II, se detectaron tramos reactivos en las regiones desapareadas que conectan los elementos 5' y 3'DB (U₁₀₈₂₈ y U₁₀₈₃₀AAAGU₁₀₈₃₅); así como en los elementos 3'DB y sHP (A₁₀₉₀₃CAAA₁₀₉₀₇, A₁₀₉₂₀, C₁₀₉₂₂ y A₁₀₉₃₂C₁₀₉₃₃). La baja reactividad de las secuencias implicadas en la formación de los *pseudoknots* PK3 y PK4 apoya su formación (**Figura R.12B**).

La unión a la subunidad 40S provocó cambios puntuales en el perfil de reactividad (**Figura R.12A**). Esto puede deberse al alto grado de compactación de la molécula, que impediría discernir entre los nucleótidos en una conformación poco flexible y las posiciones protegidas por la interacción con 40S. Sí destaca la disminución en la reactividad relativa NMIA en las posiciones A₁₀₈₁₄, en la secuencia RCS2; y A₁₀₉₀₃, en 3' de 3'DB (**Figura R.12A**). Estos cambios podrían explicarse por la unión directa de 40S a dichas posiciones, un argumento que se ve reforzado por los datos obtenidos en los ensayos de unión (**Figura R.8**) y de inhibición de extensión de cebador (**Figura R.10B y C**). Por otra parte, se observó un aumento en la reactividad en motivo de ciclación 3'CYC (C₁₀₉₂₅ y A₁₀₉₂₈UU₁₀₉₃₀). Este resultado sugiere que la unión de 40S provoca una reorganización en dicha región.

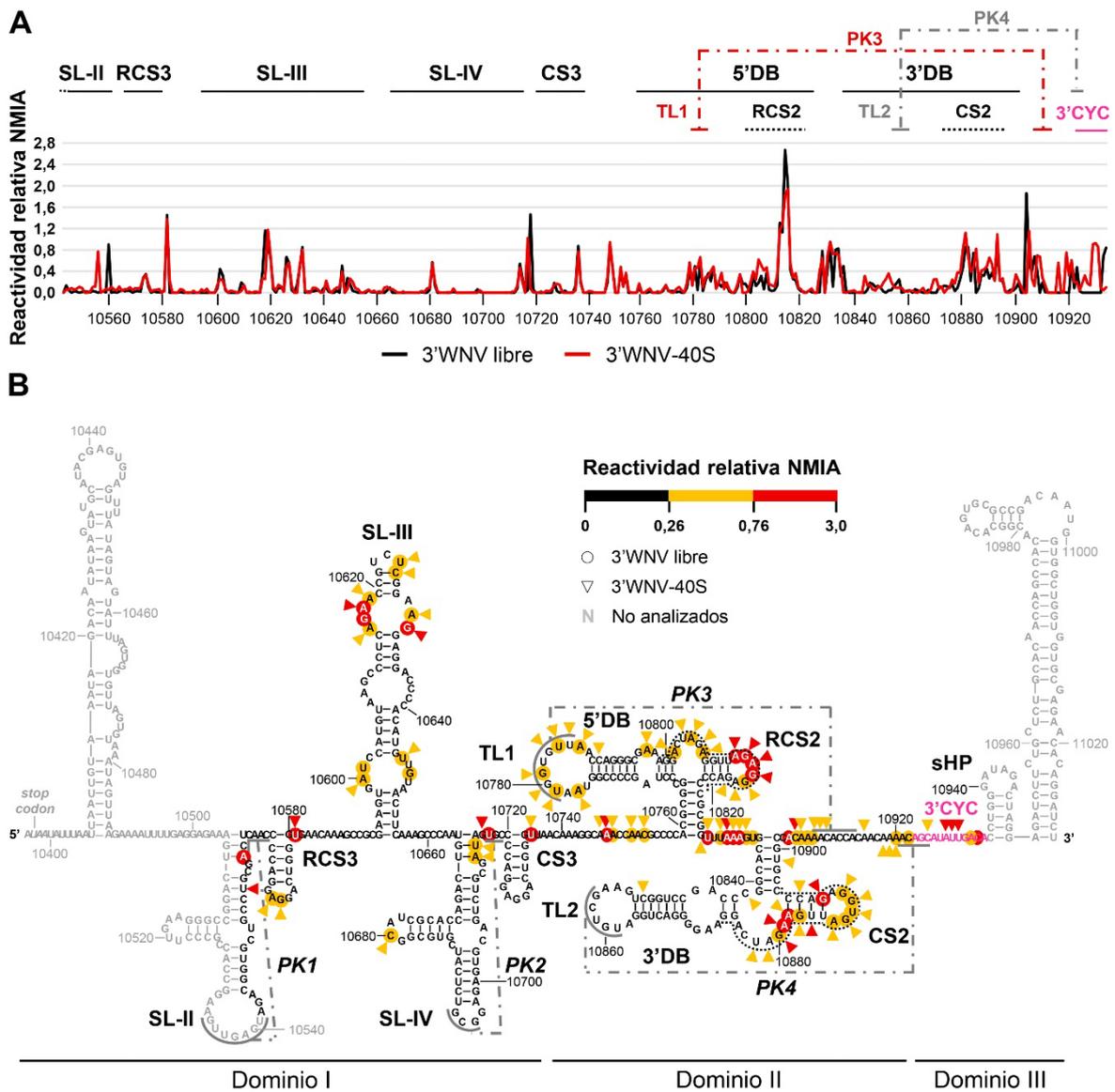


Figura R.12. El análisis SHAPE con NMIA revela que el reclutamiento de 40S induce cambios conformacionales en la 3' UTR de WNV. **(A)** Perfil de reactividad relativa NMIA en el RNA 3'WNV libre (línea negra) y en los complejos 3'WNV-40S (línea roja). En la parte superior se indica el elemento y/o motivo de secuencia al que pertenecen dichas posiciones. **(B)** Secuencia y estructura secundaria teórica de la 3' UTR de WNV incluyendo el resumen de los resultados de reactividad relativa NMIA. Los nucleótidos reactivos en el RNA 3'WNV libre se señalan con un círculo coloreado, y en el complejo, con una cabeza de flecha. El color del círculo y de la cabeza de flecha indica el grado de reactividad: en amarillo, reactividad media (0,26–0,76); y, en rojo, reactividad alta (>0,76). En gris se muestran las posiciones no analizadas. Las secuencias de ciclación están identificadas con el mismo código de colores que en la [Figura I.6](#).

El análisis con 1M6 ([Figura R.13](#)) del RNA 3'WNV libre confirmó las observaciones realizadas con NMIA que apoyan una elevada compactación del dominio I, según se deduce de su bajo perfil de reactividad ([Figura R.13A](#)). Nuevamente, las posiciones con reactividad alta (>0,76) se detectaron en el dominio II, principalmente

La unión de la subunidad 40S provocó la pérdida de reactividad a 1M6 en el elemento SL-III (U₁₀₆₀₁C₁₀₆₀₂, A₁₀₆₁₆GG₁₀₆₁₉, A₁₀₆₂₉A₁₀₆₃₀, C₁₀₆₄₀ y U₁₀₆₄₄) (**Figura R.13B**), lo cual apoya la existencia de un sitio de unión a 40S. Esta pérdida de reactividad se vio acompañada de un cambio en la dinámica electrónica que afecta a RCS3 (A₁₀₅₆₄, G₁₀₅₇₁AG₁₀₅₇₃ y A₁₀₅₇₅) y se en 5' de SL-III (C₁₀₅₉₁G₁₀₅₉₂, A₁₀₆₀₈, C₁₀₆₁₁CCU₁₀₆₁₄ y C₁₀₆₂₁GU₁₀₆₂₃) (**Figura R.13A**). En el dominio II, se aprecia un descenso en la reactividad en el elemento 5'DB (A₁₀₇₇₁GG₁₀₇₇₃, G₁₀₇₇₅G₁₀₇₇₆, A₁₀₇₇₈, G₁₀₈₀₀G₁₀₈₀₁, A₁₀₈₁₇G₁₀₈₁₈ y G₁₀₈₂₇) y la base 3' de 3'DB (C₁₀₈₉₆CGU₁₀₈₉₉) (**Figura R.13B**) que apoya la relevancia de este dominio en el reclutamiento de 40S.

Los datos de reactividad NMIA y 1M6 obtenidos se utilizaron para determinar el **perfil de SHAPE-dif** (Gherghe et al., 2008) del complejo 3'WNV-40S y del RNA libre. Se empleó el módulo de SHAPE-dif (Rice et al., 2014), mediante el cual se escalan los valores de reactividad para cada agente de SHAPE y se derivan mediante ventanas deslizantes de 25 nt. A los valores escalados de reactividad NMIA se le sustraen los valores escalados obtenidos para 1M6. En el perfil de SHAPE-dif resultante (**Figura R.14A**), los valores de reactividad positivos indican que el nucleótido reacciona de forma preferente con el reactivo NMIA y, por tanto, exhibe una dinámica electrónica lenta; mientras que los valores de reactividad negativos indican una dinámica electrónica rápida, y, por consiguiente, mayor tendencia a reaccionar con 1M6.

El perfil de SHAPE-dif en el RNA 3'WNV libre mostró una tendencia a la formación de hélices canónicas de tipo A, como se deduce de la baja reactividad a 1M6. El dominio I presenta una reactividad preferente por el NMIA, en SL-II, SL-III y CS3, lo que sugiere que estos elementos pueden regular la estructura global de la 3' UTR. En cambio, el dominio II reacciona de forma similar con ambos reactivos, lo cual descarta la preferencia por una conformación determinada (**Figura R.14A**). Únicamente se observó selectividad por 1M6 en posiciones aisladas localizadas en la secuencia implicada en la formación de PK2 (U₁₀₇₁₇) y en el motivo 3'CYC (A₁₀₉₃₂C₁₀₉₃₃) (**Figura R.14A**). Estos resultados sugieren la predisposición de estas posiciones para formar apilamientos, como se ha descrito en otros modelos, entre los que se encuentra el *riboswitch* de pirofosfato de tiamina de *E. coli* (Steen et al., 2012).

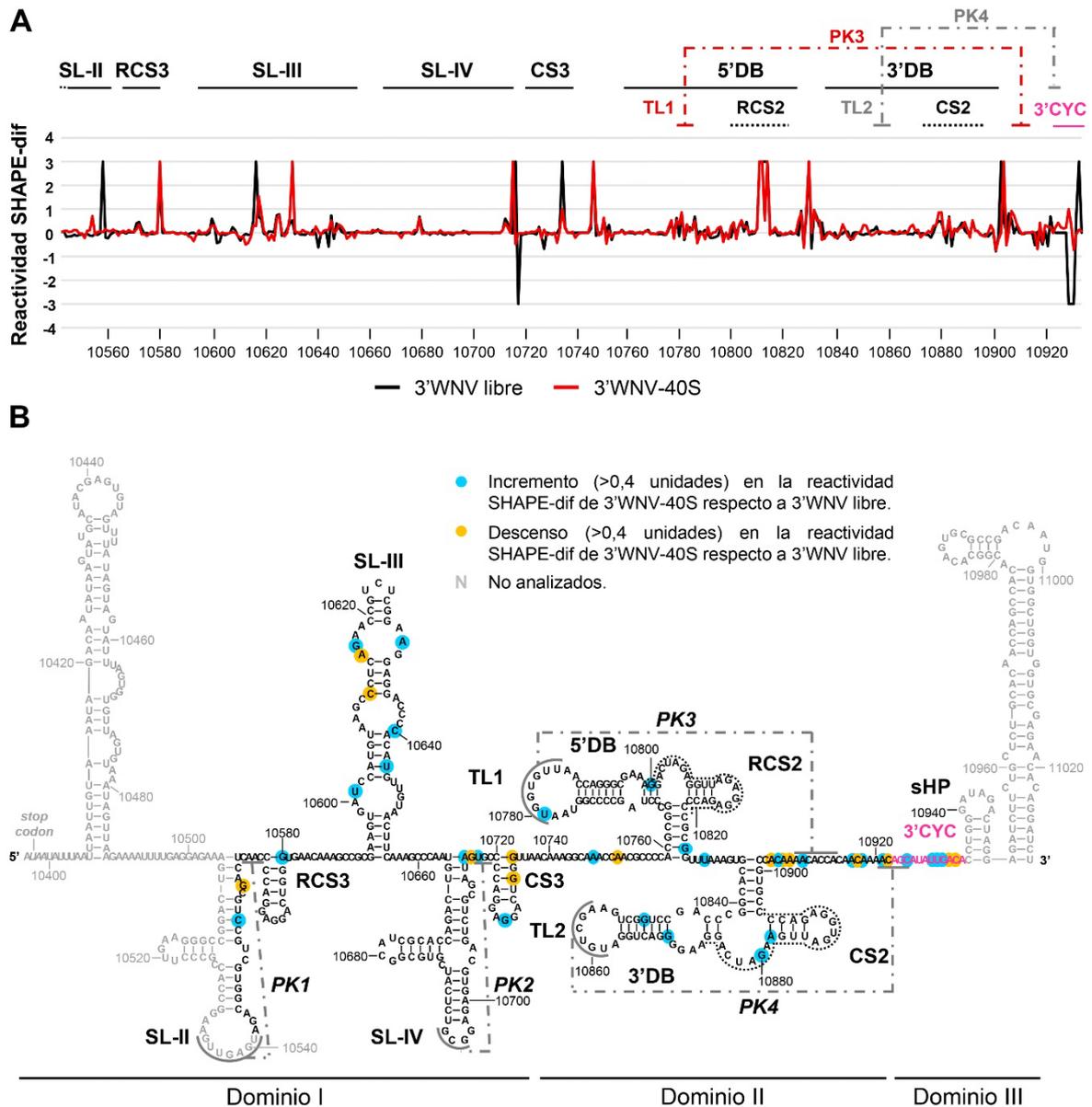


Figura R.14. La unión de 40S origina cambios conformacionales en la 3' UTR de WNV. (A) Perfil de SHAPE-dif en el RNA 3'WNV libre (línea negra) y en 3'WNV-40S (línea roja). En la parte superior se indica el elemento y/o motivo de secuencia al que pertenecen dichas posiciones. (B) Secuencia y estructura secundaria teórica de la 3' UTR de WNV incluyendo el resumen de los cambios (>0,4 unidades) que se producen en el perfil de SHAPE-dif del complejo 3'WNV-40S con respecto al RNA libre: en turquesa se indican los incrementos y, en amarillo, los descensos. Las secuencias de ciclación se indican con el mismo código de colores que en la [Figura I.6](#).

En el complejo 3'WNV-40S, la reactividad diferencial de las posiciones indicadas desapareció en algunas posiciones ([Figura R.14A](#)), apuntando a la existencia de cambios conformacionales como consecuencia del reclutamiento de 40S.

R.5.2. LA 3' UTR DE WNV ADQUIERE UNA CONFORMACIÓN ESPECÍFICA PARA UNIRSE A LA SUBUNIDAD 40S

El estudio anterior se combinó con el análisis de los requisitos estructurales de la interacción 3'WNV-40S mediante HMX con el reactivo de SHAPE NMIA (**M.2.23.2.**) (Homan et al., 2014). Estos experimentos constituyen el enfoque inverso a los ensayos de SHAPE, ya que permiten evaluar el efecto de la modificación química de cada nucleótido sobre la posterior unión de un ligando.

Para ello, el tratamiento con el agente químico se realiza en condiciones subsaturantes (~1 modificación por molécula) y desnaturizantes, de modo que las modificaciones se distribuyen de forma homogénea a lo largo de la molécula. El agente químico empleado fue el NMIA, el cual reacciona de forma eficiente con el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa a una temperatura elevada, lo cual permite que, teóricamente, todas las posiciones sean modificadas con la misma eficiencia. El RNA modificado se renaturalizó y se incubó con un exceso molar de la subunidad 40S. Los complejos 3'WNV-40S se fraccionaron mediante retención diferencial en filtro y se purificaron por elución pasiva (**M.2.23.2.**). Las modificaciones se detectaron como paradas en una reacción de retrotranscripción utilizando el ODN fluorescente NED-as3'WNV (**M.1.10.**). Los productos de cDNA resultantes se resolvieron por electroforesis capilar. Mediante el software *QuShape* (Karabiber et al., 2013) se determinó la reactividad relativa NMIA de cada nucleótido en el RNA libre y en el complejo (**M.2.23.2.**). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se calculó la diferencia en la reactividad relativa en ambas condiciones (**Figura R.15**).

Se detectaron requisitos estructurales para el reclutamiento de la subunidad 40S en nucleótidos pertenecientes a los elementos SL-II, SL-III, SL-IV y 3'DB (**Figura R.15**). Se comprobó que la unión de 40S a la 3' UTR de WNV se produce cuando la región adquiere una conformación relajada, lo que se refleja en un aumento significativo de la reactividad relativa NMIA en los complejos 3'WNV-40S respecto al RNA libre (**Figura R.15**). Estos resultados implican una relajación de las hélices que integran la estructura secundaria de la región, afectando principalmente a los elementos SL-III y 3'DB, y que podría modificar la arquitectura global de la 3' UTR.

Figura R.15. La unión de 40S a la 3' UTR requiere una conformación determinada de SL-II, SL-III y 3'DB (continuación). (B) Gráfico de densidad de color que representa las diferencias en los valores de reactividad relativa entre 3'WNV-40S y 3'WNV libre. (*) Diferencias significativas ($p < 0,05$). (C) Secuencia y estructura secundaria teórica de la 3' UTR de WNV incluyendo el resumen de los resultados de HMX. Los nucleótidos marcados con un círculo rojo muestran un aumento significativo en la reactividad relativa NMIA en el complejo 3'WNV-40S respecto al RNA libre; los nucleótidos señalados con un círculo gris indican posiciones que exhiben un aumento significativo en la reactividad en el RNA libre respecto al complejo. Las secuencias de ciclación están codificadas por colores como se indica en la **Figura I.6**. Los datos representados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Además, se detectaron posiciones discretas en SL-I, SL-II, SL-IV, RCS3, 5'DB y 3'SL cuya reactividad disminuyó significativamente en el complejo 3'WNV-40S (**Figura R.15**). Este resultado indica que la modificación de dichas posiciones interfiere con la unión. Esto podría deberse a que 40S interacciona directamente en esas posiciones. También puede ser consecuencia de los eventos de reorganización estructural en la 3' UTR mencionados anteriormente, lo que indicaría que dichos residuos permiten la estabilización de la conformación requerida para que se produzca el reclutamiento de 40S.

En conjunto, los datos estructurales obtenidos refuerzan la importancia de los elementos SL-III y 5'DB para el reclutamiento de la subunidad 40S y apuntan a la existencia de reordenamientos conformacionales en la 3' UTR de WNV que podrían ser necesarios para el control de la traducción viral.

R.6. IMPLICACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSÓMICAS LA UNIÓN DE 40S POR PARTE DE LA 3' UTR DE WNV

Continuando con la caracterización bioquímica de la interacción, se llevó a cabo una aproximación proteómica para identificar posibles proteínas ribosómicas implicadas en la unión directa a la 3' UTR de WNV. Para ello, se realizó un ensayo de transferencia de marca y las proteínas detectadas se aislaron para su identificación mediante LC-MS/MS (**M.2.24.**).

En primer lugar, se comprobó la formación del complejo 3'WNV-40S en las condiciones de ensayo. El RNA 3'WNV marcado internamente con ^{32}P a 5 nM se incubó con un exceso molar de 50 veces de 40S y se sometió a *cross-linking* mediante irradiación con luz UV. Los complejos resultantes se separaron del RNA libre por retención diferencial en filtro. En paralelo, las reacciones de unión se trataron con proteinasa K. La cuantificación de la señal radiactiva en los filtros reveló que el tratamiento con proteinasa K provocaba un descenso al 14% de la señal total detectada en el complejo sin tratar (**Figura R.16A**, comparar condiciones 3 y 4), lo cual confirma la formación de complejo entre 3'WNV y 40S. Paralelamente, se llevó a cabo el ensayo con la molécula RNA-100. En este caso, no se observó la formación de complejos (**Figura R.16B**), apoyando que la unión entre la 3' UTR de WNV y la subunidad 40S es específica.

Para el ensayo de transferencia de marca se incubaron 10 nM de 3'WNV marcado internamente con ^{32}P con un exceso molar 30 veces de 40S. Los complejos resultantes se fijaron mediante *cross-linking* con luz UV. Se trató con RNasa A y los productos de la digestión se resolvieron mediante SDS-PAGE (**M.2.16.2.**). La transferencia de marca permitió detectar proteínas de diferente peso molecular unidas a 3'WNV (**Figura R.16C**), aunque no se puede descartar la existencia de contactos adicionales con el rRNA 18S.

Las proteínas detectadas se aislaron y se identificaron mediante LC-MS/MS (**M.2.24.**). Éste análisis permitió identificar cinco proteínas ribosómicas que interaccionan con la 3' UTR de WNV: RPS2, RPS3, RPS8, RPS9 y RPS11 (**Figura R.16D**), las cuales se encuentran implicadas en la organización de los canales de entrada y salida del mRNA, así como en la constitución de los complejos de inicio de la traducción (**Tabla R.4**). El hecho de que todas ellas participen como

componentes estructurales del ribosoma, refuerza la idea de su implicación en la interacción de la 3' UTR de WNV con la subunidad 40S.

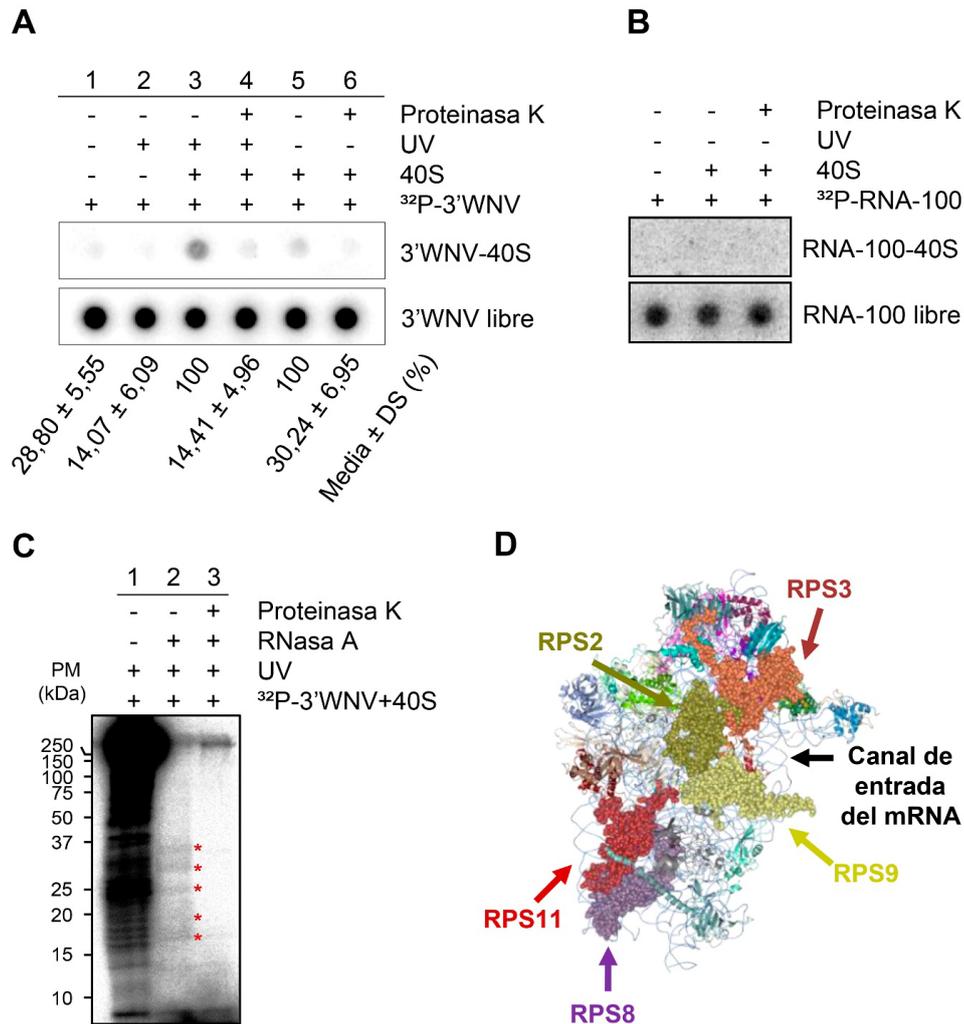


Figura R.16. La interacción 3' UTR WNV-40S implica la participación de proteínas ribosómicas. (A) Autorradiografía representativa de un ensayo de formación de complejo 3'WNV-40S. El RNA 3'WNV marcado internamente con ³²P se incubó con un exceso molar de 30 veces de 40S y se sometió a *cross-linking* con luz UV. Las reacciones de unión se trataron con proteinasas K. Los complejos RNA-proteína se separaron del RNA libre mediante retención diferencial en filtro y se cuantificó la señal procedente de ambos. El porcentaje de complejo 3'WNV-40S en cada condición de reacción se cuantificó y se refirió al obtenido en ausencia de tratamiento con proteinasas K. (B) Autorradiografía representativa de un ensayo de unión a 40S con la molécula RNA-100. (C) Autorradiografía del gel correspondiente al ensayo de transferencia de marca. El RNA 3'WNV marcado internamente con ³²P se incubó con un exceso molar de 40S y se sometió a *cross-linking* con luz UV. Como control, las reacciones se trataron con RNasa A (carril 2) o con RNasa A y proteinasas K (carril 3). Todas las reacciones se resolvieron mediante SDS-PAGE y las proteínas marcadas obtenidas tras el tratamiento con RNasa A se purificaron para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. Las proteínas marcadas se indican con un asterisco rojo a la derecha del carril 2. (D) Localización de las proteínas ribosómicas identificadas dentro de la estructura cristalina de la subunidad 40S (PDB [YKZZ](#)). El rRNA se representa en azul hielo; las proteínas ribosómicas se muestran como cintas de diferentes colores, salvo RPS2, RPS3, RPS8, RPS9 y RPS11, identificadas mediante LC-MS/MS, las cuales se representan como esferas coloreadas.

Tabla R.4. Proteínas ribosómicas identificadas por LC-MS/MS que interactúan directamente con la 3' UTR de WNV.

Proteína	Péptidos	Función	Referencia
RPS2	16	Ensamblaje de la subunidad 40S. Fidelidad de la traducción. Procesamiento nucleolar del rRNA pre-18S.	(Bernstein et al., 2004; Pisarev et al., 2008)
RPS3	35	Reorganización estructural de la subunidad 40S durante el ensamblaje del complejo de preiniciación. Actividad helicasa durante la traducción. Actividad endonucleasa para la reparación del DNA. Regulación de la dinámica del huso durante la mitosis. Apoptosis. Regulación de la transcripción.	(Gao & Hardwidge, 2011; Graifer et al., 2014; Havkin-Solomon et al., 2023; Jang et al., 2004; Jang et al, 2012a, 2012b; S. B. Lee et al., 2010; Sanford et al., 2019; Seong et al., 2012)
RPS8	14	Unión al rRNA 18S y ensamblaje de la subunidad 40S.	(Mundus et al., 1993; Yu et al., 2005)
RPS9	13	Biogénesis del ribosoma. Terminación de la traducción.	(Kim et al., 2003; Lindström & Zhang, 2008; Pnueli & Arava, 2007)
RPS11	6	Ensamblaje de la subunidad 40S. Niveles elevados en ciertos tipos de tumor.	(Nadano et al., 2001; Yong et al., 2015; C. Zhou et al., 2020)

R.7. LA UNIÓN DE LA SUBUNIDAD 40S POR LA 3' UTR ESTÁ INFLUIDA POR EL EXTREMO 5' DEL GENOMA VIRAL

Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre la 3' UTR de WNV en presencia del extremo 5' del genoma viral (RNA m⁷G-WNV; **Figura R.17A**) para estudiar su posible influencia sobre el reclutamiento de la subunidad 40S. Estos ensayos se realizaron utilizando diferentes excesos de 40S.

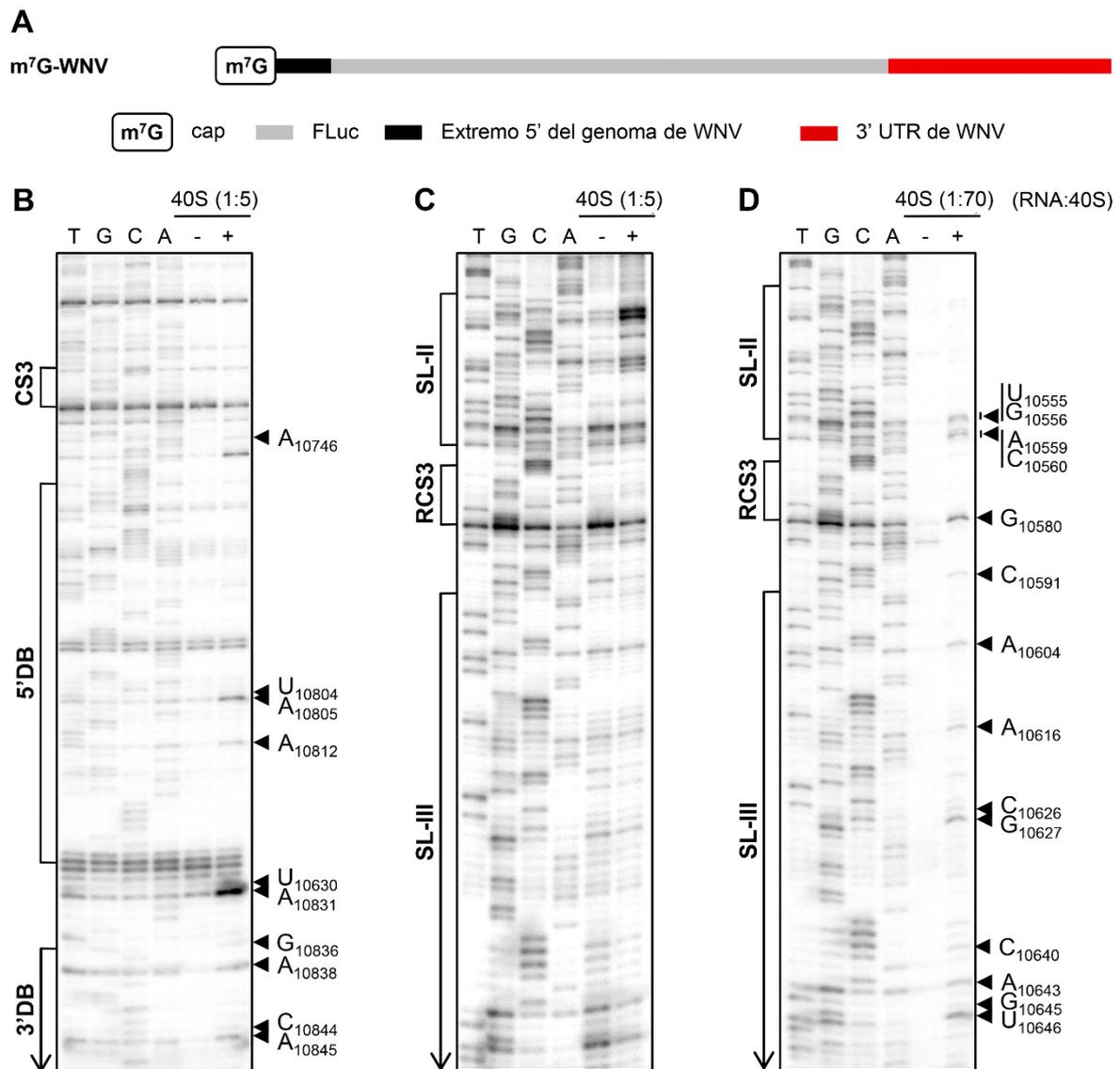


Figura R.17. El sitio de unión a 40S de alta afinidad se localiza en el dominio II. (A) Esquema del RNA m⁷G-WNV. **(B–D)** Autorradiografías representativas de los ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre el RNA m⁷G-WNV en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso molar de 5 veces (1:5) o 70 veces (1:70) de 40S para analizar los elementos SL-III (B y C) y 5'DB (D). El ensayo se realizó como se describe en la **Figura R.10**. Las paradas de retrotranscripción específicas se indican con cabezas de flecha negras. Las líneas verticales indican paradas en más de un nucleótido por cada cabeza de flecha.

A un exceso molar de 5 veces de 40S se detectaron paradas específicas en los elementos 5' y 3'DB (**Figura R.17B**), si bien éstas no fueron coincidentes con las detectadas en ausencia del extremo 5' del genoma, ya que se observó un desplazamiento de las mismas hacia el extremo 3' (comparar **Figuras R.10B y R.17B**). En SL-III no se observaron paradas específicas en estas condiciones (**Figura R.17C**) y fue necesario aumentar el exceso de 40S hasta 70 veces para detectarlas (**Figura R.17D**). En este caso, sí se observó coincidencia en algunas paradas con las obtenidas previamente en ausencia del extremo 5' del genoma (**Figura R.10A**). Estos resultados confirman las observaciones previas (**Figura R.11**) y apoyan la hipótesis según la cual el dominio II opera como sitio de interacción de alta afinidad para la subunidad 40S, mientras que SL-III desempeñaría un papel aceptor sólo cuando la unión a través de 5'DB estuviese saturada.

Por otro lado, el hecho de que las paradas específicas detectadas en el elemento SL-III y en el dominio II no sean coincidentes con las identificadas en el RNA 3'WNV hace suponer que la presencia del extremo 5' del genoma influye sobre la unión de la 3' UTR a la subunidad 40S, sugiriendo la existencia de una comunicación entre ambos extremos. Los ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre el RNA m⁷G-WNV también revelaron paradas específicas en la mitad 5' de la base del elemento 3'SL y en el lazo de sHP, solapando parcialmente con las secuencias de ciclación 3'UAR (U₁₀₉₅₄CUU₁₀₉₅₇, U₁₀₉₅₉, U₁₀₉₆₂C₁₀₉₆₃), 3'DAR II (G₁₀₉₄₅G₁₀₉₄₆) y 3'CYC (A₁₀₉₃₄) (**Figura R.18B**). Dichas paradas son estrictamente dependientes del extremo 5' (comparar **Figuras R.10 y R.18B**). Con el fin de confirmar la influencia de 5' sobre la interacción entre la 3' UTR y la subunidad 40S, se realizó el ensayo en ausencia del extremo 5' del genoma de WNV (RNA m⁷G-FLuc-3'WNV) (**Figura R.18A**). Al igual que en el RNA 3'WNV (**Figura R.10D**), no se detectaron paradas específicas en sHP-3'SL (**Figura R.18D**).

Se llevó a cabo el ensayo de inhibición de extensión de cebador sobre el RNA WNV, sin cap (**Figura R.18C**), para valorar el papel de este grupo en la unión de la 3' UTR a la subunidad 40S. Las paradas específicas detectadas en sHP-3'SL coincidieron con las previamente observadas en presencia de cap (G₁₀₉₄₅G₁₀₉₄₆, U₁₀₉₅₄CU₁₀₉₅₆, U₁₀₉₅₉), si bien, cualitativamente, su intensidad fue menor (**Figuras R.18B y C**).

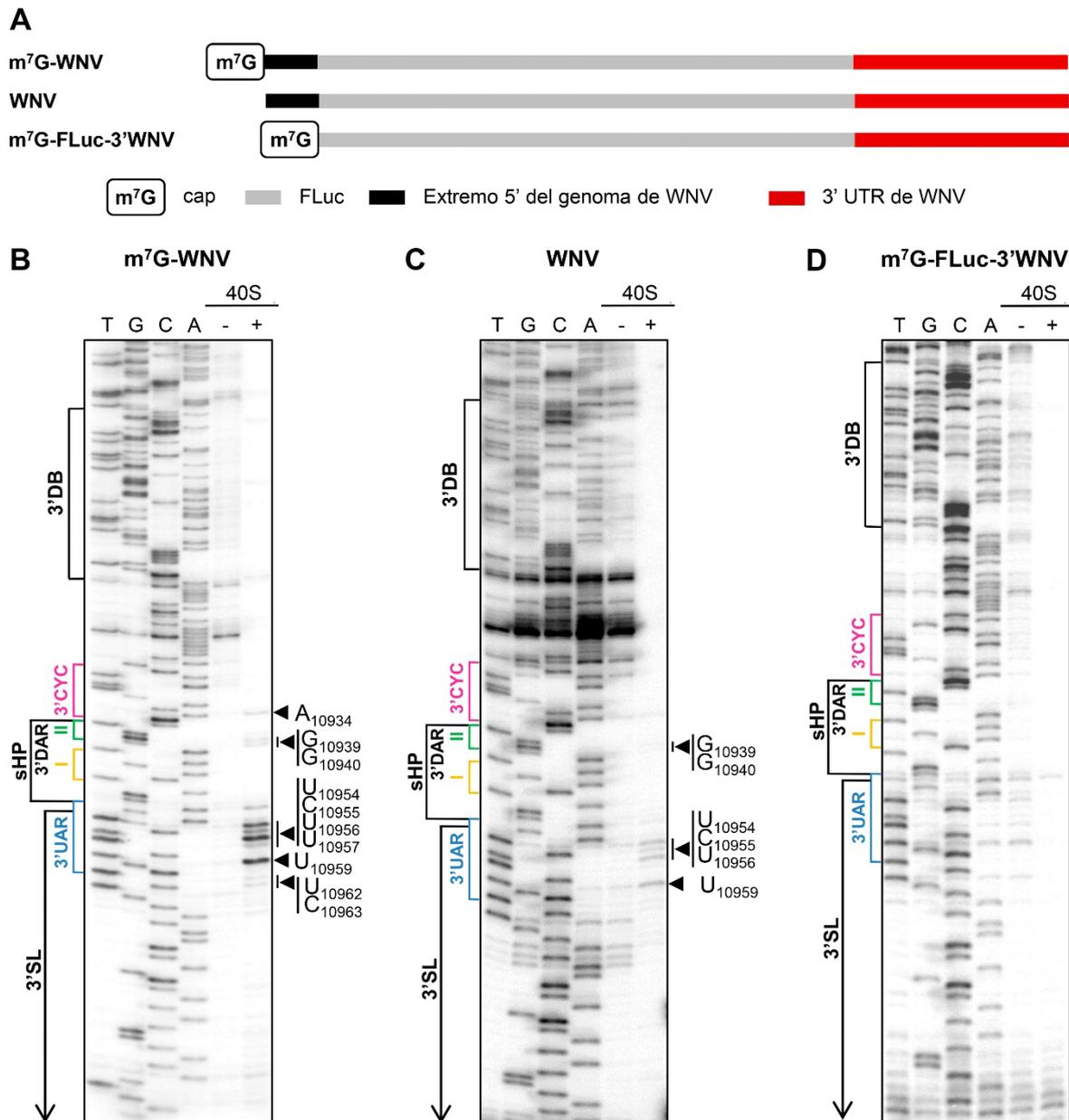


Figura R.18. Implicación de sHP-3'SL en la unión de la subunidad 40S. (A) Esquema de los RNAs utilizados en el ensayo de inhibición de extensión de cebador. (B–D) Autorradiografías representativas de los experimentos sobre el RNA m⁷G-WNV (B), WNV (C) y m⁷G-FLuc-3'WNV (D) en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso molar de 70 veces de 40S. Las paradas específicas se determinaron como se indica en la **Figura R.10** y se señalan con cabezas de flecha negras. Las líneas verticales indican paradas en más de un nucleótido por cada cabeza de flecha. Las secuencias de ciclación están marcadas con el mismo código de colores que en la **Figura I.6**.

En conjunto, estos resultados (**Figura R.19**) permiten concluir que la presencia del extremo 5' del genoma de WNV influye sobre la unión de la subunidad 40S por parte de la 3' UTR y apuntan a la existencia de una comunicación entre ambos extremos del RNA viral.

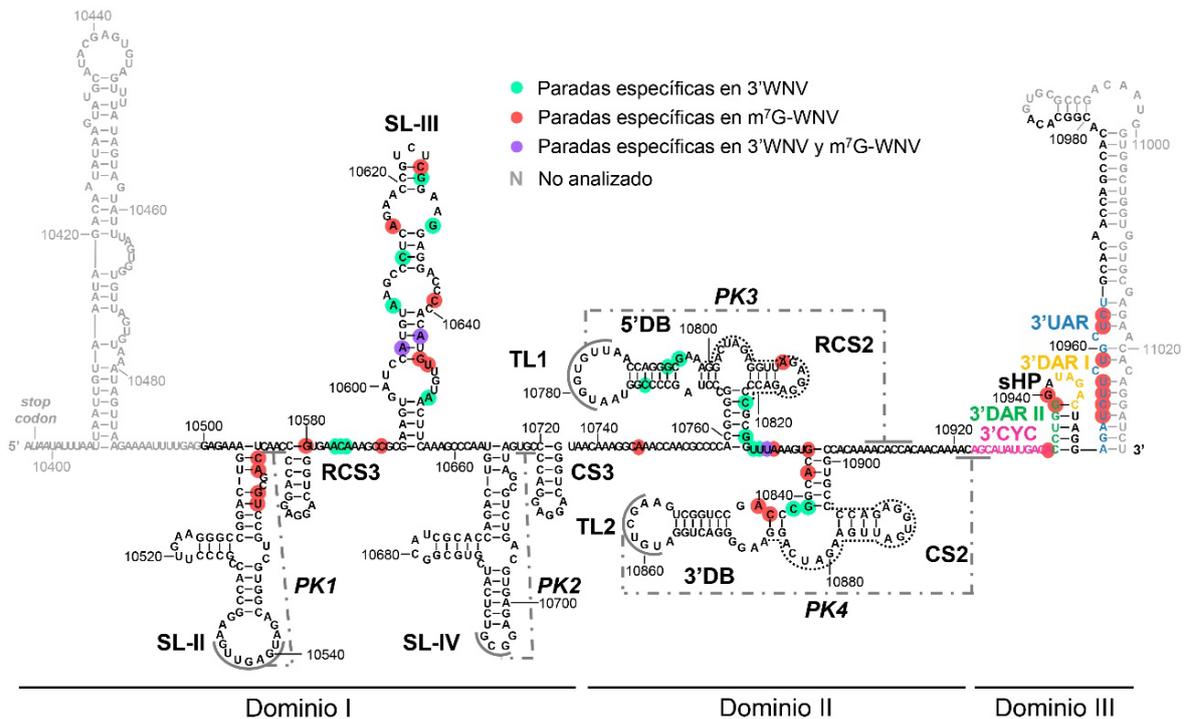


Figura R.19. El reclutamiento de 40S por la 3' UTR de WNV está influido por la presencia del extremo 5' del genoma. Secuencia y estructura secundaria de la 3' UTR de WNV incluyendo el resumen de los análisis de inhibición de extensión de cebador en presencia y en ausencia del extremo 5' del genoma. Las paradas específicas detectadas en ausencia del extremo 5' (RNA 3'WNV, **Figura R.10**) se indican con un círculo relleno de color verde; las obtenidas en presencia del mismo (RNA m⁷G-WNV, **Figuras R.17 B y D**, y **R.18 B**), en rojo; y las comunes, en violeta. Las secuencias de ciclación se muestran con el código de color descrito en la **Figura I.6**.

Para determinar si la unión de 40S por el extremo 5' del genoma forma parte de la comunicación descrita entre los extremos del RNA viral, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre la región 5' en presencia y en ausencia de la 3' UTR, con los RNAs m⁷G-WNV y m⁷G-WNV_Δ3'UTR, respectivamente (**Figura R.20A**). El ODN utilizado, GL-2 (Promega) (**M.1.10.**), hibrida en el extremo 5' de la secuencia codificante de FLuc. En ausencia de la 3' UTR, se identificaron paradas específicas en 5' de la secuencia 5'CYC. La presencia de la 3' UTR provocó un desplazamiento de estas paradas hacia 3', así como la aparición de nuevos productos (**Figura R.20B y C**), lo que se puede interpretar como que la 3' UTR de WNV favorece la estabilización de la unión del extremo 5' del genoma a la subunidad 40S.

Este resultado sugiere que la 3' UTR contribuye al posicionamiento de 40S en el extremo 5' del RNA viral y apoya la existencia de una comunicación entre los extremos del genoma de WNV en presencia de la subunidad 40S.

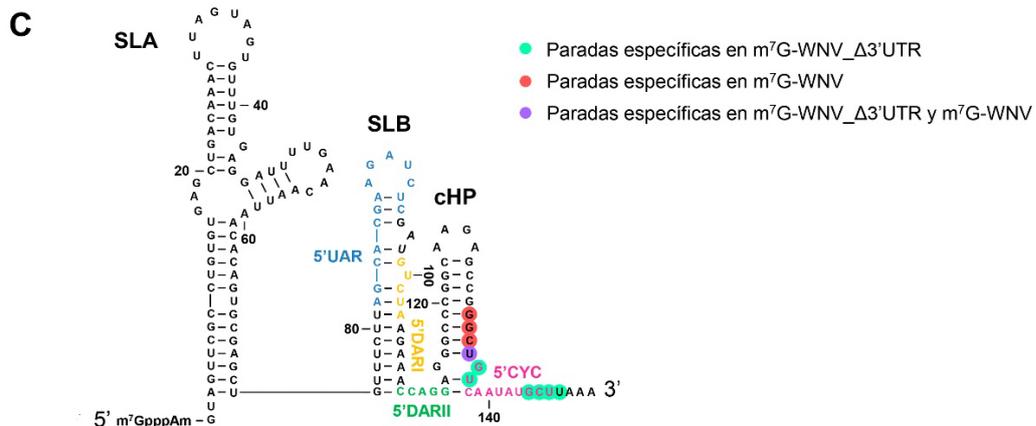
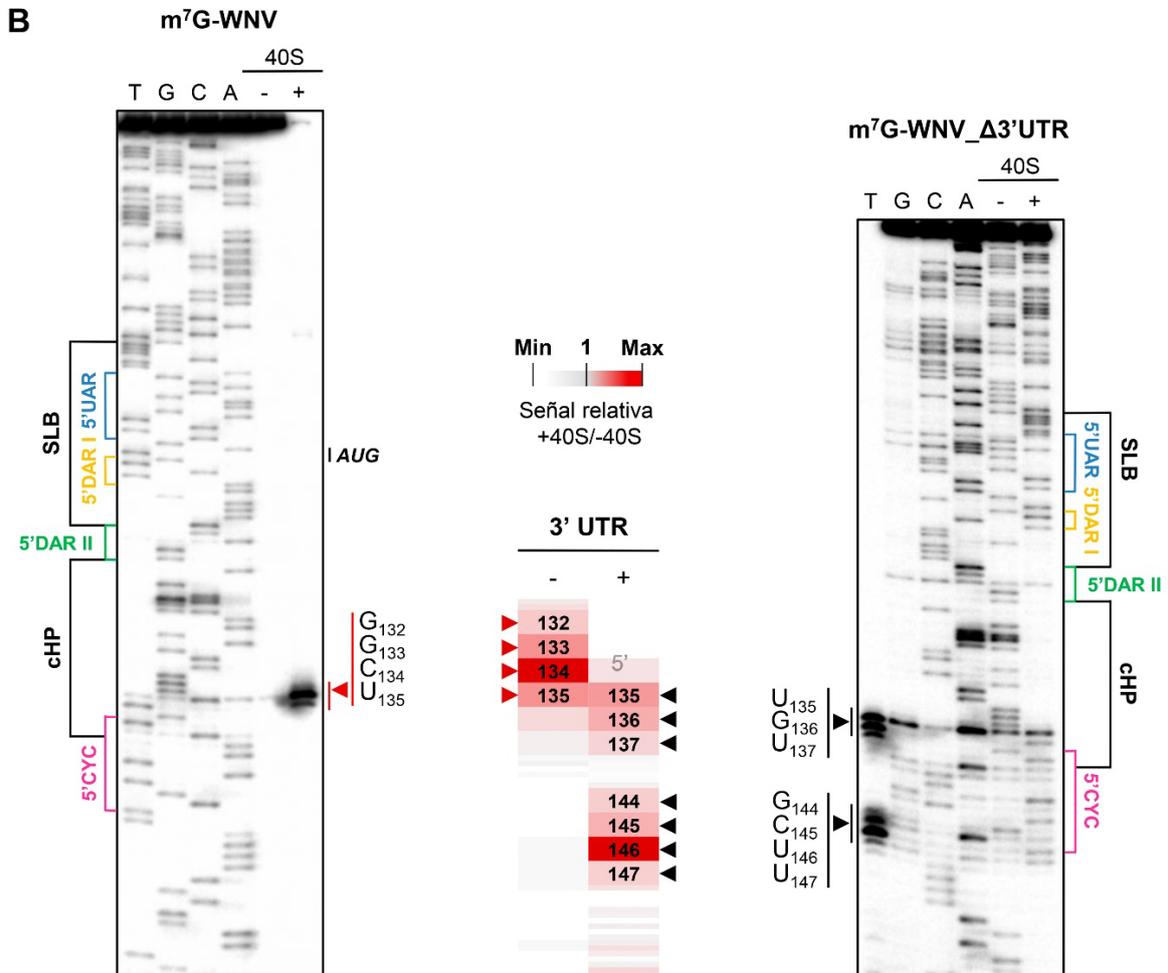
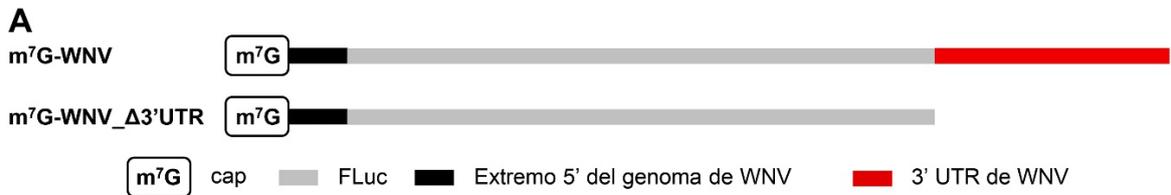


Figura R.20. La 3' UTR contribuye al posicionamiento de 40S en el extremo 5' del genoma de WNV (A) Esquema de las construcciones utilizadas. (B) Autorradiografías representativas del análisis del extremo 5' del genoma de WNV mediante inhibición de extensión de cebador en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso molar de 70 veces de 40S. El ensayo se realizó sobre m⁷G-WNV (panel izquierdo) y m⁷G-WNV_Δ3'UTR (panel derecho).

Figura R.20. La 3' UTR contribuye al posicionamiento de 40S en el extremo 5' del genoma de WNV (continuación). (B) Los productos de cDNA se cuantificaron como se describe en la **Figura R.10** y los valores resultantes se representan en un gradiente de color (panel central). Las paradas específicas se indican con cabezas de flecha rojas (en ausencia de 3' UTR) o negras (en presencia de 3' UTR) Las líneas verticales indican paradas en más de un nucleótido por cada cabeza de flecha. (C) Secuencia y estructura secundaria teórica del extremo 5' del genoma de WNV incluyendo el resumen de los análisis mostrados en (B). Las paradas específicas obtenidas en ausencia de la 3' UTR se indican con un círculo turquesa; las obtenidas en presencia de la 3' UTR, rojo; y las comunes, violeta. Las secuencias de ciclación se señalan con el mismo código de colores que en la **Figura I.6**.

R.8. LAS INTERACCIONES ENTRE LOS EXTREMOS DEL GENOMA SON COMPATIBLES CON LA UNIÓN DE 40S.

La influencia del extremo 5' en el reclutamiento de 40S por la 3' UTR se analizó mediante SHAPE sobre el extremo 3' del genoma de WNV en presencia (RNA m⁷G-WNV) y en ausencia (RNA m⁷G-FLuc-3'WNV) del extremo 5' (**M.2.23.1.**); así como en ausencia y en presencia de la subunidad 40S. Los perfiles de reactividad NMIA relativa resultantes se compararon dos a dos (**Figura R.21**).

Para el procesamiento de los datos, se seleccionó una secuencia reactiva de referencia (>0,4 unidades de reactividad) que sufriese poca variación entre las diferentes construcciones. Se escogió la secuencia G₁₀₈₂₄-U₁₀₈₃₅ y se calculó la reactividad media para normalizar los datos de reactividad obtenidos en cada posición. Los valores resultantes se escalaron y se definió un valor umbral (Q₃+RIQ, donde RIQ es el rango intercuartil) (0,29 unidades) para discriminar entre posiciones reactivas (>0,29 unidades) y no reactivas (<0,29 unidades). Esta aproximación no permite extraer conclusiones a nivel de dinámica electrónica pero sí ofrece un sistema robusto para comparar moléculas diferentes (Banijamali et al., 2023). Las principales conclusiones del este estudio se describen a continuación.

Los perfiles de reactividad de m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV **en ausencia de 40S** apoyan la formación de PK3, ya que ni TL1 ni su secuencia complementaria (A₁₀₉₀₇ACACCA₁₀₉₁₃) son sensibles al tratamiento con NMIA (**Figura R.21A**). Sin embargo, la formación de PK4 podría estar comprometida, ya que se detectan posiciones reactivas en la secuencia complementaria a TL2 (A₁₀₉₂₁CAGC₁₀₉₂₅) tanto en presencia (A₁₀₉₂₁) como en ausencia (C₁₀₉₂₂ y C₁₀₉₂₅) del extremo 5'. La comparación reveló que, en presencia del extremo 5', se produce una reducción significativa en la reactividad de la secuencia que conecta a los elementos 3'DB y sHP (A₁₀₉₀₃C₁₀₉₀₄, C₁₀₉₁₄, A₁₀₉₁₆C₁₀₉₁₇ y A₁₀₉₂₁), incluida la secuencia de ciclación 3'CYC (A₁₀₉₂₈UU₁₀₉₃₀) (**Figura R.21A**). Este resultado apoya el establecimiento de interacciones de la 3' UTR con el extremo 5' y la existencia de eventos de reorganización estructural en la 3' UTR que podrían ser compatibles con la ciclación de la molécula en las condiciones experimentales aplicadas.

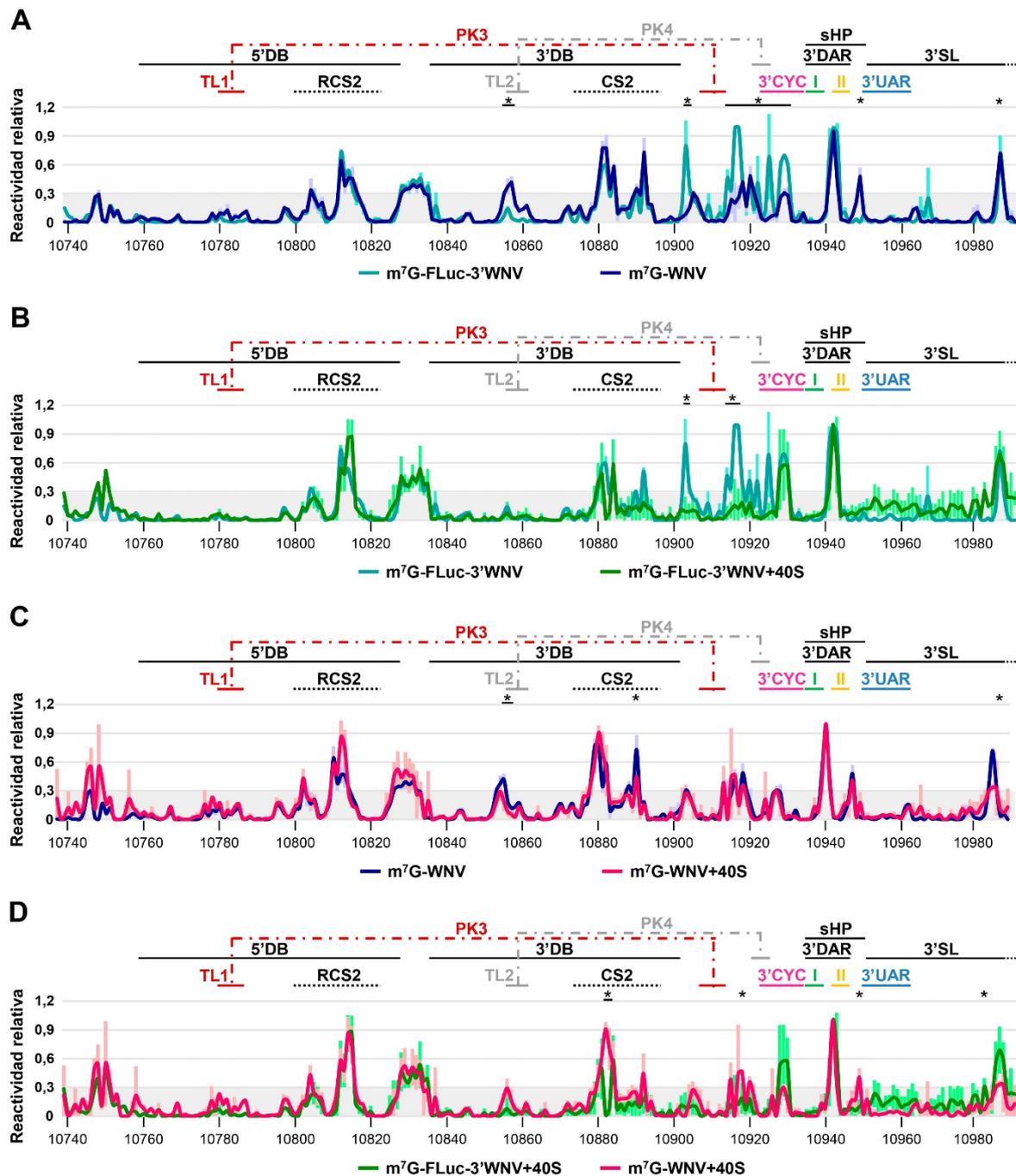


Figura R.21. El extremo 5' del genoma induce cambios estructurales en la 3' UTR independientes de 40S. Comparación dos a dos de los perfiles de reactividad relativa NMIA de las construcciones m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV, en presencia y en ausencia de 40S. Se obtuvieron los valores de reactividad relativa y se normalizaron (Banijamali et al., 2023) con el valor de reactividad media calculado para la secuencia G₁₀₈₂₄–U₁₀₈₃₅. Los valores resultantes se escalaron a 1. Se definió un valor umbral como Q₃+RIQ (0,29 unidades). Los valores de reactividad nula aparecen sombreados en gris. En la parte superior de cada gráfico se señalan los elementos estructurales y los motivos de secuencia. Las secuencias de ciclación están identificadas con el mismo código de color que en la **Figura I.6**. Los *pseudoknots* PK3 y PK4 se representan con líneas rojas y grises, respectivamente. La numeración se corresponde con la indicada en la **Figura I.6**. Los resultados mostrados constituyen la media de tres ensayos independientes \pm desviación estándar (representada con barras en un color más claro). (*) Diferencias significativas ($p < 0,05$). Los tramos de nucleótidos en los que se observan diferencias significativas se indican con una línea bajo el asterisco.

En **ausencia del extremo 5'**, la **presencia de 40S** provocó una pérdida de reactividad significativa en las secuencias que flanquean a la secuencia complementaria de TL1 (A₁₀₉₀₃C₁₀₉₀₄ y C₁₀₉₁₄AAC₁₀₁₇) (**Figura R.21B**). La unión de 40S al dominio II podría justificar este descenso, una hipótesis compatible con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de extensión de cebador (**R.4.**, **Figura R.10B**), que se ve apoyada por la importancia que ha demostrado la formación de PK3 en el reclutamiento de 40S (**R.3.**, **Figura R.7**). Tampoco puede descartarse la posibilidad de que el reclutamiento de 40S por la 3' UTR provoque una estabilización de la estructura que pudiese dar lugar a la pérdida de reactividad en las posiciones indicadas.

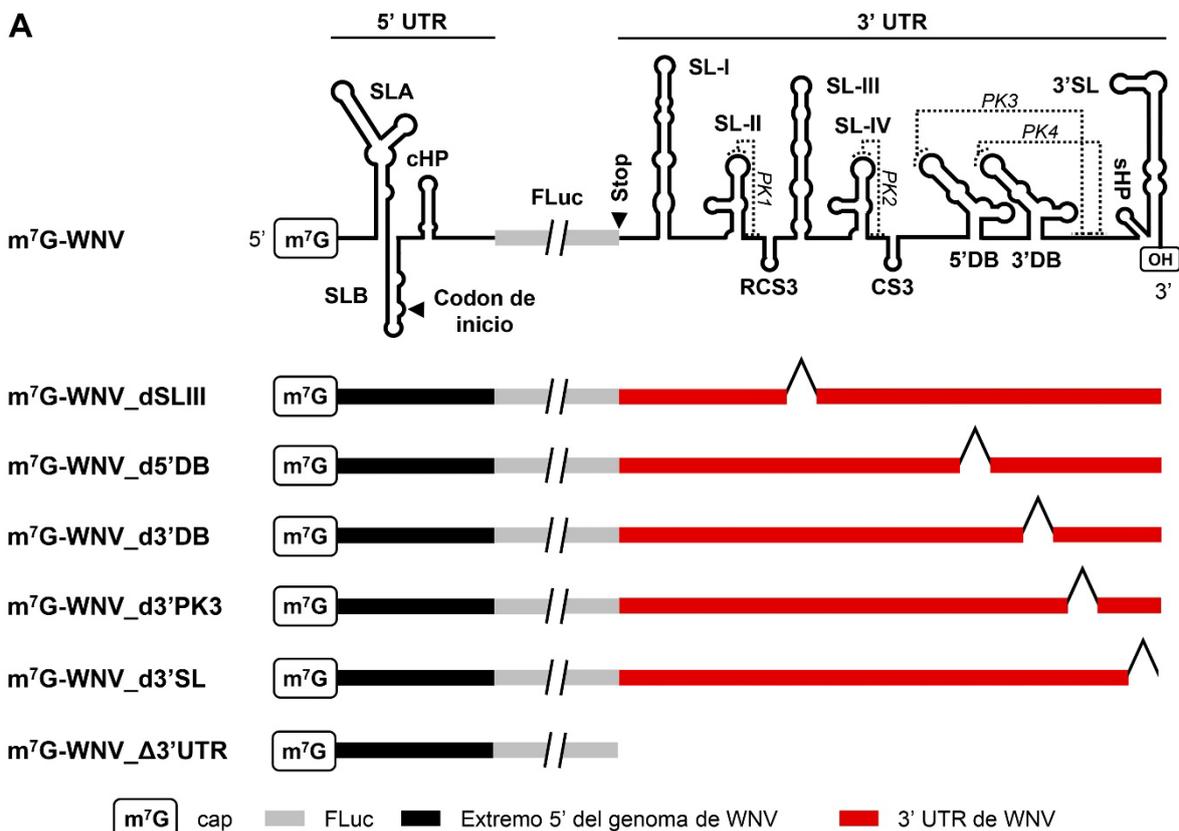
El perfil de reactividad del **RNA m⁷G-WNV** experimentó cambios puntuales en **presencia de la subunidad 40S** (**Figura R.21B**). Esto puede deberse a la conservación de las interacciones entre los extremos del genoma, o bien, a que la subunidad se une a posiciones que no son reactivas en el RNA libre. En 3'DB, se observó una disminución significativa en la reactividad en TL2 (A₁₀₈₅₅ y G₁₀₈₅₇) y CS2 (G₁₀₈₉₀). Dado que no se habían detectado paradas de retrotranscripción específicas compatibles con la unión de 40S en estas posiciones (**Figura R.10C**), la disminución podría deberse a la formación de PK4 u otros cambios conformacionales provocados por la unión a 40S. La pérdida de reactividad en el lazo apical de 3'SL (A₁₀₉₈₆) podría formar parte de dichos cambios conformacionales, o constituir un punto de contacto adicional a 40S promovido por el extremo 5'.

La comparación de los perfiles de reactividad de m⁷G-WNV y m⁷G-FLuc-3'WNV en **presencia de 40S** mostró que las posiciones en 5' de 3'CYC (A₁₀₉₁₈) y en 5' de 3'UAR (G₁₀₉₄₉) pasaban a ser reactivas en presencia del extremo 5' (comparar **Figuras R.21A y D**), lo que sugiere un efecto modulador de la estructura en estos elementos dependiente de una interacción entre los extremos 5' y 3' del genoma de WNV. Finalmente, se confirmó el cambio conformacional en 3'SL (G₁₀₉₈₂), el cual, aunque es ocasionado por la subunidad 40S, es absolutamente dependiente del extremo 5' del genoma. También cabe destacar el aumento significativo en reactividad detectado en CS2 en presencia de 5' (A₁₀₈₈₂), si bien este resultado, dado el tratamiento de los datos, no permite concluir sobre la magnitud del cambio conformacional que afecta a estas posiciones.

En conjunto con los resultados de los ensayos de inhibición de extensión de cebador (R.7.), los datos del estudio de SHAPE sugieren la existencia de interacciones directas entre los extremos 5' y 3' del genoma viral que se mantienen en presencia de la subunidad 40S y condicionan la estructura de la 3' UTR, regulando así el posicionamiento de la subunidad ribosómica en el extremo 5' del genoma.

R.9. EL RECLUTAMIENTO DE 40S POR LA 3' UTR PODRÍA MEDIAR EL EFECTO POTENCIADOR DE LA TRADUCCIÓN

Para tratar de establecer una correlación entre el reclutamiento de 40S a través de la 3' UTR de WNV y el efecto que exhibe esta región en la regulación de la traducción (**R.1.**), se realizaron ensayos de traducción en células Vero con una serie de construcciones portadoras de deleciones en los elementos estructurales que han demostrado estar implicados en el reclutamiento de 40S (**Figura R.22A**): m⁷G-WNV_dSL-III, que carece del elemento 3'DB; m⁷G-WNV_d5'DB y m⁷G-WNV_d3'DB, portadores de la deleción de los elementos 5'DB y 3'DB, respectivamente; m⁷G-WNV_d3'PK3, en la que se eliminó la secuencia que incluye los nucleótidos 10908-10925, impidiendo la formación de PK3; y m⁷G-WNV_d3'SL, en la que se delecionó el elemento 3'SL (**M.1.11.1**). Se incluyó el RNA m⁷G-WNV_Δ3'UTR, carente de la 3' UTR completa, previamente ensayado (**Figura R.1**). Durante la síntesis se incorporó un análogo de cap tipo 1 en 5' de los RNAs. Estas construcciones se utilizaron para cotransfectar células Vero junto con el RNA m⁷G-RLuc. La eficiencia de traducción relativa se determinó cuantificando la actividad luciferasa a las 4 h post-transfección.



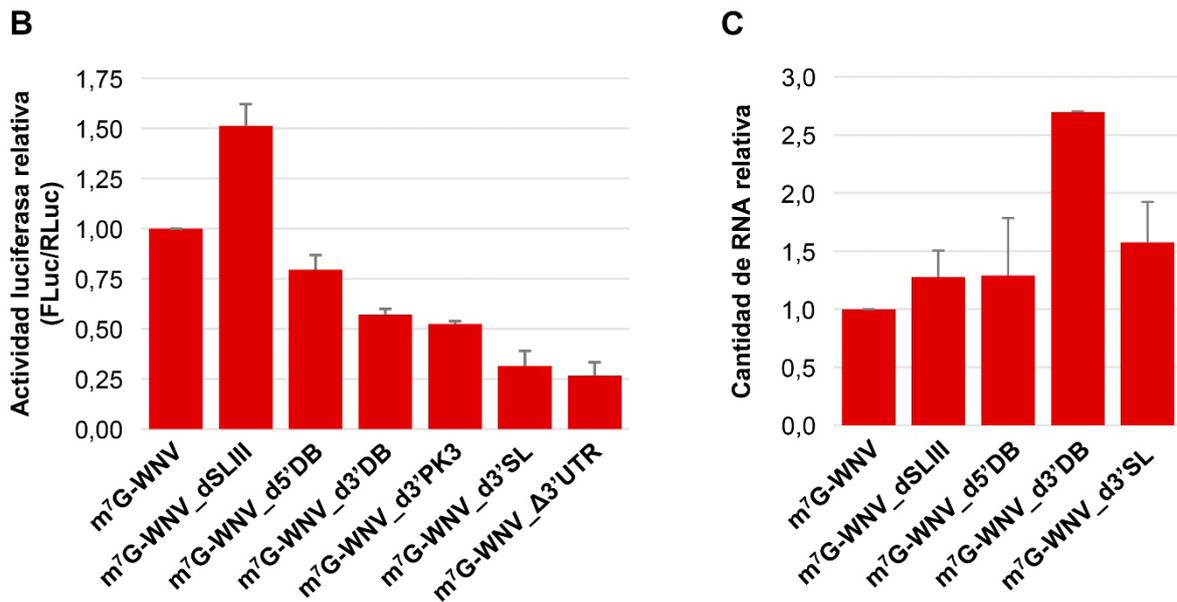


Figura R.22. La delección de elementos de la 3' UTR de WNV implicados en la unión de 40S interfiere con la regulación de la traducción viral. (A) Estructura secundaria teórica de los extremos 5' y 3' de m⁷G-WNV. A partir de este RNA se generaron mutantes deletéreos en elementos concretos relacionados con el reclutamiento de 40S, representados debajo. (B) Representación de la actividad luciferasa relativa en células Vero. La eficiencia de traducción de las construcciones indicadas en (A) se determinó como se describe en la [Figura R.1](#). y se refirió a la obtenida con m⁷G-WNV. (C) Representación de la cantidad relativa de los RNAs mostrados en (A). Se determinó la cantidad relativa de cada RNA como se indica en la [Figura R.1](#). Los datos mostrados en (B) y (C) constituyen la media de al menos tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Se comprobó que el efecto en la traducción observado no se debía a diferencias significativas ($p < 0,05$) en la estabilidad intracelular de las construcciones ensayadas ([Figura R.22C](#)). La delección de 3'SL redujo el rendimiento de la traducción viral a los niveles obtenidos en ausencia de la 3' UTR de WNV completa ([Figura R.22B](#)), lo cual indica que 3'SL es un elemento crítico en la regulación de la traducción de WNV. Este resultado se correlaciona con los obtenidos previamente en DENV (Holden et al., 2006; Holden & Harris, 2004) y sugiere que la función de 3'SL sobre la regulación de la traducción se conserva en flavivirus. Por el contrario, la supresión del elemento SL-III (m⁷G-WNV_dSL-III) provocó un aumento de ~50% en actividad luciferasa relativa ([Figura R.20B](#)), por lo que se puede concluir que SL-III actúa como un regulador negativo de la síntesis de proteínas virales, pese a que el efecto de la región completa en el proceso es positivo. Los elementos 5' y 3'DB, así como el *pseudoknot* PK3, también demostraron ser críticos para lograr una eficiencia de traducción completa, especialmente 3'DB y PK3, cuya supresión provocó una disminución de ~50% en la actividad luciferasa relativa ([Figura R.22B](#)).

Los resultados apuntan a que el reclutamiento de la subunidad 40S por distintos elementos estructurales de la 3' UTR de WNV tiene un papel regulador diferente, positivo o negativo. Todo ello sugiere una fina regulación de la traducción viral mediada por la 3' UTR que resulta del equilibrio de la actividad de los distintos elementos estructurales que la componen.

R.10. LA UNIÓN DE 40S A TRAVÉS DE LA 3' UTR ES UN MECANISMO PRESENTE EN OTROS FLAVIVIRUS

R.10.1. LA 3' UTR DE DENV Y YFV UNE LA SUBUNIDAD 40S

Con el objetivo de determinar si el reclutamiento de la subunidad 40S mediado por la 3' UTR es un mecanismo común en flavivirus, se realizaron ensayos de unión por la 3' UTR de otros dos destacados miembros del género: DENV y YFV, según se describe en el apartado R.2.1. Los datos resultantes se ajustaron a la Ec.1 (Figura R.23 y Tabla R.5).

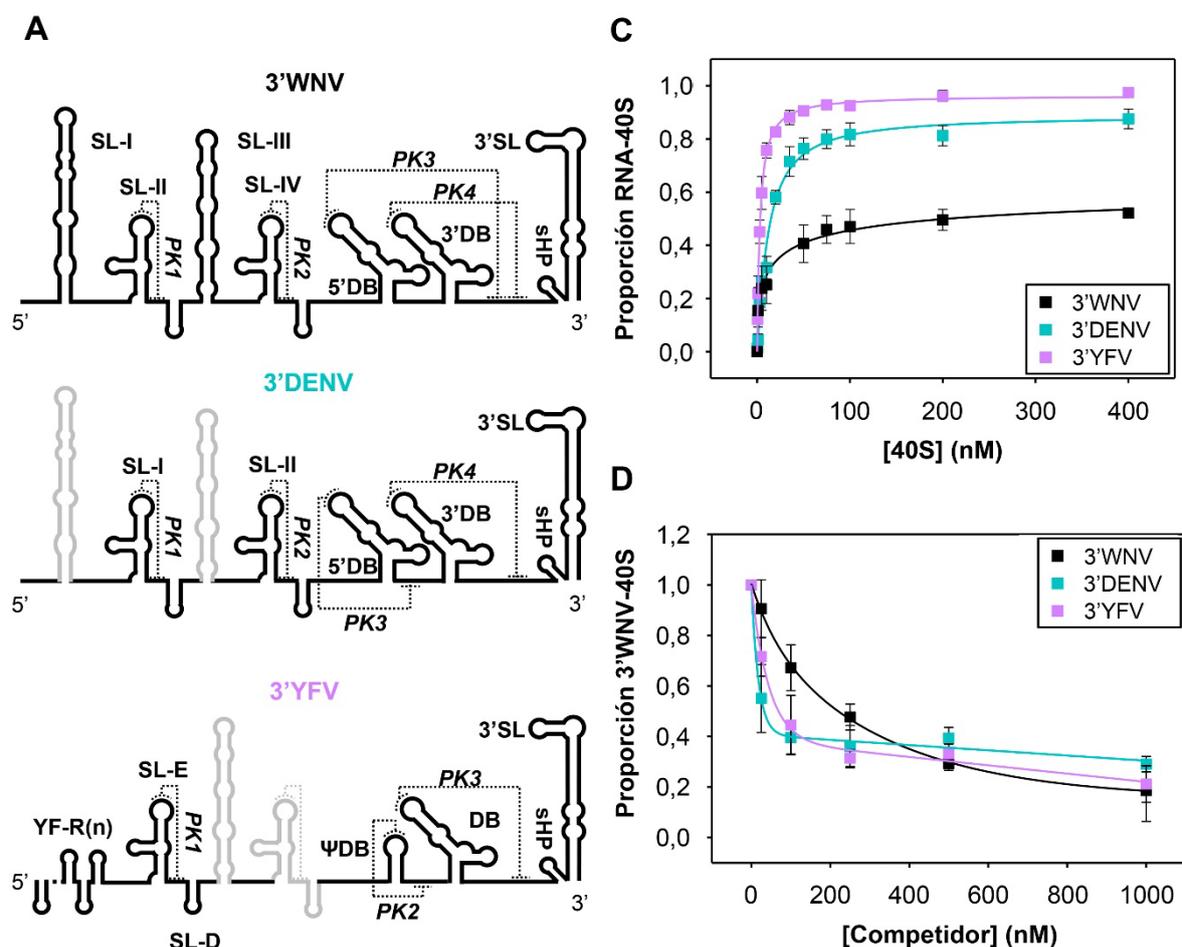


Figura R.23. DENV y YFV también unen la subunidad 40S a través de la 3' UTR. (A) Diagrama de la estructura secundaria teórica de la 3' UTR correspondiente a WNV (3'WNV), a la cepa 16681 del subtipo 2 de DENV (acceso GeneBank [NC_001474.2](#)) (3'DENV) y a la cepa Asibi de YFV (acceso GeneBank [KF769016.1](#)) (3'YFV). En gris se muestran los elementos estructurales presentes en WNV que están ausentes en DENV y/o en YFV. (B) Representación de la proporción de complejo RNA-40S formado a concentraciones crecientes de 40S para las construcciones mostradas en (A). Los datos de unión se ajustaron a la Ec.1. (C) Representación de la proporción de complejo 3'WNV-40S formado en presencia de concentraciones crecientes de los RNAs mostrados en (A). Los datos representados en (B) y (C) constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

El RNA 3'DENV (**M.1.11.3.**), que incluye los nucleótidos 10273 a 10723 del genoma de la cepa 16681 del subtipo 2 del virus (**Figura R.23A**), unió la subunidad 40S con afinidad (rango nanomolar bajo) y ~20% más eficientemente que la 3' UTR de WNV (**Figura R.23B** y **Tabla R.5**). El coeficiente de Hill obtenido (**Tabla R.5**) indica que no existe cooperatividad en la molécula, lo cual podría deberse a la existencia de un único sitio de unión a 40S. El RNA 3'YFV (**M.1.11.4.**), que contiene las posiciones 10345 a 10833 del genoma de la cepa Asibi de YFV (**Figura R.23A**), mostró ~3 veces más afinidad por la subunidad 40S que DENV y una eficiencia de unión de ~96% (**Tabla R.5**). El coeficiente de Hill indica la ausencia de cooperatividad (**Tabla R.5**). Además, tanto 3'DENV como 3'YFV compitieron eficientemente la interacción 3'WNV-40S (**Figura R.23C**), lo cual apoya la idea de que la unión a 40S es específica, al igual que ocurre en el RNA 3'WNV.

En conjunto, estos resultados indican que el reclutamiento de 40S por parte de la 3' UTR es un mecanismo presente en diferentes flavivirus.

Tabla R.5. Constantes obtenidas para la unión RNA-40S según la Ec.1 de las construcciones 3'WNV, 3'DENV y 3'YFV.

RNA	$B_{max} \pm DS$	Hill $\pm DS$	$K_d \pm DS$ (nM)
3'WNV	0,658 \pm 0,085	0,468 \pm 0,086	17,522 \pm 11,521
3'DENV	0,888 \pm 0,032	1,131 \pm 0,121	11,884 \pm 1,417
3'YFV	0,964 \pm 0,008	1,028 \pm 0,037	3,062 \pm 0,115

Los valores mostrados constituyen la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (DS).

R.10.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN A LA SUBUNIDAD 40S EN LA 3' UTR DE DENV

Como se indica en el apartado **I.2.4.2.**, la 3' UTR de los MBFV se encuentra muy conservada estructuralmente en los dominios II y III. Sin embargo, el grado de conservación de la secuencia es mucho menor y se restringe a una serie de motivos, entre las que se incluyen la secuencia CS2 y las secuencias de ciclación (T. S. Gritsun & Gould, 2007a; Hahn et al., 1987). La similitud estructural existente entre las 3' UTRs de WNV y DENV proporciona un escenario ideal para profundizar en la influencia que tienen la estructura y la secuencia en el reclutamiento de 40S, así

como en la comunicación entre los extremos 5' y 3' del genoma. Con este fin, se sintetizó la construcción m⁷G-5'WNV-3'DENV (M.1.11.5.) (Figura R.24A), constituida por el gen codificante de FLuc flanqueado por el extremo 5' del genoma de WNV y por la 3' UTR completa del subtipo 2 de DENV. En su extremo 5' porta un análogo de cap tipo 1.

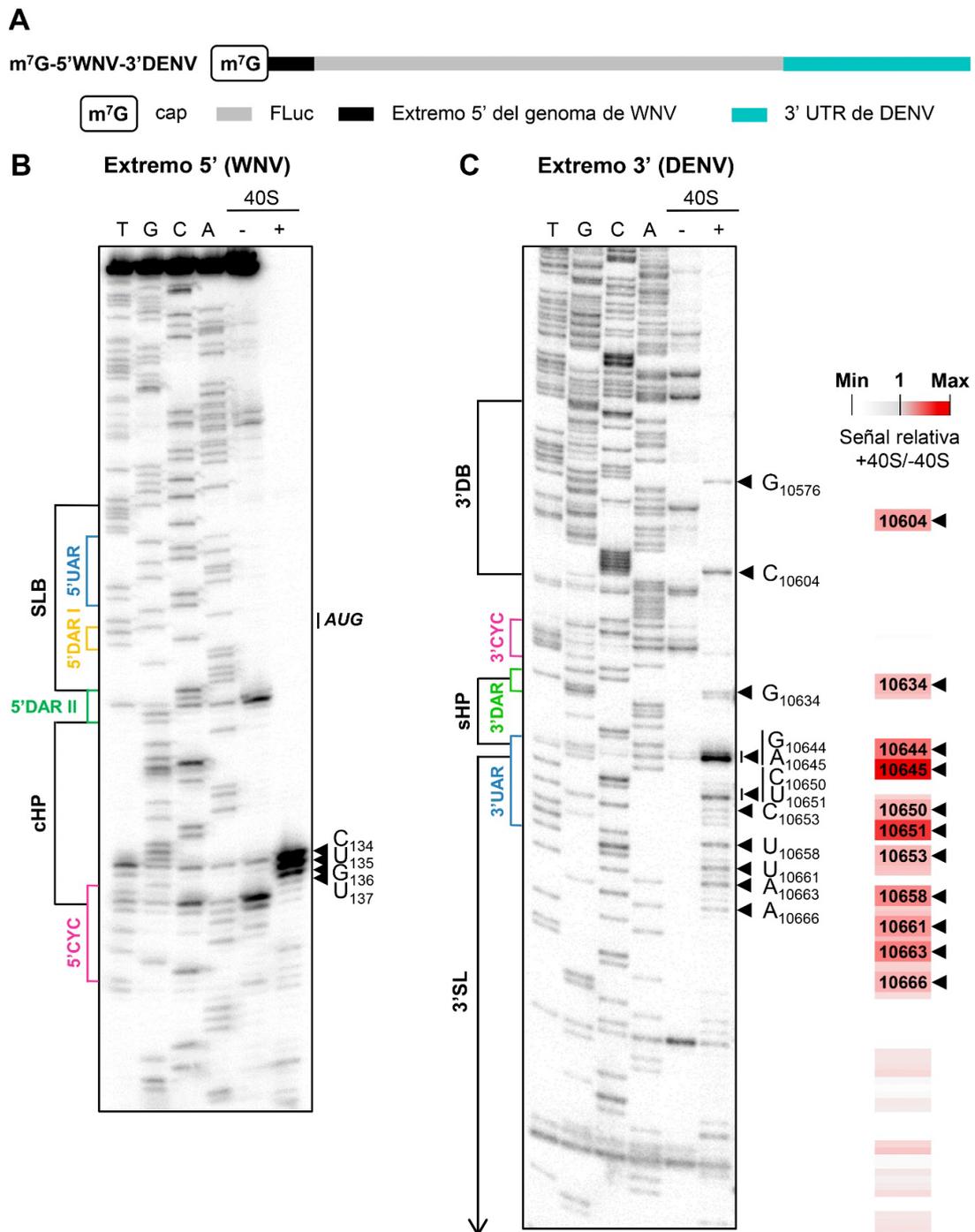


Figura R.24. Los elementos sHP-3'SL de DENV unen la subunidad 40S en presencia del extremo 5' del genoma de WNV. (A) Esquema del RNA m⁷G-5'WNV-3'DENV.

Figura R.24. Los elementos sHP-3'SL de DENV unen la subunidad 40S en presencia del extremo 5' del genoma de WNV (continuación). (B y C) Autorradiografías representativas de los ensayos de inhibición de extensión de cebador realizados sobre los extremos 5' (B) y 3' (C) de la construcción m⁷G-5'WNV-3'DENV en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso molar de 70 veces de 40S. Las reacciones se realizaron empleando los ODNs marcados en su extremo 5' con ³²P (M.1.10): GL2, para analizar el extremo 5' de la construcción (B) y as3'DENV-SaII para el dominio III de la 3' UTR de DENV (C). Los productos de cDNA se cuantificaron como se describe en la **Figura R.10** y los resultados obtenidos en la 3' UTR se representaron como un gradiente de color. Las paradas de retrotranscripción específicas se indican con cabezas de flecha negras. Las líneas verticales señalan paradas en más de un nucleótido por cada cabeza de flecha. Las secuencias de ciclación se muestran con el mismo código de color que en la **Figura I.7**.

Sobre dicho RNA se realizaron experimentos de inhibición de extensión de cebador en presencia de un exceso de 70 veces de subunidad 40S empleando ODNs marcados con ³²P en su extremo 5' para analizar el extremo 5' del genoma de WNV (**Figura R.24B**, panel izquierdo) y el dominio III de la 3' UTR de DENV (**Figura R.24B**, panel derecho). En el extremo 5' de WNV, los resultados del ensayo fueron similares a los obtenidos con la construcción RNA m⁷G-WNV_Δ3'UTR (comparar **Figuras R.21B** y **R.24B**). Las paradas específicas se detectaron principalmente en 5' del motivo de secuencia 5'CYC (posiciones C₁₄₄UGU₁₃₇), mientras que las paradas localizadas en 3' de CYC cualitativamente parecen menos frecuentes (**Figura R.24B**). En el extremo 3' de la molécula se detectaron paradas específicas concentradas en la base de los elementos sHP y 3'SL de la 3' UTR de DENV, parcialmente solapantes con la secuencia 3'UAR (**Figura R.24B**), como se observaban en la 3' UTR de WNV en presencia del extremo 5' del virus (RNA m⁷G-WNV) (**Figura R.17C**).

Estos resultados hacen pensar en que el sitio de unión a 40S del dominio II, previamente detectado en WNV, podría preservarse en DENV. Para probar esta hipótesis, se realizaron análisis de la 3' UTR de DENV en presencia (RNA m⁷G-5'WNV-3'DENV) y en ausencia (RNA 3'DENV) del extremo 5' del genoma de WNV utilizando un exceso de 40S de 70 y 25 veces, respectivamente. Se identificaron paradas específicas comunes en ambas construcciones en las regiones que separan los elementos SL-I y SL-II, así como SL-II y 5'DB (**Figura R.25**), las cuales teóricamente se pliegan en dos estructuras tipo tallo-lazo. Este resultado permite sugerir que la subunidad 40S es reclutada por la 3' UTR de DENV independientemente de la presencia del extremo 5' del genoma en la base de los elementos SL-II y 5'DB.

Los resultados obtenidos en los ensayos sobre el RNA quimérico m⁷G-5'WNV-3'DENV sugieren que los extremos heterólogos no parecen modular entre sí su estructura y, por tanto, su función, en estas condiciones experimentales.

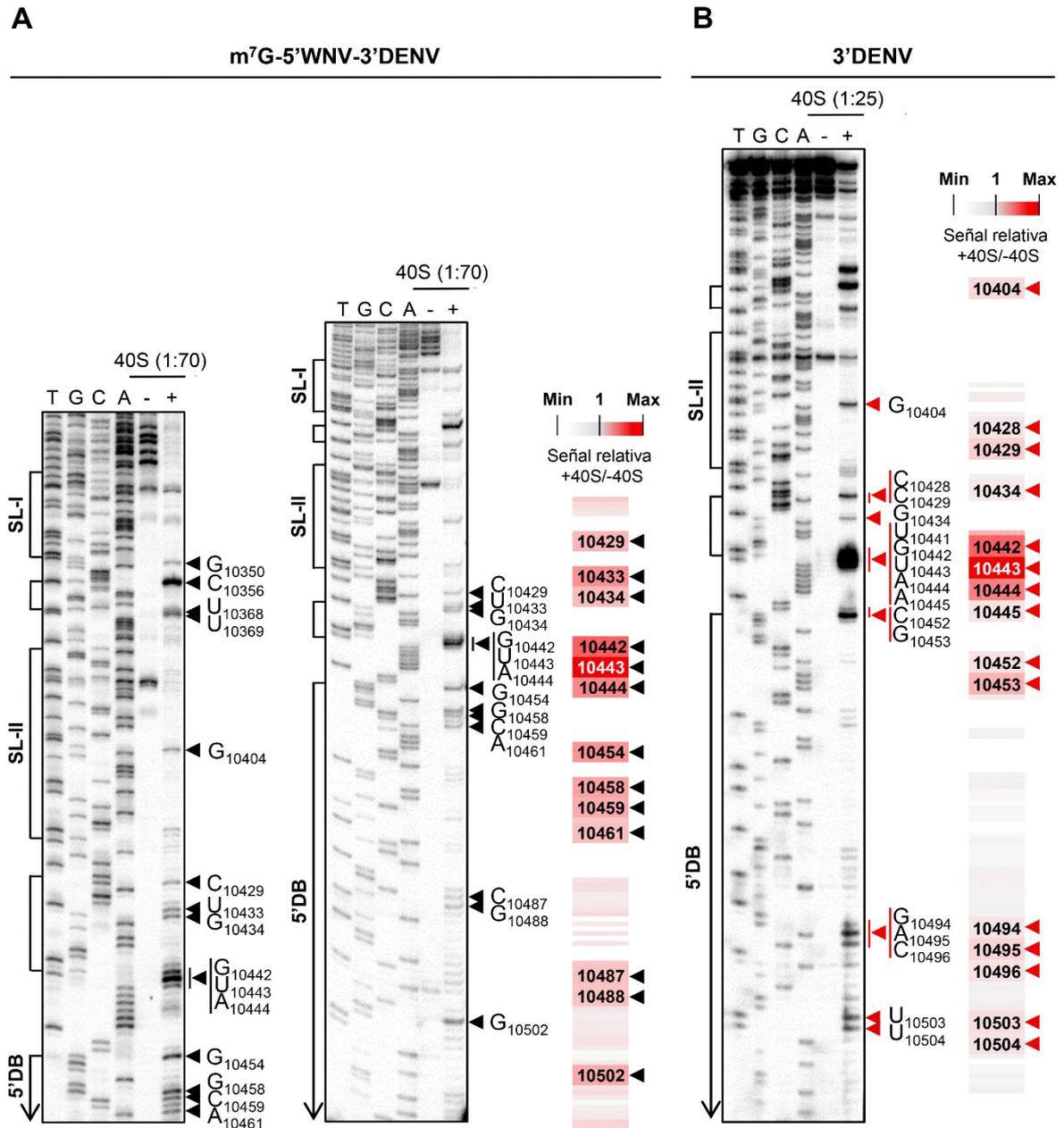
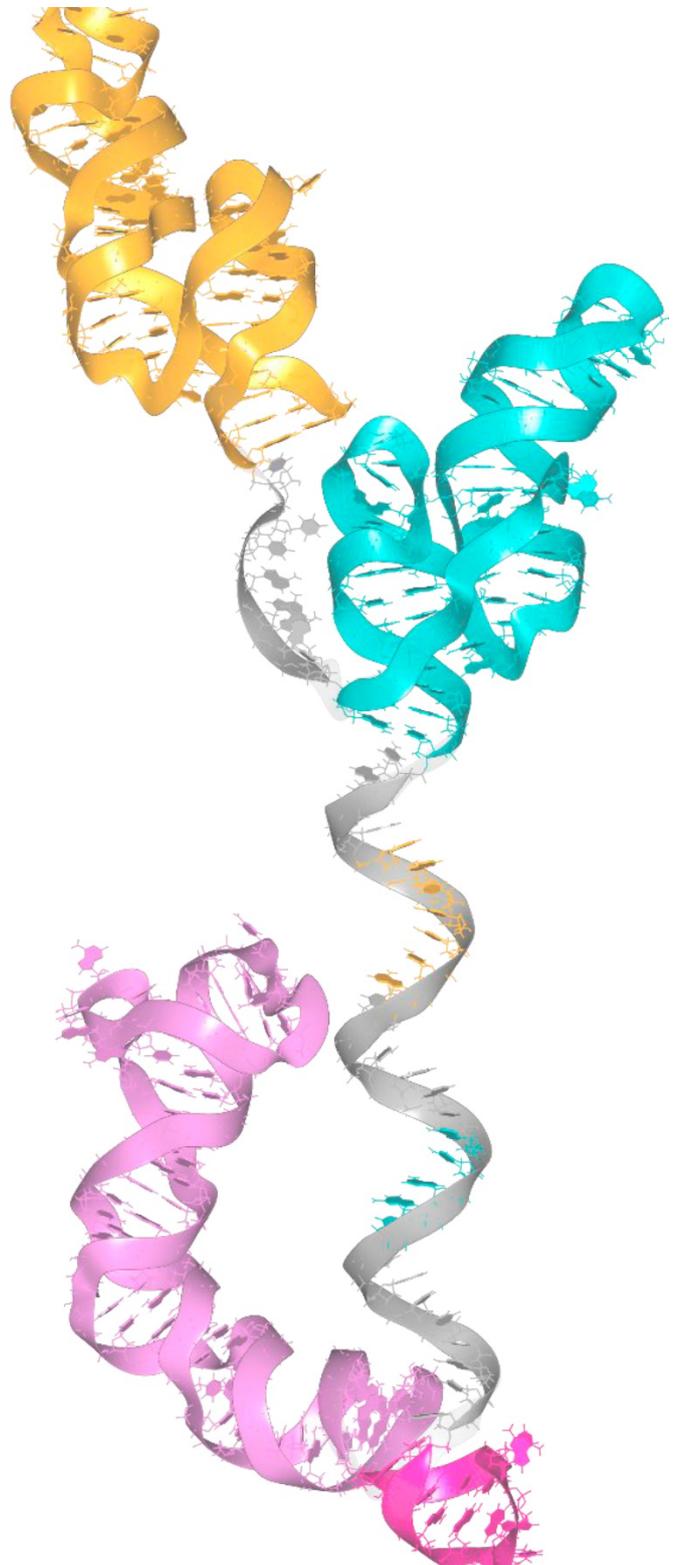


Figura R.25. La subunidad 40S es reclutada en la base de los elementos SL-II y 5'DB de la 3' UTR de DENV. Autorradiografías de los ensayos de inhibición de extensión de *primer* sobre las construcciones 5'WNV-3'DENV (A) y 3'DENV (B) en ausencia (-) y en presencia (+) de un exceso de 40S de 70 y 25 veces, respectivamente. Las reacciones se realizaron empleando el ODN marcado en 5' con ³²P as3'DB_DENV (M.1.10.). Los productos de cDNA se cuantificaron como se describe en la Figura R.10 y se representaron como un gradiente de color. Se indican con cabezas de flecha las paradas específicas de retrotranscripción. Con negro se marcan las detectadas en presencia del extremo 5' del genoma de WNV y, con rojo, las detectadas sobre el 3'DENV. Las líneas verticales indican paradas en más de un nucleótido por cada cabeza de flecha.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El reclutamiento de la maquinaria de traducción a través de la 3' UTR es un mecanismo que se encuentra ampliamente descrito en virus RNA animales, como HCV (Bai et al., 2013; Ríos-Marco et al., 2016; Romero-López et al., 2018) y SINV (García-Moreno et al., 2016) (I.3.3.2.), así como en algunos virus vegetales, en los cuales a los elementos estructurales que desempeñan esta función se les conoce como 3'-CITEs (Jaafar & Kieft, 2019) (I.3.3.1.). En cada modelo, el reclutamiento se produce de una manera específica y tiene un efecto diferente sobre la síntesis de proteínas virales. Así, mientras que la unión de la subunidad 40S a través de los 3'-CITEs favorece el inicio de la traducción viral; la unión de 40S por la 3' UTR de HCV y SINV potencia la traducción en etapas tardías del proceso, sin afectar a las primeras rondas de síntesis de proteínas.

Los resultados presentados en la presente Memoria de Tesis demuestran que la 3' UTR de WNV potencia la traducción viral, tanto dependiente (**Figura R.1**) como independiente (**Figura R.2**) de cap. Aunque se desconoce si la región emplea el mismo mecanismo de regulación en ambos procesos, éste no parece depender de la maquinaria celular asociada a la traducción dependiente de cap, ya que el efecto de la 3' UTR sobre la traducción es similar tanto en presencia como en ausencia de cap (incremento de ~2 veces) (comparar **Figuras R.1** y **R.2**).

El hecho de que la potenciación de la traducción sea reproducible en células de mosquito y en diferentes líneas celulares de mamífero sugiere la intervención directa de elementos estructurales de la 3' UTR (**Figura R.1**). Éstos podrían llevar a cabo el reclutamiento de factores celulares presentes en todas las líneas celulares, como podría ser la subunidad ribosómica 40S. El reclutamiento de 40S a través de la 3' UTR podría mediar el efecto potenciador de la región mediante: i) una mejora en el reciclaje del ribosoma hacia el extremo 5' del genoma; ii) un proceso de "amplificación", por el cual se permitiría el uso reiterado de una misma molécula de mRNA molde; o bien, (iii) al promover la entrada de la subunidad 40S en el sitio de inicio de la traducción en 5' durante las primeras etapas de proceso, sin descartar otras posibles opciones.

Además, la 3' UTR de WNV podría potenciar la traducción viral mediante la inducción de eventos de reorganización estructural en el extremo 5' del genoma viral. Dicho efecto estaría mediado por el establecimiento de interacciones RNA–RNA a larga distancia entre ambos extremos del genoma. En este aspecto, WNV se comportaría de un modo similar a HCV, en el que diferentes trabajos han demostrado que la conformación de los extremos 5' y 3' del genoma y, por consiguiente, su función, está regulada por interacciones a larga distancia en ausencia de factores proteicos (Fricke et al., 2015; Friebe et al., 2005; Pirakitikulr et al., 2016; Romero-López et al., 2012, 2017; Romero-López & Berzal-Herranz, 2009, 2012; Shetty et al., 2013; Tuplin et al., 2012).

Respecto al inicio de la traducción independiente de cap en flavivirus, no existe consenso acerca del mecanismo molecular subyacente. Mientras que algunos autores apuntan a la existencia de un IRES en la 5' UTR viral (Song et al., 2019), otros argumentan en contra de la misma, aludiendo a la magnitud de la actividad de traducción independiente de cap observada en flavivirus en comparación con la asociada a IRESs bien conocidos (T. Wang et al., 2020). Sí existe consenso sobre la dependencia del mecanismo de traducción independiente de cap de la presencia de la 3' UTR (Edgil et al., 2006; Song et al., 2019; T. Wang et al., 2020), algo que corroboran los resultados obtenidos en este trabajo (**Figura R.2**).

Los resultados presentados demuestran que la 3' UTR de WNV une a la subunidad 40S con elevada eficiencia y afinidad (**Figura R.3**). El ajuste de los datos de unión de 40S al RNA 3'WNV a una ecuación sigmoideal de tres parámetros (**Ec.1**) proporcionó un coeficiente de Hill de $0,476 \pm 0,101$ (**Figura R.3**), lo cual apunta a la existencia de más de un sitio de unión en la molécula (Martini & Habeck, 2015; Sevlever et al., 2020). Este resultado llevó a realizar un segundo ajuste a una curva sigmoideal con dos sitios de unión (**Ec.2**), que ofreció valores de K_d en el rango nanomolar bajo ($K_{d1} = 0,231 \pm 0,241$ nM y $K_{d2} = 28,832 \pm 8,094$ nM) (**Tabla R.1**), lo cual indica que la subunidad 40S se une a la 3' UTR de WNV con una afinidad comparable a la observada en HCV ($K_d = 1,8 \pm 0,2$ nM) (Bai et al., 2013). Resulta interesante la diferencia de dos órdenes de magnitud entre los dos posibles sitios de unión, lo que sugiere el reclutamiento diferencial de 40S por parte de distintos elementos de la 3' UTR.

La interacción 3'WNV-40S se compitió eficientemente con un exceso del RNA 3'WNV (**Figura R.4**), lo cual apoya el reclutamiento específico de la subunidad 40S por la 3' UTR de WNV. La especificidad de la unión se confirmó utilizando la construcción RNA-100, la cual presenta una baja eficiencia de unión a 40S (inferior al 5%) en el rango μM bajo (Romero-López et al., 2018). El RNA-100 compitió la unión 3'WNV-40S a la máxima concentración ensayada (**Figura R.5**), si bien este efecto fue inferior al 20%. Como se indica en el apartado **R.2.2.**, la competición con RNA-100 podría explicarse por la saturación de la superficie de la subunidad ribosómica por parte del RNA competidor, la cual interferiría con los contactos débiles establecidos entre 40S y los elementos específicos de la 3' UTR de WNV. De hecho, no pudo detectarse formación de complejos RNA-100–40S (**Figura R.16B**). Por otro lado, la comparación de la eficiencia de unión de 3'WNV-40S con respecto a la obtenida para los mutantes deletéreos en elementos específicos de la 3' UTR de WNV (**Figuras R.5, R.6 y R.7**) confirmó que únicamente la eliminación de elementos específicos de la 3' UTR conducía a la pérdida de la interacción con 40S. Así, mientras que la supresión de sHP y 3'SL (RNA 3'WNV_10400-10900) bloqueaba la unión a 40S (**Figura R.5**), un fragmento interno de la 3' UTR del dominio II por sí mismo (RNA 3'WNV_10745-10950) mostraba una eficiencia de unión similar a la de la construcción 3'WNV completa (**Figura R.7**). Estos resultados confirman que la eficiencia de la interacción 3'WNV-40S se debe a la presencia de elementos estructurales de RNA específicos en la 3' UTR.

Finalmente, cabe resaltar el hecho de que existen coincidencias con el modelo de HCV en cuanto a las proteínas ribosómicas de 40S que podrían interaccionar directamente con la 3' UTR (Bai et al., 2013). En particular, los datos obtenidos a partir del análisis proteómico mostraron que tanto RPS2 como RPS3 interaccionan directamente con la 3' UTR de WNV. Estas proteínas se localizan en el canal de entrada y salida del mRNA en la subunidad 40S (**Figura R.16**) (Ben-Shem et al., 2011), una zona bien delimitada y de difícil acceso, lo cual refuerza la idea de que la interacción 3' UTR-40S es específica.

La existencia de dos sitios teóricos de interacción independientes del extremo 5' del genoma se confirmó mediante los ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre el RNA 3'WNV (**Figura R.10**), así como mediante SHAPE-dif (**Figura R.14**).

Estos sitios se localizan en el dominio II y en el elemento SL-III; pero dependen de la formación del doble *pseudoknot*, que incluye a PK3 y PK4 (**Figura R.7**). Los sitios identificados aparecen diferencialmente ocupados por la subunidad 40S en presencia del extremo 5' del genoma (RNA m⁷G-WNV). Así, mientras que en 5'DB se detectaron paradas específicas en la extensión utilizando un exceso molar de 5 veces de 40S, en SL-III dichas paradas se observaron con un exceso molar de 70 veces de 40S. Este resultado apunta a que 5'DB operaría como el sitio de unión de alta afinidad propuesto (**Tabla R.1**, $K_{d1} = 0,231 \pm 0,241$ nM), mientras que SL-III constituiría el sitio de unión de baja afinidad (**Tabla R.1**, $K_{d2} = 28,832 \pm 8,094$ nM). Las diferencias en la afinidad por 40S podrían estar condicionadas por el plegamiento del dominio II y de SL-III.

En el genoma del virus Donggang (DONGV), un flavivirus filogenéticamente próximo a MBFV, se ha caracterizado la estructura tridimensional de su único elemento DB, cuya secuencia está parcialmente conservada con WNV, DENV, YFV y ZIKV (Akiyama et al., 2020). Según este estudio, en el que se combinan técnicas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés), cristalografía de rayos X y mapeo estructural mediante SHAPE, se determinó que el elemento DB adquiere una estructura tipo *four-way* en la que la secuencia CS2 (equivalente a RCS2 en WNV) se pliega como un tallo-lazo (P3; **Figura D.1A**) y queda apilada de forma coaxial con las secuencias S2 y S3 para proporcionar estabilidad al conjunto de la estructura. Esto da lugar a un plegamiento que deja un lado de la hélice, así como el lazo apical (S4), accesibles al solvente para su interacción con proteínas o con RNA. Una característica adicional de la estructura del elemento DB es la torsión del tallo-lazo P2 sobre P1 (**Figura D.1A**), lo cual es fundamental para aproximar el motivo TL (S1, **Figura D.1A**) a su secuencia complementaria en 3' y formar así el *pseudoknot* PK.

La extrapolación de este modelo a WNV nos permite interpretar los datos de SHAPE-dif obtenidos en la Tesis Doctoral desde una perspectiva tridimensional (comparar **Figuras R.14** y **D.1B, C**). En estos análisis se observó que, a excepción de S3, P2 y P3 no muestran una especial preferencia por NMIA o 1M6, lo cual sugiere que estos motivos se encuentran en una conformación flexible que favorecería su interacción con proteínas y su influencia en reordenamientos

estructurales en la 3' UTR, una observación que coincide con los datos aportados previamente por (Akiyama et al., 2020). La predicción de la estructura tridimensional del elemento 5'DB de WNV con el programa *RNAComposer* (Popenda et al., 2012) pone de manifiesto la exposición de las bases de S3 y S4 (**Figura D.1C**), lo cual es consistente con la elevada flexibilidad de RCS2 detectada mediante SHAPE (**Figuras R.12 y R.13**). En S1 también se observa la proyección de las bases hacia el exterior de la estructura (**Figura D.1C**). Esto permite la participación de TL1 en la formación de PK3. El hecho de que el modelo de 5'DB no muestre el apilamiento de P2 y P3, ni la torsión del tallo-lazo P2 sobre P1 que se observa en la estructura cristalina de DB en DONV (**Figura D.1A**) (Akiyama et al., 2020), puede deberse a las limitaciones de la predicción, en la que no se considera el establecimiento de interacciones terciarias. Sin embargo, los ensayos de SHAPE apoyan la formación de PK3 en las diferentes construcciones analizadas (**Figura R.21**).

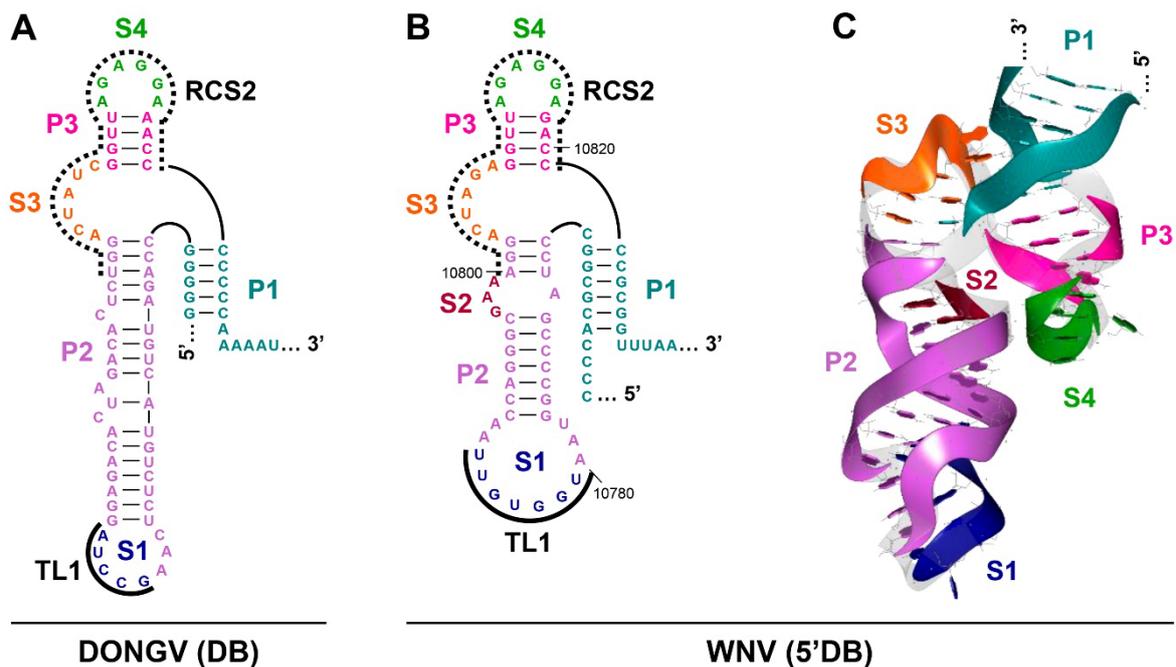


Figura D.1. Predicción de la estructura tridimensional del elemento 5'DB de WNV. (A) Representación de la secuencia y la estructura secundaria teórica del elemento DB descrito en DONGV (Akiyama et al., 2020). Las estructuras de tipo tallo P1, P2 y P3 se muestran en color turquesa, violeta y rosa, respectivamente. La secuencia desapareada S1, en azul marino; S3, en naranja; y S4, en verde. La secuencia conservada RCS2 se indica con una línea de puntos y el motivo TL1, implicado en la formación del *pseudoknot* (no mostrado), con una línea continua gruesa. (B) Representación de la secuencia y la estructura secundaria teórica de 5'DB en WNV basada en la estructura cristalina del elemento DB de DONGV. (C) Predicción de la estructura tridimensional del elemento 5'DB de WNV a partir de su estructura secundaria teórica (B) con el programa *RNAComposer* (Popenda et al., 2012). La visualización y edición de la estructura se realizó con *CCP4 molecular-graphics* (McNicholas et al., 2011).

En presencia de 40S, se detectó un aumento en la reactividad relativa de NMIA en los nucleótidos de S3 y S4 (comparar **Figuras R.14 y D.1B, C**), sugiriendo que 5'DB experimenta una reorganización estructural como resultado de la unión a 40S. Esto podría condicionar, a su vez, la formación del *pseudoknot* PK3, la cual está relacionada con el apilamiento de P2 y P3 (Akiyama et al., 2020). Los ensayos de unión demostraron que PK3 es esencial para el reclutamiento de 40S en WNV (**Figura R.7**), confirmando la importancia de la estructura de la 3' UTR en el reconocimiento de la subunidad ribosómica, y apoyando la idea de que la interacción 3' UTR-40S es específica.

Por otra parte, el elemento SL-III en la 3' UTR de WNV se pliega como un tallo-lazo interrumpido por tres lazos internos simétricos. Destaca el lazo interno distal (**Figura D.2**), en el que se observa una disminución de reactividad relativa a NIMIA y 1M6 en presencia de 40S (**Figuras R.12 y R.13**). Este lazo podría organizarse como un lazo tipo E, un motivo que se caracteriza por presentar una serie de interacciones consecutivas no canónicas de tipo G-A que conectan las dos hélices flanqueantes. Como resultado se forma un dúplex en el que las bases quedan apiladas. Al tratarse de interacciones entre nucleótidos de purina, se produce una distensión y ensanchamiento de la hélice, que se desvía de la estructura canónica A y favorece las transiciones y desplazamientos electrónicos entre los nucleótidos del lazo E (Correll et al., 1997; Dallas & Moore, 1997; Fox & Woese, 1975). Las características estructurales de los lazos E determinan sus propiedades funcionales como plataformas de unión a proteínas, así como lugares propicios para el establecimiento de interacciones a larga distancia RNA-RNA (L. A. Allison et al., 1991; Branch et al., 1995; Butcher & Burke, 1994; Leontis & Westhof, 1998). Además, los lazos tipo E son considerados organizadores de la arquitectura tridimensional del RNA (Butcher & Burke, 1994).

Los lazos tipo E son muy frecuentes en moléculas de RNA. El primer motivo tipo lazo E se describió en el rRNA 5S de *E. coli* (Fox & Woese, 1975). Desde entonces se han identificado numerosos ejemplos de este tipo de lazos, como el presente en el rRNA 23S, en la ribozima *hairpin* (Butcher & Burke, 1994), o en el subdominio III_d de la región IRES de HCV (Lukavsky et al., 2000). En el último caso, el lazo E depende de la formación de pares AA/AG y de una interacción Hoogsteen inversa

de tipo U+A (**Figura D.2A**) (Klinck et al., 2000). En WNV, la predicción de la estructura tridimensional del SL-III con el programa *RNAComposer* reveló que los nucleótidos G₁₀₆₁₇, A₁₀₆₁₈ y A₁₀₆₃₀ forman una interacción de triple base (**Figura D.2B y C**); mientras que el par A₁₀₆₁₉ y A₁₀₆₂₉ estabiliza la región distal de la hélice, al igual que ocurre en el lazo E del IRES de HCV (**Figura D.2A y B**). Las bases A₁₀₆₁₆ y G₁₀₆₃₁ quedan perpendiculares entre sí y expuestas hacia el exterior de la hélice (**Figura D.2C**), lo cual sugiere que podrían participar en el reclutamiento de factores proteicos y/o en el establecimiento de interacciones RNA–RNA a larga distancia.

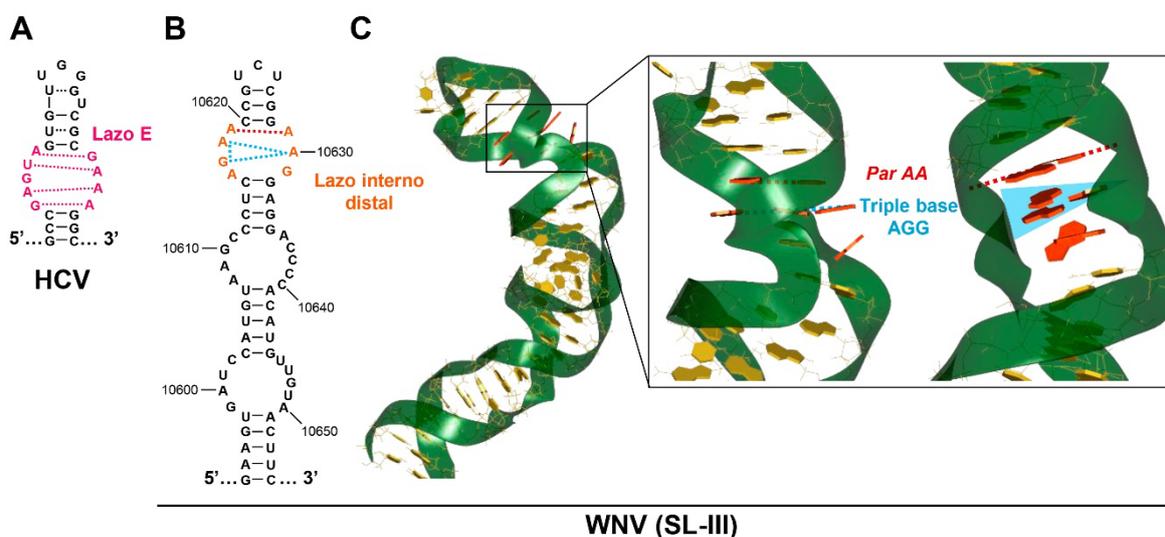


Figura D.2. Predicción de la estructura tridimensional del elemento SL-III de WNV. (A) Estructura secundaria y disposición del emparejamiento de bases en el lazo E descrito en el subdominio IIIId del IRES de HCV (Klinck et al., 2000). Las líneas punteadas representan interacciones no canónicas entre las bases. (B) Representación de la secuencia y la estructura secundaria teórica del elemento SL-III en WNV. En naranja se muestran los nucleótidos pertenecientes al lazo interno distal. Las líneas punteadas indican interacciones no canónicas predichas: en rojo, el par AA; y, en azul, la triple base AGG (C) Predicción de la estructura tridimensional del elemento 5'DB de WNV a partir de su estructura secundaria teórica (B) con el programa *RNAComposer* (Popenda et al., 2012). La visualización y edición de la estructura se realizó con *CCP4 molecular-graphics* (McNicholas et al., 2011). La imagen correspondiente al lazo interno distal se muestra ampliada para representar las interacciones indicadas en (B).

Resulta interesante el hecho de que el subdominio IIIId del IRES de HCV actúa como un lugar de interacción con la subunidad 40S para dirigir el inicio de la traducción independiente de cap. Para ello, interacciona directamente con el sitio E de 40S, promoviendo un cambio conformacional en la subunidad que favorece la liberación de eIF2 y el correcto acoplamiento en el codón de inicio de traducción, situado en 3' de este dominio (Locker et al., 2007). Este fenómeno es esencial para el

ensamblaje del complejo traduccional activo 80S. Extrapolando la información a WNV, se podría proponer que la unión del elemento SL-III a 40S provocaría un cambio conformacional en la subunidad ribosómica que podría estar relacionado con su translocación al extremo 5' en condiciones de estrés celular, en las que la mayor parte de eIF2 se encuentra fosforilado de manera estable con el fin de bloquear la traducción dependiente de cap (Holcik & Sonenberg, 2005). En estas condiciones, tanto WNV como otros flavivirus, podrían iniciar un proceso de traducción independiente de cap para eludir el control celular (Edgil et al., 2006; Song et al., 2019; T. Wang et al., 2020), y el reclutamiento directo de la subunidad 40S a través de la 3' UTR pasaría a desempeñar funciones diferentes a las ejercidas en condiciones "basales", en la que la síntesis de proteínas virales se llevaría a cabo de forma mayoritaria por el mecanismo de traducción dependiente de cap. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el elemento SL-III muestra una menor afinidad por el 40S en comparación con el sitio de unión identificado en el dominio II. Esto podría deberse a que el mecanismo independiente de cap no es preferente en condiciones en las que la traducción dependiente de cap se encuentra disponible como resultado de su menor eficiencia (Berzal-Herranz et al., 2022; Edgil et al., 2006; Song et al., 2019; T. Wang et al., 2020).

Los resultados de los ensayos de unión apoyan la idea de que la formación del doble *pseudoknot* PK3-PK4, presente en el dominio II, es necesaria para que se produzca la unión a 40S, independientemente de la presencia del sitio alternativo de unión en el elemento SL-III. De este modo, la construcción 3'WNV_10400-10900, la cual carece de las secuencias 3' de ambos PKs, así como de sHP y 3'SL, es incapaz de unir a la subunidad 40S (**Figura R.7**), mientras que el dominio II completo (RNA 3'WNV_10742-10950) muestra una eficiencia de unión similar a la del RNA 3'WNV (~60%), si bien la afinidad es significativamente menor ($K_d = 59,480 \pm 7,909$ nM; frente a $K_d = 17,595 \pm 1,233$ en 3'WNV) y la cooperatividad es nula (Hill = $1,307 \pm 0,205$), apoyando la existencia de un único sitio de unión en esta construcción. Este resultado también apunta a que 3'SL influye en la unión a 40S. De hecho, en la construcción 3'WNV_10742-11029, la cual añade el elemento 3'SL, no se detectó un incremento significativo ni en afinidad ($K_d = 45,521 \pm 2,677$ nM) ni en el rendimiento de la reacción ($B_{max} = 0,642 \pm 0,040$) con respecto a 3'WNV_10742-10950, pero sí se observó un aumento significativo en la cooperatividad (Hill = 2,339

$\pm 0,278$) (comparar **Figuras R.6** y **R.7**). Por tanto, aunque 3'SL no se une directamente a la subunidad 40S en ausencia del extremo 5' del genoma, tiene un papel en este reclutamiento. Mediante modelado tridimensional de los dominios II y III se observó que 3'SL está apilado de forma coaxial con sHP, liberando de esa manera la región que conecta 3'DB con sHP y favoreciendo el acceso para la formación del doble *pseudoknot* (**Figura D.3**). Este hecho también podría estar relacionado con la mejora en la cooperatividad dependiente de 3'SL.

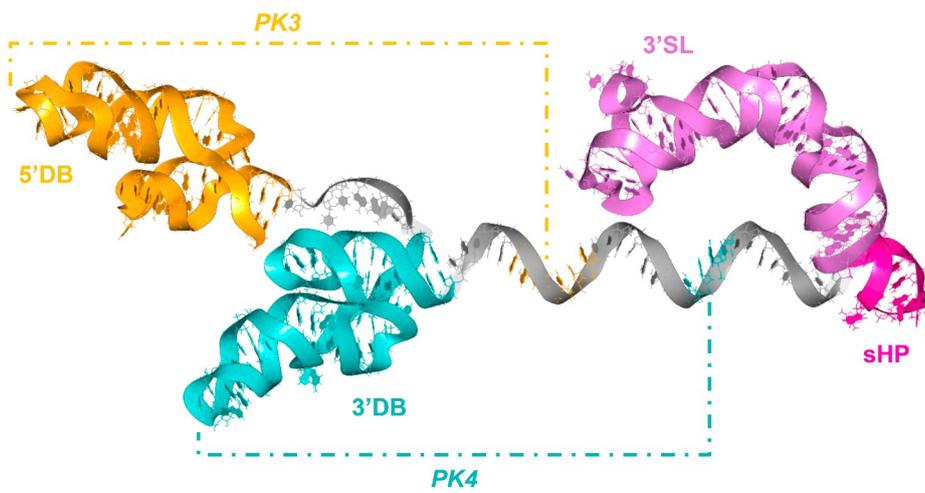


Figura D.3. Predicción de la estructura tridimensional de los dominios II y III de la 3' UTR de WNV. La predicción se realizó a partir de la estructura secundaria teórica de los dominios II y III de la 3' UTR de WNV con el programa *RNAComposer* (Popenda et al., 2012). La visualización y edición de la estructura se realizó con *CCP4 molecular-graphics* (McNicholas et al., 2011). En naranja se muestra el elemento 5'DB; en turquesa, 3'DB; en fucsia, sHP; en violeta, 3'SL; y, en gris, las regiones desapareadas que conectan los diferentes elementos estructurales. Los *pseudoknots* PK3 y PK4 se representan con líneas discontinuas en el mismo color que las secuencias implicadas en su formación.

Cabe destacar que la delección de PK3 conduce a un descenso del 50% en la eficiencia de traducción mientras que la eliminación de 3'SL provoca la pérdida del efecto potenciador que ejerce la 3' UTR de WNV sobre la traducción viral (**Figura R.22**). Este resultado es consistente con los obtenidos previamente por otros autores en DENV (Holden et al., 2006; Holden & Harris, 2004), y confirma que el elemento 3'SL contribuye a la síntesis de proteínas en diferentes flavivirus. Además, la combinación de los resultados obtenidos a partir de los ensayos de unión y de traducción ofrece una interesante correlación entre la unión de 40S a través de la 3' UTR y la contribución de los elementos estructurales específicos de la región en el control de la síntesis de proteínas, como se discutirá más adelante.

Con respecto a su potencial papel regulador, es interesante destacar las propiedades estructurales de PK3 y PK4. Los datos estructurales derivados de los ensayos de SHAPE sobre las construcciones subgenómicas muestran que, mientras que PK3 parece establemente formado; la formación de PK4 podría encontrarse comprometida independientemente de la presencia del extremo 5' del genoma (**Figura R.21A**). Este resultado apunta a la existencia de diferencias conformacionales entre PK3 y PK4, lo cual podría implicar diferencias como elementos reguladores, de modo que ambas estructuras no funcionarían como un bloque, como sucede con el doble *pseudoknot* descrito en el IRES de HCV (Niepmann & Gerresheim, 2020). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que PK3 y PK4 presentan una localización diferencial en MBFV. Como se describe en el apartado **I.2.4.2**, en la mayoría de los miembros del grupo, incluido WNV, los dos elementos DB interactúan con secuencias no estructuradas presentes en 3' de 3'DB para formar el doble *pseudoknot*; mientras que, en DENV, PK3 se forma con una secuencia ubicada en 5' de 3'DB. Por el contrario, en todos los MBFVs, la secuencia 3' de PK4 solapa con la secuencia de ciclación 3'CS (denominada 3'CYC en WNV). Y en YFV, tanto el ΨDB como el elemento DB forman *pseudoknots* solapantes con el motivo 3'CS (de Borba et al., 2019). Esta propiedad conservada en los MBFVs ha llevado a otros autores a proponer que PK4 actúa como un sensor de la interacción entre las secuencias 5' y 3'CYC regulando la transición entre la traducción y la replicación virales (Akiyama et al., 2020; de Borba et al., 2019).

El establecimiento de una conformación circular por parte de los mRNAs es un requisito para la traducción tanto dependiente como independiente de cap (Vicens et al., 2018). Esta conformación puede adquirirse por la formación de puentes proteicos que aproximen ambos extremos del RNA, por el establecimiento de interacciones RNA–RNA a larga distancia entre dichos extremos; o bien, por una combinación de ambos. En flavivirus, se ha descrito que las secuencias de ciclación no interactúan entre sí de forma estable durante la traducción viral (Sanford et al., 2019) (**I.2.5.1.**). Sin embargo, se desconoce si estas interacciones podrían tener lugar de forma intermitente, o si existen interacciones RNA–RNA alternativas entre ambos extremos del genoma que pudiesen mediar la circularización del RNA viral, favoreciendo así su traducción.

La interacción directa RNA–RNA entre los extremos 5' y 3' del RNA de WNV conduce a la comunicación de ambos, la cual se confirmó a través del análisis estructural de la 3' UTR en presencia (RNA m⁷G-WNV) y en ausencia (RNA m⁷G-FLuc-3'WNV) del extremo 5' (**Figura R.21**). La comparación de los perfiles de reactividad relativa puso de manifiesto la existencia de eventos de reordenación estructural en la 3' UTR en el motivo TL2, la secuencia conectora de 3'DB y sHP y el tallo de sHP, en presencia del extremo 5' del genoma. En general, se detectó un descenso en la reactividad de la secuencia entre 3'DB y sHP, mientras que en TL2 se observó un aumento (**Figura R.21A**). Estos resultados son compatibles con la ciclación de la molécula, aunque nuestros resultados no permiten descartar otras interacciones a larga distancia. De hecho, en DENV se ha descrito la existencia de una interacción RNA–RNA entre elementos estructurales localizados en la secuencia codificante de la proteína de la cápsida y el elemento 5'DB, la cual actuaría estabilizando la forma ciclada del genoma (de Borba et al., 2015). Además, los resultados están en línea con los descritos por otros autores en otros flavivirus (Akiyama et al., 2020; de Borba et al., 2019; Sztuba-Solinska et al., 2013), y apoyan la alternancia entre la formación de PK4 y el establecimiento de interacciones a larga distancia que implican a 3'CYC. Esto permitiría considerar a la región que contiene ambos elementos como un “sensor” de la interacción con el extremo 5', que podría regular la transición entre distintas conformaciones del genoma y, en última instancia, entre las distintas etapas del ciclo infectivo. En consonancia con esta hipótesis, el análisis de la estructura secundaria y de las interacciones RNA–RNA intramoleculares en el genoma de ZIKV *in vivo* reflejó que muchas interacciones a larga distancia son transitorias, de modo que cambian sus conformaciones a estados abiertos en diferentes condiciones (P. Li et al., 2018). Esto implica la existencia de elementos reguladores que controlan el equilibrio entre las distintas conformaciones del genoma. Nuestros datos apoyan el papel de la secuencia que incluye PK4 y 3'CYC como uno de estos elementos.

La influencia del extremo 5' sobre el plegamiento de la 3' UTR se mantuvo incluso en presencia de 40S. De este modo, en la comparación del perfil de reactividad relativa del complejo m⁷G-WNV-40S con respecto a m⁷G-FLuc-3'WNV-40S se continuaron detectando diferencias puntuales en la reactividad en posiciones cercanas a la secuencia 3' de PK4 y en sHP (**Figura R.21D**). De hecho, se observó

que los eventos de reorganización estructural en la 3' UTR inducidos por la presencia del extremo 5' condicionan el posicionamiento de la subunidad 40S y determinan la existencia de contactos adicionales. Una muestra de ello es el descenso significativo en reactividad observado en el lazo apical de 3'SL en presencia de 40S (**Figura R.21C**) en el RNA m⁷G-WNV, el cual no se detectó en ausencia del extremo 5'. El lazo apical de 3'SL está compuesto por un pentanucleótido conservado (5' CACAG 3') (Charlier et al., 2002; D. J. Gritsun et al., 2014; Mandl et al., 1993) que actúa como potenciador de la traducción y es una reconocida plataforma de interacción con factores celulares y virales (Albornoz et al., 2014; Emara & Brinton, 2007; García-Montalvo et al., 2004; Hodge et al., 2016; W. Li et al., 2002; Vashist et al., 2009) (**I.2.4.2.**). Los resultados presentados en este trabajo demuestran que también es capaz de contactar con la subunidad 40S, una observación que correlacionaría con los resultados que demuestran el papel de 3'SL en la traducción viral. La influencia del extremo 5' en el reclutamiento de 40S por la 3' UTR también se hizo patente en los experimentos de inhibición de extensión de cebador llevados a cabo con la construcción m⁷G-WNV (**Figura R.18**). Éstos revelaron la existencia de paradas específicas en presencia de 40S, absolutamente dependientes del extremo 5', en la base del elemento 3'SL, solapando con la secuencia de ciclación 3'UAR (**Figura R.19**). Estas paradas podrían ser el resultado de contactos adicionales de los elementos sHP-3'SL con la subunidad ribosómica cuando ésta es reclutada en los sitios de unión identificados en el dominio II y/o en SL-III. La presencia del extremo 5' parece favorecer la adquisición de la conformación apropiada para permitir el establecimiento de dichos contactos.

En resumen, estas observaciones sugieren la existencia de un efecto modulador de la estructura de la 3' UTR de WNV y del reclutamiento de la subunidad 40S mediado por el extremo 5' del genoma. Nuestros resultados apoyan que dicho efecto deriva del establecimiento de interacciones directas RNA–RNA a larga distancia entre ambos extremos del genoma viral. Éstas podrían formarse de manera intermitente para así regular la síntesis de proteínas virales, al igual que se ha descrito en la replicación viral (**I.2.5.2.**).

Los resultados de los ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre el extremo 5' demostraron que las interacciones RNA–RNA a larga distancia resultan en una comunicación que se manifiesta en ambos extremos del genoma. En ausencia de la 3' UTR, las paradas diferenciales en la extensión se observaron en 5' del motivo 5'CYC; mientras que la presencia de la 3' UTR provocó un desplazamiento de las mismas hacia 3' y la aparición de nuevas paradas en 3' de 5'CYC. Este fenómeno podría indicar que la 3' UTR contribuye a estabilizar la unión de 40S por el extremo 5' del genoma y condiciona su posicionamiento en el sitio de inicio de traducción (**Figura R.20**). El hecho de que el sitio de unión detectado en el extremo 5' del genoma no coincida de forma precisa con el codón de inicio puede deberse a las restricciones del modelo utilizado, ya que se ha descrito que la formación del complejo de preiniciación 48S y la fidelidad del reconocimiento del codón AUG dependen de distintos factores de la maquinaria traduccional (Obayashi et al., 2017; Querido et al., 2020; Valášek et al., 2004). En línea con este argumento, nuestros resultados indican que la unión del extremo 5' a 40S se produce con una eficiencia y afinidad menor a la mostrada por la 3' UTR, un hecho que se deduce a partir de los resultados de competición (**Figura R.4**). Esto llevaría a plantear la posibilidad de que la interacción 3' UTR-40S en WNV sería preferente en ausencia de otros factores. Sin embargo, el hecho de que se detecte unión de 40S al extremo 5' en ausencia de otros factores en los análisis de inhibición de extensión de cebador indica que esta interacción, aunque muestra una baja afinidad, es lo suficientemente estable para ser detectada en las condiciones experimentales aplicadas.

En conjunto, los resultados presentados, junto con los aportados por otros autores, implican que se requieren factores adicionales, tanto de naturaleza proteica como de RNA, para la unión efectiva de la subunidad 40S en el extremo 5'. Como novedad, los resultados aportados en este trabajo demuestran la existencia de una comunicación entre ambos extremos del genoma de WNV que participa en la unión de 40S. Esta propuesta conecta con otros modelos aún por completar, como el control de la traducción en HCV. En ese modelo, el reclutamiento de la subunidad 40S también está mediado y coordinado por diferentes elementos de RNA localizados en ambos extremos del genoma (Bai et al., 2013; Romero-López et al., 2018) (**I.4.4.**), pero aún se desconocen los mecanismos moleculares precisos que subyacen al control de la traducción.

La idea de que la comunicación entre los extremos 5' y 3' podría actuar como regulador del reclutamiento de la subunidad 40S y, en último término, como regulador de la traducción en WNV, se ve reforzado por la observación de que la potenciación de la traducción ejercida por la 3' UTR ocurre en líneas celulares de distinto origen (**Figura R.1**) e incluso este efecto potenciador puede detectarse en trans (Berzal-Herranz et al., 2022). Además, los resultados de traducción obtenidos con distintas variantes deletéreas para los elementos que reclutan 40S sugiere que esta comunicación es flexible y puede llegar a ser finamente regulable.

La eliminación del elemento 5'DB (m⁷G-WNV_d5'DB), identificado como el sitio de unión de alta afinidad por 40S, condujo a una reducción en la eficiencia de traducción (**Figura R.22**), lo cual coincide con los resultados previos obtenidos para el flavivirus DTMUV (T. Wang et al., 2020). Este dato permite hipotetizar que la unión a 40S a través de 5'DB podría operar como un regulador positivo que estaría en consonancia con la potenciación de la traducción detectada para la 3' UTR.

También la delección de 3'DB (m⁷G-WNV_d5'DB) provocó una disminución de ~50% en la eficiencia de traducción (**Figura R.22**). El efecto de 3'DB sobre la traducción podría estar mediado, al menos parcialmente, por el motivo de secuencia CS2. CS2 se encuentra altamente conservado en flavivirus y, en otro estudio realizado en DENV, la mutación de esta secuencia también provocó una reducción a la mitad de la eficiencia de traducción en células BHK-21 (Manzano et al., 2011). El análisis SHAPE puso de manifiesto la elevada reactividad de CS2 (**Figuras R.11 y R.12**), ya observada previamente por otros autores en DONGV y DENV (Akiyama et al., 2020). Este hecho indica que se trata de una secuencia inherentemente flexible desde el punto de vista conformacional, por lo que resulta tentador pensar que esta flexibilidad podría favorecer la formación de *pseudoknots*, la unión a proteínas y, en última instancia, la existencia de reordenamientos estructurales de mayor envergadura. De este modo, dada la conexión de CS2 con la estructura tipo *four-way* de 3'DB y su potencial para afectar a la estabilidad de PK4, es posible que la unión de factores proteicos a CS2 pudiese regular el equilibrio entre la formación de PK4 y la ciclación del genoma viral. Por otra parte, el análisis mediante HMX (**Figura R.14**) reveló que debe producirse una relajación de la estructura secundaria de 3'DB para que se produzca la interacción de la 3' UTR a la subunidad 40S, lo cual apoya

que el 3'DB es una unidad estructural dinámica que modifica su plegamiento en respuesta a las diferentes condiciones, posiblemente a través de CS2.

En lo que se refiere al elemento SL-III, su delección tuvo un efecto positivo sobre la eficiencia de traducción, por lo que se trata de un regulador negativo del proceso (**Figura R.22**). Este resultado apoya la idea de que la regulación traduccional es el resultado del equilibrio de efectos opuestos que implican elementos estructurales de la 3' UTR.

Los resultados anteriores sugieren diferentes escenarios a través de los cuales la 3' UTR logra la regulación de la traducción, lo cual implica no sólo el reclutamiento de factores celulares por elementos estructurales específicos con efectos opuestos sobre la traducción, sino también el establecimiento de contactos con el extremo 5' del genoma viral. Este fenómeno recuerda al descrito previamente en HCV para el control traduccional. En ese modelo se ha demostrado que existe un elemento localizado en 3' del ORF, denominado 5BSL3.2, el cual regula negativamente la traducción dependiente de IRES. El mecanismo molecular implicaría una interacción directa RNA-RNA entre 5BSL3.2 y el subdominio IIIId del extremo 5', así como la unión de la subunidad 40S a través de 5BSL3.2 (Romero-López et al., 2018; Romero-López & Berzal-Herranz, 2009, 2012). En WNV no se ha detectado ninguna interacción directa entre el dominio SL-III y el extremo 5', pero sí hemos demostrado una unión de baja afinidad a la subunidad 40S (**Figura R.17**). También resulta interesante el hecho de que miembros de diferentes géneros de la familia *Flaviviridae* conserven una regulación negativa del mecanismo de traducción ejercida a través de elementos estructurales específicos situados en el extremo 3' del RNA viral, y que estos estén implicados en el reclutamiento de 40S. Es posible que esto refleje una estrategia general de regulación de la traducción para todos los miembros de la familia.

El reclutamiento de la subunidad 40S por parte de la 3' UTR también se observó en los flavivirus DENV y YFV. En ambos casos, la unión de 40S fue más eficiente incluso que en WNV y el ajuste de los datos de unión reveló la ausencia de cooperatividad, lo cual podría indicar la existencia de un único sitio de unión en la 3' UTR (**Figura R.23**). El análisis mediante inhibición de extensión de cebador del RNA 3'DENV reveló la existencia de paradas específicas principalmente en la secuencia

conectora de SL-II (equivalente a SL-IV en WNV) y 5'DB (**Figura R.25B**), confirmando la unión de 40S por la 3' UTR de DENV. Este resultado demuestra que el reclutamiento de la subunidad ribosómica a través de la 3' UTR no es un mecanismo exclusivo de WNV y, por tanto, podría contribuir a la regulación de la traducción viral que ejerce el extremo 3' del genoma de flavivirus. Aunque, aparentemente, la localización exacta del sitio de unión a 40S en la 3' UTR no se conserva, el contexto estructural del mismo podría ser similar.

Por otra parte, los ensayos de inhibición de extensión de cebador sobre la construcción quimera m⁷G-5'WNV-3'DENV pusieron de manifiesto que la similitud entre ambos flavivirus no es suficiente para permitir la comunicación entre el extremo 5' del genoma de WNV y la 3' UTR de DENV como la que se ha descrito previamente en el RNA m⁷G-WNV. De este modo, en el extremo 5' de la construcción, las paradas específicas obtenidas en presencia de la 3' UTR de DENV fueron coincidentes con las obtenidas en ausencia de 3' UTR (RNA m⁷G-WNV_Δ3'UTR) (comparar **Figuras R.18B** y **R.23B**). Curiosamente, sí que se detectaron en la 3' UTR de DENV paradas en la base de 3'SL, solapando con la secuencia de ciclación 3'UAR, igual que ocurría en la 3' UTR de WNV. Este resultado apunta a que la homología entre ambos flavivirus es suficiente para que se produzca el efecto modulador de la estructura de la 3' UTR y de la unión a 40S mediado por el extremo 5' del genoma; pero no para estabilizar la unión de 40S en las proximidades del sitio de inicio de traducción. Es posible que este último fenómeno requiera de interacciones RNA-RNA a larga distancia adicionales que no se produzcan en la construcción quimérica.

El alineamiento múltiple de la secuencia de la 3' UTR de WNV, DENV y YFV (**Figura D.4**) pone de manifiesto la elevada conservación del motivo CS2, así como de las secuencias de ciclación 3'CYC y 3'DAR. Esto sugiere que sería posible la ciclación de la construcción quimérica m⁷G-5'WNV-3'DENV. Sin embargo, resulta llamativo el bajo grado de conservación de la secuencia 3'UAR. A pesar de que la ciclación de la molécula sería posible a través de las interacciones 5'-3'CYC y 5'-3'DAR, la ausencia de la interacción 5'-3'UAR explicaría que no se produjese el reposicionamiento de la subunidad 40S en el extremo 5'.

En base a nuestros resultados y a los previamente existentes en la literatura, se propone un modelo en el que el reclutamiento de la subunidad 40S a nivel del dominio II contribuye al inicio de nuevas rondas de traducción viral dependiente de cap. El reclutamiento de 40S a través del sitio de unión de alta afinidad en 5'DB se produciría gracias a la desestabilización de las hélices que constituyen el elemento 3'DB. En este proceso, además, juega un papel clave el *pseudoknot* PK3, cuya formación es crítica para que se produzca la interacción con 40S. El establecimiento de interacciones RNA–RNA a larga distancia, entre las que se encontraría la interacción 5'–3'CYC, determinaría una estructura global de la 3' UTR en la que se posibilitarían contactos adicionales entre el elemento 3'SL y la subunidad 40S, estabilizando así la unión. Es posible que a la interacción entre los extremos del genoma contribuyan también factores celulares, como PABP, cuya interacción con las secuencias que flanquean los elementos 5' y 3'DB ha demostrado promover la traducción en DENV (Polacek et al., 2009), así como otras interacciones RNA–RNA entre la 3' UTR y otros elementos del genoma.

La unión y posicionamiento de 40S en el extremo 5' del genoma estaría mediado por la 3' UTR, aunque también implicaría, necesariamente, factores proteicos, como eIF1A, que contribuirían al correcto posicionamiento de la subunidad. En ZIKV se ha descrito que la ciclación del genoma viral bloquea el inicio de la traducción al dificultar el proceso de *scanning* del complejo 43S y posterior reconocimiento del codon AUG (Sanford et al., 2019). Esto implica que las interacciones entre las secuencias de ciclación deben interrumpirse para que se produzca el posicionamiento de la subunidad 40S en el extremo 5'. Esta regulación podría ser llevada a cabo por el *pseudoknot* PK4, cuya formación competiría con la interacción 5'–3'CYC, impidiendo así la ciclación y facilitando el posicionamiento del ribosoma en el sitio de inicio de la traducción. De este modo, al igual que se ha descrito en la replicación viral (1.2.5.2.), se produciría un equilibrio dinámico entre la forma ciclada y “lineal” del genoma (entendiéndose como ausencia de interacciones entre las secuencias de ciclación, pero manteniendo la configuración circular) mediante la cual se permitiría el reclutamiento de 40S a través de los elementos estructurales de la 3' UTR.

Finalmente, la subunidad 40S sería liberada al extremo 5' del genoma para iniciar nuevas rondas de traducción, como se ha descrito en BYDV (Das Sharma et al., 2015) (I.3.3.1.). En etapas tardías de la traducción, podría producirse el reclutamiento de 40S a través del sitio de baja afinidad en SL-III con el objetivo de secuestrar a la subunidad ribosómica y facilitar así la transición a la etapa de replicación. También cabe la posibilidad de que la unión a 40S por el elemento SL-III cobrase importancia en el inicio de la traducción independiente de cap, como se ha propuesto previamente.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- La 3' UTR de WNV recluta de forma directa y específica a la subunidad ribosómica 40S. La unión ocurre a través de al menos dos sitios, que se ubican en el elemento SL-III y en el dominio II. Ambas uniones son dependientes de la formación del doble *pseudoknot* PK3 y PK4 y podrían tener implicaciones funcionales diferentes en el ciclo viral.
- Las proteínas ribosómicas RPS2, RPS3, RPS8, RPS9 y RPS11, implicadas en la organización del canal de entrada y salida del mRNA, interactúan directamente con la 3' UTR.
- La 3' UTR de WNV potencia la traducción viral dependiente e independiente de cap en células de mamífero y de mosquito. La delección de elementos estructurales presentes en la 3' UTR de WNV implicados en el reclutamiento de la subunidad 40S afecta a la eficiencia de la traducción viral.
- Existe una comunicación recíproca entre la 3' UTR y el extremo 5' del genoma de WNV que condiciona el reclutamiento de la subunidad 40S por la 3' UTR. El equilibrio conformacional de la 3' UTR regula la liberación de 40S al extremo 5' del genoma viral, contribuyendo así a la regulación de la traducción viral.
- El reclutamiento de la subunidad 40S por parte de la 3' UTR también se produce en los flavivirus DENV y YFV, sugiriendo que se trata de un mecanismo molecular común entre los miembros del género que podría estar implicado en la regulación de la traducción de *Flavivirus*.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy, E., & Glaunsinger, B. (2015). Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense. *Virology*, 479-480, 600-608. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.007>
- Acker, M. G., Shin, B. S., Dever, T. E., & Lorsch, J. R. (2006). Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8469-8475. <https://doi.org/10.1074/jbc.m600210200>
- Ackermann, M., & Padmanabhan, R. (2001). De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39926-39937. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104248200>
- Akiyama, B. M., Graham, M. E., O'donoghue, Z., David Beckham, J., & Kieft, J. S. (2020). Three-dimensional structure of a flavivirus dumbbell RNA reveals molecular details of an RNA regulator of replication. *bioRxiv*, 2020.09.17.300806. <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.300806>
- Albornoz, A., Carletti, T., Corazza, G., & Marcello, A. (2014). The Stress Granule Component TIA-1 Binds Tick-Borne Encephalitis Virus RNA and Is Recruited to Perinuclear Sites of Viral Replication To Inhibit Viral Translation. *Journal of Virology*, 88(12), 6611-6622. <https://doi.org/10.1128/jvi.03736-13>
- Alekhina, O. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., & Vassilenko, K. S. (2020). Functional Cyclization of Eukaryotic mRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1677. <https://doi.org/10.3390/ijms21051677>
- Algire, M. A., Maag, D., & Lorsch, J. R. (2005). Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Molecular Cell*, 20(2), 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.008>
- Ali, S., & Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2249-2254. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2249>
- Allison, L. A., Romaniuk, P. J., & Bakken, A. H. (1991). RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Developmental biology*, 144(1), 129-144. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90485-I](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90485-I)
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology*, 69(2), 695-700. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.2.695-700.1995>
- Alvarez, D. E., De Lella Ezcurra, A. L., Fucito, S., & Gamarnik, A. V. (2005a). Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, 339(2), 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.009>
- Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Pietrasanta, L. I., & Gamarnik, A. V. (2005b). Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(11), 6631-6643. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.11.6631-6643.2005>
- Alvarez, D. E., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2008). Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology*, 375(1), 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.014>
- Bai, Y., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2013). Hepatitis C virus 3'UTR regulates viral translation through direct interactions with the host translation machinery. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7861-7874. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt543>

- Bakhshesh, M., Gropelli, E., Willcocks, M. M., Royall, E., Belsham, G. J., & Roberts, L. O. (2008). The picornavirus avian encephalomyelitis virus possesses a hepatitis C virus-like internal ribosome entry site element. *Journal of virology*, 82(4), 1993-2003. <https://doi.org/10.1128/jvi.01957-07>
- Banijamali, E., Baronti, L., Becker, W., Sajkowska-Kozielewicz, J. J., Huang, T., Palka, C., Kosek, D., Sweetapple, L., Müller, J., Stone, M. D., Andersson, E. R., & Petzold, K. (2023). RNA:RNA interaction in ternary complexes resolved by chemical probing. *RNA (New York, N.Y.)*, 29(3), 317-329. <https://doi.org/10.1261/rna.079190.122>
- Barroso-delJesus, A., Lucena-Aguilar, G., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., & Menendez, P. (2011). The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(5), 1497-1508. <https://doi.org/10.1096/fj.10-172221>
- Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1524-1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Benarroch, D., Selisko, B., Locatelli, G. A., Maga, G., Romette, J. L., & Canard, B. (2004). The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*, 328(2), 208-218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.004>
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E. G., Mitchell, B. M., Granneman, S., & Baserga, S. J. (2004). The Small-Subunit Processome Is a Ribosome Assembly Intermediate. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1619. <https://doi.org/10.1128/ec.3.6.1619-1626.2004>
- Berry, K. E., Waghray, S., Mortimer, S. A., Bai, Y., & Doudna, J. A. (2011). Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning. *Structure (London, England: 1993)*, 19(10), 1456. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.002>
- Berzal-Herranz, A., Berzal-Herranz, B., Ramos-Lorente, S. E., & Romero-López, C. (2022). The Genomic 3' UTR of Flaviviruses Is a Translation Initiation Enhancer. *International journal of molecular sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158604>
- Berzal-Herranz, A., Romero-López, C., Berzal-Herranz, B., & Ramos-Lorente, S. (2019). Potential of the Other Genetic Information Coded by the Viral RNA Genomes as Antiviral Target. *Pharmaceuticals*, 12(1), 38. <https://doi.org/10.3390/ph12010038>
- Blackwell, J. L., & Brinton, M. A. (1997). Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *Journal of virology*, 71(9), 6433-6444. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6433-6444.1997>
- Blitvich, B. J., Firth, A. E., & Kuhn, J. H. (2017). A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses*, 9(6), 154. <https://doi.org/10.3390/v9060154>
- Bludau, I., & Aebersold, R. (2020). Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 327-340. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0231-2>
- Bradrick, S. S., Walters, R. W., & Gromeier, M. (2006). The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic acids research*, 34(4), 1293-1303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl019>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W., & Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>

- Branch, A. D., Levine, B. J., & Polaskova, J. A. (1995). An RNA tertiary structure of the hepatitis delta agent contains UV-sensitive bases U-712 and U-865 and can form in a bimolecular complex. *Nucleic Acids Research*, 23(3), 491-499. <https://doi.org/10.1093/nar/23.3.491>
- Brinton, M. A., & Dispoto, J. H. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*, 162(2), 290-299. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90468-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90468-0)
- Brinton, M. A., Fernandez, A. V., & Dispoto, J. H. (1986). The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology*, 153(1), 113-121. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90012-7)
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant molecular biology*, 32(1-2), 107-144. <https://doi.org/10.1007/bf00039380>
- Butcher, S. E., & Burke, J. M. (1994). A photo-cross-linkable tertiary structure motif found in functionally distinct RNA molecules is essential for catalytic function of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, 33(4), 992-999. <https://doi.org/10.1021/bi00170a018>
- Campos, R. K., Wong, B., Xie, X., Lu, Y.-F., Shi, P.-Y., Pompon, J., Garcia-Blanco, M. A., & Bradrick, S. S. (2017). RPLP1 and RPLP2 Are Essential Flavivirus Host Factors That Promote Early Viral Protein Accumulation. *Journal of Virology*, 91(4), 1706-1722. <https://doi.org/10.1128/jvi.01706-16>
- Castle, E., Nowak, T., Leidner, U., Wengler, G., & Wengler, G. (1985). Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV2 of the flavivirus West Nile virus and of the genome sequence for these proteins. *Virology*, 145(2), 227-236. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90156-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90156-4)
- Castle, E., & Wengler, G. (1987). Nucleotide sequence of the 5'-terminal untranslated part of the genome of the flavivirus West Nile virus. *Archives of virology*, 92(3-4), 309-313. <https://doi.org/10.1007/bf01317487>
- Cerikan, B., Goellner, S., Neufeldt, C. J., Haselmann, U., Mulder, K., Chatel-Chaix, L., Cortese, M., & Bartenschlager, R. (2020). A Non-Replicative Role of the 3' Terminal Sequence of the Dengue Virus Genome in Membranous Replication Organelle Formation. *Cell Reports*, 32(1), 107859. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107859>
- Chambers, T. J., Grakoui, A., & Rice, C. M. (1991). Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *Journal of virology*, 65(11), 6042-6050. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.11.6042-6050.1991>
- Charlier, N., Leyssen, P., Pleij, C. W. A., Lemey, P., Billoir, F., Van Laethem, K., Vandamme, A.-M., De Clercq, E., de Lamballerie, X., & Neyts, J. (2002). Complete genome sequence of Montana Myotis leukoencephalitis virus, phylogenetic analysis and comparative study of the 3' untranslated region of flaviviruses with no known vector. *Journal of General Virology*, 83(8), 1875-1885. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-1875>
- Chen, S. J. (2008). RNA Folding: Conformational Statistics, Folding Kinetics, and Ion Electrostatics. *Annual review of biophysics*, 37, 197-214. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125957>
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*, 3(8), 866-871. <https://doi.org/10.1038/nm0897-866>
- Chiu, W.-W., Kinney, R. M., & Dreher, T. W. (2005). Control of Translation by the 5'- and 3'-Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(13), 8303-8315. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8303-8315.2005>

- Chu, J. J. H., & Ng, M. L. (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of virology*, 78(19), 10543-10555. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10543-10555.2004>
- Chung, L., Bailey, D., Leen, E. N., Emmott, E. P., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., Curry, S., Locker, N., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus translation requires an interaction between the C Terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *The Journal of biological chemistry*, 289(31), 21738-21750. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.550657>
- Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A., & Khromykh, A. A. (2015). Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Research*, 206, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026>
- Clyde, K., Barrera, J., & Harris, E. (2008). The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology*, 379(2), 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.034>
- Clyde, K., & Harris, E. (2006). RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication. *Journal of Virology*, 80(5), 2170-2182. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.5.2170-2182.2006>
- Correll, C. C., Freeborn, B., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (1997). Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell*, 91(5), 705-712. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80457-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80457-2)
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Correspondence, R. B. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *CellReports*, 18, 2113-2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robison, R. A., Sando, T., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (2003). Fine Mapping of a cis-Acting Sequence Element in Yellow Fever Virus RNA That Is Required for RNA Replication and Cyclization. *Journal of Virology*, 77(3), 2265-2270. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.2265-2270.2003>
- Cuervo, P. F., Artigas, P., Mas-Coma, S., & Bargues, M. D. (2022). West Nile virus in Spain: Forecasting the geographical distribution of risky areas with an ecological niche modelling approach. *Transboundary and emerging diseases*, 69(4), e1113-e1129. <https://doi.org/10.1111/tbed.14398>
- Dai, X., Zhang, S., & Zaleta-Rivera, K. (2020). RNA: interactions drive functionalities. *Molecular Biology Reports*, 47(2), 1413-1434. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05230-7>
- Dallas, A., & Moore, P. B. (1997). The loop E-loop D region of Escherichia coli 5S rRNA: the solution structure reveals an unusual loop that may be important for binding ribosomal proteins. *Structure (London, England : 1993)*, 5(12), 1639-1653. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00311-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00311-0)
- Das Sharma, S., Kraft, J. J., Allen Miller, W., & Goss, D. J. (2015). Recruitment of the 40S Ribosome Subunit to the 3'-Untranslated Region (UTR) of a Viral mRNA, via the eIF4 Complex, Facilitates Cap-independent Translation. *Protein synthesis and degradation*, 290(18), 11268-11281. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.645002>
- Davis, C. W., Nguyen, H.-Y., Hanna, S. L., Sánchez, M. D., Doms, R. W., & Pierson, T. C. (2006). West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *Journal of virology*, 80(3), 1290-1301. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.3.1290-1301.2006>
- Davis, W. G., Basu, M., Elrod, E. J., Germann, M. W., & Brinton, M. A. (2013). Identification of cis-Acting Nucleotides and a Structural Feature in West Nile Virus 3'-Terminus RNA That Facilitate Viral Minus Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology*, 87(13), 7622-7636. <https://doi.org/10.1128/jvi.00212-13>

- Davis, W. G., Blackwell, J. L., Shi, P.-Y., & Brinton, M. A. (2007). Interaction between the Cellular Protein eEF1A and the 3'-Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Genomic RNA Facilitates Viral Minus-Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology*, 81(18), 10172-10187. <https://doi.org/10.1128/jvi.00531-07>
- de Araújo, T. V. B., Ximenes, R. A. de A., Miranda-Filho, D. de B., Souza, W. V., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., Valongueiro, S., de Albuquerque, M. de F. P. M., Braga, C., Filho, S. P. B., Cordeiro, M. T., Vazquez, E., Cruz, D. di C. S., Henriques, C. M. P., Bezerra, L. C. A., Castanha, P. M. da S., Dhalia, R., Marques-Júnior, E. T. A., Martelli, C. M. T., ... Felix Oliveira, V. (2018). Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 328-336. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30727-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30727-2)
- de Borba, L., Villordo, S. M., Iglesias, N. G., Filomatori, C. V., Gebhard, L. G., & Gamarnik, A. V. (2015). Overlapping Local and Long-Range RNA–RNA Interactions Modulate Dengue Virus Genome Cyclization and Replication. *Journal of Virology*, 89(6), 3430-3437. <https://doi.org/10.1128/jvi.02677-14>
- de Borba, L., Villordo, S. M., Marsico, F. L., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., Gebhard, L. G., Pallarés, H. M., Lequime, S., Lambrechts, L., Vargas, I. S., Blair, C. D., & Gamarnik, A. V. (2019). RNA structure duplication in the dengue virus 3' UTR: Redundancy or host specificity? *mBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02506-18>
- de Breyne, S., Simonet, V., Pelet, T., & Curran, J. (2003). Identification of a cis-acting element required for shunt-mediated translational initiation of the Sendai virus Y proteins. *Nucleic acids research*, 31(2), 608-618. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg143>
- De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepúlveda, N., & Del Angel, R. M. (2002). Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology*, 295(2), 337-347. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1407>
- Denny, S. K., & Greenleaf, W. J. (2019). Linking RNA Sequence, Structure, and Function on Massively Parallel High-Throughput Sequencers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032300>
- Dong, H., Zhang, B., & Shi, P. Y. (2008). Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein. *Virology*, 381(1), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.040>
- Du, Z., Alekhina, O. M., Vassilenko, K. S., & Simon, A. E. (2017). Concerted action of two 3' cap-independent translation enhancers increases the competitive strength of translated viral genomes. *Nucleic acids research*, 45(16), 9558-9572. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx643>
- Duan, Y. P., Zeng, M., Jiang, B., Zhang, W., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S. Q., Liu, Y. Y., Zhang, L., Yu, Y. L., Pan, L., Chen, S., & Cheng, A. (2019). Flavivirus RNA-dependent RNA polymerase interacts with genome UTRs and viral proteins to facilitate flavivirus RNA replication. *Viruses*, 11(10), 919. <https://doi.org/10.3390/v11100929>
- Edgil, D., Polacek, C., & Harris, E. (2006). Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology*, 80(6), 2976-2986. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.6.2976-2986.2006>
- Elghonemy, S., Davis, W. G., & Brinton, M. A. (2005). The majority of the nucleotides in the top loop of the genomic 3' terminal stem loop structure are cis-acting in a West Nile virus infectious clone. *Virology*, 331(2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.008>
- Elshuber, S., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Mandl, C. W. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *The Journal of general virology*, 84(1), 183-191. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18723-0>

- Emara, M. M., & Brinton, M. A. (2007). Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 9041-9046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703348104>
- Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Rátz, F., Skáre, J., & Bakonyi, T. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(2), 181-188. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>
- Erzberger, J. P., Stengel, F., Pellarin, R., Zhang, S., Schaefer, T., Aylett, C. H. S., Cimermančič, P., Boehringer, D., Sali, A., Aebersold, R., & Ban, N. (2014). Molecular Architecture of the 40S-eIF1-eIF3 Translation Initiation Complex. *Cell*, 158(5), 1123-1135. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.044>
- Fakim, H., & Fabian, M. R. (2019). Communication Is Key: 5'-3' Interactions that Regulate mRNA Translation and Turnover. *Advances in experimental medicine and biology*, 1203, 149-164. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31434-7_6
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M., & Lai, C. J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology*, 65(5), 2467-2475. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.5.2467-2475.1991>
- Filomatori, C. V., Iglesias, N. G., Villordo, S. M., Alvarez, D. E., & Gamarnik, A. V. (2011). RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6929-6939. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.162289>
- Filomatori, C. V., Lodeiro, M. F., Alvarez, D. E., Samsa, M. M., Pietrasanta, L., & Gamarnik, A. V. (2006). A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes and Development*, 20(16), 2238-2249. <https://doi.org/10.1101/gad.1444206>
- Flick, R., & Hobom, G. (1999). Transient bicistronic vRNA segments for indirect selection of recombinant influenza viruses. *Virology*, 262(1), 93-103. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9895>
- Fox, G. E., & Woese, C. R. (1975). 5S RNA secondary structure. *Nature*, 256(5517), 505-507. <https://doi.org/10.1038/256505A0>
- Fricke, M., Dünnes, N., Zayas, M., Bartenschlager, R., Niepmann, M., & Marz, M. (2015). Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(7), 1219-1232. <https://doi.org/10.1261/rna.049338.114>
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., & Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of virology*, 79(1), 380-392. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.1.380-392.2005>
- 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), 6103-6118. <https://doi.org/10.1128/jvi.02042-09>
- Friebe, P., Shi, P.-Y., & Harris, E. (2011). The 5' and 3' Downstream AUG Region Elements Are Required for Mosquito-Borne Flavivirus RNA Replication. *Journal of Virology*, 85(4), 1900-1905. <https://doi.org/10.1128/jvi.02037-10>
- Friedrich, S., Engelmann, S., Schmidt, T., Szczepankiewicz, G., Bergs, S., Liebert, U. G., Kümmerer, B. M., Golbik, R. P., & Behrens, S.-E. (2018). The Host Factor AUF1 p45 Supports Flavivirus Propagation by Triggering the RNA Switch Required for Viral Genome Cyclization. *Journal of Virology*, 92(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.01647-17>

- Fringer, J. M., Acker, M. G., Fekete, C. A., Lorsch, J. R., & Dever, T. E. (2007). Coupled Release of Eukaryotic Translation Initiation Factors 5B and 1A from 80S Ribosomes following Subunit Joining. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2384-2397. <https://doi.org/10.1128/mcb.02254-06>
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Melian, E. B., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P.-Y., & Khromykh, A. A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *Journal of virology*, 84(21), 11407-11417. <https://doi.org/10.1128/JVI.01159-10>
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & development*, 5(11), 2108-2116. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.2108>
- Galloway, A., & Cowling, V. H. (2019). mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.011>
- Gao, X., & Hardwidge, P. R. (2011). Ribosomal Protein S3: A Multifunctional Target of Attaching/Effacing Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00137>
- García-Blanco, M. A., Vasudevan, S. G., Bradrick, S. S., & Nicchitta, C. (2016). Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Research*, 134, 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>
- García-Montalvo, B. M., Medina, F., & Del Angel, R. M. (2004). La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Research*, 102(2), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.024>
- García-Moreno, M., Sanz, M. A., & Carrasco, L. (2016). A Viral mRNA Motif at the 3'-Untranslated Region that Confers Translatability in a Cell-Specific Manner. Implications for Virus Evolution. *Scientific reports*, 6. 19217. <https://doi.org/10.1038/srep19217>
- Gazo, B. M., Murphy, P., Gatchel, J. R., & Browning, K. S. (2004). A novel interaction of Cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), 13584-13592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311361200>
- Gherghe, C. M., Mortimer, S. A., Krahn, J. M., Thompson, N. L., & Weeks, K. M. (2008). Slow conformational dynamics at C2'-endo nucleotides in RNA. *Journal of the American Chemical Society*, 130(28), 8884-8885. <https://doi.org/10.1021/ja802691e>
- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of virology*, 84(20), 10438-10447. <https://doi.org/10.1128/jvi.00986-10>
- Gomila, R. C., Martin, G. W., & Gehrke, L. (2011). NF90 binds the dengue virus RNA 3' terminus and is a positive regulator of dengue virus replication. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016687>
- González-Almela, E., Williams, H., Sanz, M. A., & Carrasco, L. (2018). The Initiation Factors eIF2, eIF2A, eIF2D, eIF4A, and eIF4G Are Not Involved in Translation Driven by Hepatitis C Virus IRES in Human Cells. *Frontiers in microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00207>
- Graifer, D., Malygin, A., Zharkov, D. O., & Karpova, G. (2014). Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes. *Biochimie*, 99(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.001>
- Gritsun, D. J., Jones, I. M., Gould, E. A., & Gritsun, T. S. (2014). Molecular Archaeology of Flaviviridae Untranslated Regions: Duplicated RNA Structures in the Replication Enhancer of Flaviviruses and Pestiviruses Emerged via Convergent Evolution. *PLoS ONE*, 9(3), e92056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092056>

- Gritsun, T. S., & Gould, E. A. (2007a). Direct repeats in the flavivirus 3' untranslated region; a strategy for survival in the environment? *Virology*, 358(2), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.033>
- Gritsun, T. S., & Gould, E. A. (2007b). Origin and evolution of flavivirus 5'UTRs and panhandles: Trans-terminal duplications? *Virology*, 366(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.011>
- Gritsun, T. S., Venugopal, K., Zanotto, P. M. D. A., Mikhailov, M. V., Sall, A. A., Holmes, E. C., Polkinghorne, I., Frolova, T. V., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A. (1997). Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: Analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Research*, 49(1), 27-39. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(97\)01451-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(97)01451-2)
- Hahn, C. S., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1987). Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *Journal of Molecular Biology*, 198(1), 33-41. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90455-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90455-4)
- Hashem, Y., Des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H. Y., Grassucci, R. A., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., & Frank, J. (2013). Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature*, 503(7477), 539-543. <https://doi.org/10.1038/nature12658>
- Havkin-Solomon, T., Itzhaki, E., Joffe, N., Reuven, N., Shaul, Y., & Dikstein, R. (2023). Selective translational control of cellular and viral mRNAs by RPS3 mRNA binding. *Nucleic acids research*, 51(9), 4208-4222. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad269>
- Hendrix, D. K., Brenner, S. E., & Holbrook, S. R. (2005). RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Quarterly reviews of biophysics*, 38(3), 221-243. <https://doi.org/10.1017/s0033583506004215>
- Higgs, S., Schneider, B. S., Vanlandingham, D. L., Klingler, K. A., & Gould, E. A. (2005). Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8871-8874. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503835102>
- Higuera, A., & Ramírez, J. D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Tropica*, 190, 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 779-812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
- Hinnebusch, A. G. (2017). Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends in biochemical sciences*, 42(8), 589-611. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.03.004>
- Höchsmann, M., Voss, B., & Giegerich, R. (2004). Pure multiple RNA secondary structure alignments: a progressive profile approach. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*, 1(1), 53-62. <https://doi.org/10.1109/tcbb.2004.11>
- Hodge, K., Kamkaew, M., Pisitkun, T., & Chimnaronk, S. (2019). Flavors of Flaviviral RNA Structure: towards an Integrated View of RNA Function from Translation through Encapsidation. *BioEssays*, 41(8). <https://doi.org/10.1002/bies.201900003>
- Hodge, K., Tunghirun, C., Kamkaew, M., Limjindaporn, T., Yenchitsomanus, P. T., & Chimnaronk, S. (2016). Identification of a conserved RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)-RNA interface required for flaviviral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33), 17437-17449. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.724013>
- Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 318-327. <https://doi.org/10.1038/nrm1618>

- Holden, K. L., & Harris, E. (2004). Enhancement of dengue virus translation: Role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology*, 329(1), 119-133. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.004>
- Holden, K. L., Stein, D. A., Pierson, T. C., Ahmed, A. A., Clyde, K., Iversen, P. L., & Harris, E. (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*, 344(2), 439-452. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.034>
- Homan, P. J., Tandon, A., Rice, G. M., Ding, F., Dokholyan, N. V., & Weeks, K. M. (2014). RNA tertiary structure analysis by 2'-hydroxyl molecular interference. *Biochemistry*, 53(43), 6825-6833. <https://doi.org/10.1021/bi501218g>
- Hsu, M. T., Kung, H. J., & Davidson, N. (1974). An electron microscope study of Sindbis virus RNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 38, 943-950. <https://doi.org/10.1101/sqb.1974.038.01.096>
- Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 643. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>
- Huber, R. G., Lim, X. N., Ng, W. C., Sim, A. Y. L., Poh, H. X., Shen, Y., Lim, S. Y., Sundstrom, K. B., Sun, X., Aw, J. G., Too, H. K., Boey, P. H., Wilm, A., Chawla, T., Choy, M. M., Jiang, L., de Sessions, P. F., Loh, X. J., Alonso, S., ... Wan, Y. (2019). Structure mapping of dengue and Zika viruses reveals functional long-range interactions. *Nature Communications*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09391-8>
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S. E., & Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(12), 2340-2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Ito, T., Tahara, S. M., & Lai, M. M. C. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *Journal of virology*, 72(11), 8789-8796. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8789-8796.1998>
- Jaafar, Z. A., & Kieft, J. S. (2019). Viral RNA structure-based strategies to manipulate translation. *Nature reviews. Microbiology*, 17(2), 110-123. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0117-x>
- Jaafar, Z. A., Oguro, A., Nakamura, Y., & Kieft, J. S. (2016). Translation initiation by the hepatitis C virus IRES requires eIF1A and ribosomal complex remodeling. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.21198>
- Jan, E., Mohr, I., & Walsh, D. (2016). A Cap-to-Tail Guide to mRNA Translation Strategies in Virus-Infected Cells. *Annual review of virology*, 3(1), 283-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055014>
- Jang, C. Y., Kim, H. D., & Kim, J. (2012a). Ribosomal protein S3 interacts with TRADD to induce apoptosis through caspase dependent JNK activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(3), 474-478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.020>
- Jang, C. Y., Kim, H. D., Zhang, X., Chang, J. S., & Kim, J. (2012b). Ribosomal protein S3 localizes on the mitotic spindle and functions as a microtubule associated protein in mitosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 429(1-2), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.093>
- Jang, C. Y., Lee, J. Y., & Kim, J. (2004). RpS3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis. *FEBS Letters*, 560(1-3), 81-85. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00074-2)
- Kaminski, A., Pöyry, T. A. A., Skene, P. J., & Jackson, R. J. (2010). Mechanism of initiation site selection promoted by the human rhinovirus 2 internal ribosome entry site. *Journal of virology*, 84(13), 6578-6589. <https://doi.org/10.1128/jvi.00123-10>

- Karabiber, F., McGinnis, J. L., Favorov, O. V., & Weeks, K. M. (2013). QuShape: rapid, accurate, and best-practices quantification of nucleic acid probing information, resolved by capillary electrophoresis. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(1), 63-73. <https://doi.org/10.1261/rna.036327.112>
- Kaufusi, P. H., Kelley, J. F., Yanagihara, R., & Nerurkar, V. R. (2014). Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B. *PloS one*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084040>
- Khromykh, A. A., Kondratieva, N., Sgro, J.-Y., Palmenberg, A., & Westaway, E. G. (2003). Significance in Replication of the Terminal Nucleotides of the Flavivirus Genome. *Journal of Virology*, 77(19), 10623-10629. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10623-10629.2003>
- Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J., & Westaway, E. G. (2001). Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *Journal of Virology*, 75(14), 6719-6728. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6719-6728.2001>
- Khromykh, A. A., Westaway, E. G., & Sakzewski, A. (1994). Completion of Kunjin Virus RNA Sequence and Recovery of an Infectious RNA Transcribed from Stably Cloned Full-Length cDNA. *Journal of Virology*, 68(7), 4580-4588. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4580-4588.1994>
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., & Doudna, J. A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(2), 194-206. <https://doi.org/10.1017/s1355838201001790>
- Kim, S. Y., Lee, M. Y., Cho, K. C., Choi, Y. S., Choi, J. S., Sung, K. W., Kwon, O. J., Kim, H. S., Kim, I. K., & Jeong, S. W. (2003). Alterations in mRNA expression of ribosomal protein S9 in hydrogen peroxide-treated neurotumor cells and in rat hippocampus after transient ischemia. *Neurochemical research*, 28(6), 925-931. <https://doi.org/10.1023/a:1023283628454>
- Klinck, R., Westhof, E., Walker, S., Afshar, M., Collier, A., & Aboul-Ela, F. (2000). A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA*, 6(10), 1423-1431. <https://doi.org/10.1017/s1355838200000935>
- Kohl, A., Dunn, E. F., Lowen, A. C., & Elliott, R. M. (2004). Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *The Journal of general virology*, 85(11), 3269-3278. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80407-0>
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283-292. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
- Kozak, M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8301-8305. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8301>
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299(1-2), 1-34. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)01056-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)01056-9)
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717-725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kwan, T., & Thompson, S. R. (2019). Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032672>

- Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., ... Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5448), 2333-2337. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2333>
- Latorre, P., Kolakofsky, D., & Curran, J. (1998). Sendai virus Y proteins are initiated by a ribosomal shunt. *Molecular and cellular biology*, 18(9), 5021-5031. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.9.5021>
- Lee, H., Shin, H., Wimmer, E., & Paul, A. V. (2004). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology*, 78(20), 10865-10877. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.20.10865-10877.2004>
- Lee, S. B., Kwon, I. S., Park, J., Lee, K. H., Ahn, Y., Lee, C., Kim, J., Choi, S. Y., Cho, S. W., & Ahn, J. Y. (2010). Ribosomal Protein S3, a New Substrate of Akt, Serves as a Signal Mediator between Neuronal Apoptosis and DNA Repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(38), 29457. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.131367>
- Leen, E. N., Sorgeloos, F., Correia, S., Chaudhry, Y., Cannac, F., Pastore, C., Xu, Y., Graham, S. C., Matthews, S. J., Goodfellow, I. G., & Curry, S. (2016). A Conserved Interaction between a C-Terminal Motif in Norovirus VPg and the HEAT-1 Domain of eIF4G Is Essential for Translation Initiation. *PLoS pathogens*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005379>
- Leontis, N. B., Lescoute, A., & Westhof, E. (2006). The building blocks and motifs of RNA architecture. *Current opinion in structural biology*, 16(3), 279. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.009>
- Leontis, N. B., & Westhof, E. (1998). A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs. *Journal of molecular biology*, 283(3), 571-583. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2106>
- Leontis, N. B., & Westhof, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(4), 499-512. <https://doi.org/10.1017/s1355838201002515>
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1999). The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of virology*, 73(4), 3108-3116. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.4.3108-3116.1999>
- Li, P., Wei, Y., Mei, M., Tang, L., Sun, L., Huang, W., Zhou, J., Zou, C., Zhang, S., Qin, C. F., Jiang, T., Dai, J., Tan, X., & Zhang, Q. C. (2018). Integrative Analysis of Zika Virus Genome RNA Structure Reveals Critical Determinants of Viral Infectivity. *Cell host & microbe*, 24(6), 875-886.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.011>
- Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K. M., Moreno, G. T., & Brinton, M. A. (2002). Cell Proteins TIA-1 and TIAR Interact with the 3' Stem-Loop of the West Nile Virus Complementary Minus-Strand RNA and Facilitate Virus Replication. *Journal of Virology*, 76(23), 11989-12000. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.11989-12000.2002>
- Li, X.-D., Deng, C.-L., Yuan, Z.-M., Ye, H.-Q., & Zhang, B. (2019). Different Degrees of 5'-to-3' DAR Interactions Modulate Zika Virus Genome Cyclization and Host-Specific Replication. *Journal of Virology*, 94(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.01602-19>
- Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J., & Rice, C. M. (2006). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. D. M. Knipe and P. M. Howley (Ed.), *Fields Virology* (5th ed., pp. 1101-1133). Lippincott-Raven Publishers.
- Lindström, M. S., & Zhang, Y. (2008). Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15568. <https://doi.org/10.1074/jbc.m801151200>

- Liu, Y., Zhang, Y., Wang, M., Cheng, A., Yang, Q., Wu, Y., Jia, R., Liu, M., Zhu, D., Chen, S., Zhang, S., Zhao, X. X., Huang, J., Mao, S., Ou, X., Gao, Q., Wang, Y., Xu, Z., Chen, Z., ... Chen, X. (2020). Structures and Functions of the 3' Untranslated Regions of Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses Infecting Humans and Animals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00453>
- Liu, Z.-Y., & Zhao, H. (2013). Novel cis-Acting Element within the Capsid-Coding Region Enhances Flavivirus Viral-RNA Replication by Regulating Genome Cyclization. *Journal of Virology*, 87(12), 6804–6818. <https://doi.org/10.1128/jvi.00243-13>
- Liu, Z.-Y., Li, X. F., Jiang, T., Deng, Y. Q., Ye, Q., Zhao, H., Yu, J. Y., & Qin, C. F. (2016). Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *eLife*, 5, e17636. <https://doi.org/10.7554/elife.17636>
- Liu, Z.-Y., & Qin, C. F. (2020). Structure and function of cis-acting RNA elements of flavivirus. *En Reviews in Medical Virology*, 30(1), e2092. <https://doi.org/10.1002/rmv.2092>
- Llácer, J. L., Hussain, T., Marler, L., Aitken, C. E., Thakur, A., Lorsch, J. R., Hinnebusch, A. G., & Ramakrishnan, V. (2015). Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex. *Molecular Cell*, 59(3), 399-412. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.033>
- Llorente, F. (2023). West Nile Virus Infection. *Pathogens*, 12(2), 151. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020151>
- Lo, M. K., Tilgner, M., Bernard, K. A., & Shi, P.-Y. (2003). Functional Analysis of Mosquito-Borne Flavivirus Conserved Sequence Elements within 3' Untranslated Region of West Nile Virus by Use of a Reporting Replicon That Differentiates between Viral Translation and RNA Replication. *Journal of Virology*, 77(18), 10004-10014. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.18.10004-10014.2003>
- Locker, N., Easton, L. E., & Lukavsky, P. J. (2007). HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO Journal*, 26(3), 795-805. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601549>
- Lodeiro, M. F., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2009). Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. *Journal of Virology*, 83(2), 993-1008. <https://doi.org/10.1128/jvi.01647-08>
- Lomakin, I. B., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2000). Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Molecular and cellular biology*, 20(16), 6019-6029. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.16.6019-6029.2000>
- Lomakin, I. B., & Steitz, T. A. (2013). The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature*, 500(7462), 307-311. <https://doi.org/10.1038/nature12355>
- Lukavsky, P. J., Otto, G. A., Lancaster, A. M., Sarnow, P., & Puglisi, J. D. (2000). Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nature Structural Biology*, 7(12), 1105-1110. <https://doi.org/10.1038/81951>
- Lytle, J. R., Wu, L., & Robertson, H. D. (2002). Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40S subunit binding. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(8), 1045-1055. <https://doi.org/10.1017/s1355838202029965>
- Mailliot, J., & Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9(2). <https://doi.org/10.1002/wrna.1458>
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1993). Complete genomic sequence of powassan virus: Evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology*, 194(1), 173-184. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1247>

- Manzano, M., Reichert, E. D., Polo, S., Falgout, B., Kasprzak, W., Shapiro, B. A., & Padmanabhan, R. (2011). Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22521-22534. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.234302>
- Markoff, L. (2003). 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Advances in Virus Research*, 59, 177-228. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59006-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59006-6)
- Martín-Acebes, M. A., & Saiz, J. C. (2011). A West Nile virus mutant with increased resistance to acid-induced inactivation. *The Journal of general virology*, 92(4), 831-840. <https://doi.org/10.1099/vir.0.027185-0>
- Martinez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., & Embarek, A. M. (2018). Insights into Structural and Mechanistic Features of Viral IRES Elements. *Frontiers in microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02629>
- Martini, J. W. R., & Habeck, M. (2015). Comparison of the kinetics of different Markov models for ligand binding under varying conditions. *The Journal of chemical physics*, 142(9). <https://doi.org/10.1063/1.4908531>
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J., & Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nature Reviews Genetics*, 9(11), 843-854. <https://doi.org/10.1038/nrg2438>
- Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in Genetics*, 9, 595. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00595>
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S., & Noble, M. E. M. (2011). Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(4), 386-394. <https://doi.org/10.1107/s0907444911007281>
- Men, R., Bray, M., Clark, D., Chanock, R. M., & Lai, C. J. (1996). Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *Journal of virology*, 70(6), 3930-3937. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.6.3930-3937.1996>
- Merrick, W. C., & Pavitt, G. D. (2018). Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>
- Meyer, A., Freier, M., Schmidt, T., Rostowski, K., Zwoch, J., Lilie, H., Behrens, S. E., & Friedrich, S. (2020). An RNA thermometer activity of the West Nile virus genomic 3'-terminal stem-loop element modulates viral replication efficiency during host switching. *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/v12010104>
- Miller, W. A., Shen, R., Staplin, W., & Kanodia, P. (2016). Noncoding RNAs of Plant Viruses and Viroids: Sponges of Host Translation and RNA Interference Machinery. *Molecular plant-microbe interactions*, 29(3), 156-164. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-15-0226-fi>
- Mir, M. A., Brown, B., Hjelle, B., Duran, W. A., & Panganiban, A. T. (2006). Hantavirus N Protein Exhibits Genus-Specific Recognition of the Viral RNA Panhandle. *Journal of Virology*, 80(22), 11283-11292. doi: 10.1128/JVI.00820-06.
- Mir, M. A., & Panganiban, A. T. (2005). The hantavirus nucleocapsid protein recognizes specific features of the viral RNA panhandle and is altered in conformation upon RNA binding. *Journal of virology*, 79(3), 1824-1835. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1824-1835.2005>
- Mortimer, S. A., & Weeks, K. M. (2009). Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nature Protocols*, 4(10), 1413-1421. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.126>

- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*, 98(2), 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Mundus, D. A., Bulygin, K. N., Yamkovoy, V. I., Malygin, A. A., Repkova, M. N., Vratskikh, L. V., Venijaminova, A. G., Vladimirov, S. N., & Karpova, G. G. (1993). Structural arrangement of the codon-anticodon interaction area in human placenta ribosomes. Affinity labelling of the 40S subunits by derivatives of oligoribonucleotides containing the AUG codon. *Biochimica et biophysica acta*, 1173(3), 273-282. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90124-v](https://doi.org/10.1016/0167-4781(93)90124-v)
- Mutebi, J.-P., Rijnbrand, R. C. A., Wang, H., Ryman, K. D., Wang, E., Fulop, L. D., Titball, R., & Barrett, A. D. T. (2004). Genetic Relationships and Evolution of Genotypes of Yellow Fever Virus and Other Members of the Yellow Fever Virus Group within the Flavivirus Genus Based on the 3' Noncoding Region. *Journal of Virology*, 78(18), 9652-9665. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.18.9652-9665.2004>
- Nadano, D., Aoki, C., Yoshinaka, T., Irie, S., & Sato, T. A. (2001). Electrophoretic characterization of ribosomal subunits and proteins in apoptosis: specific downregulation of S11 in staurosporine-treated human breast carcinoma cells. *Biochemistry*, 40(50), 15184-15193. <https://doi.org/10.1021/bi0108397>
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Publishing Group*, 16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Nicholson, B. L., & White, K. A. (2014). Functional long-range RNA–RNA interactions in positive-strand RNA viruses. *Nature reviews. Microbiology*, 12(7), 493-504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3288>
- Nicholson, B. L., Wu, B., Chevtchenko, I., & White, K. A. (2010). Tombusvirus recruitment of host translational machinery via the 3' UTR. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(7), 1402-1419. <https://doi.org/10.1261/rna.2135210>
- Nicholson, B. L., Zaslaver, O., Mayberry, L. K., Browning, K. S., & White, K. A. (2013). Tombusvirus Y-shaped translational enhancer forms a complex with eIF4F and can be functionally replaced by heterologous translational enhancers. *Journal of virology*, 87(3), 1872-1883. <https://doi.org/10.1128/jvi.02711-12>
- Niepmann, M., & Gerresheim, G. K. (2020). Hepatitis C Virus Translation Regulation. *International journal of molecular sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072328>
- Nowak, T., Färber, P. M., Wengler, G., & Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, 169(2), 365-376. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90162-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90162-1)
- Obayashi, E., Luna, R. E., Nagata, T., Martin-Marcos, P., Hiraishi, H., Singh, C. R., Erzberger, J. P., Zhang, F., Arthanari, H., Morris, J., Pellarin, R., Moore, C., Harmon, I., Papadopoulos, E., Yoshida, H., Nasr, M. L., Unzai, S., Thompson, B., Aube, E., ... Asano, K. (2017). Molecular Landscape of the Ribosome Pre-initiation Complex during mRNA Scanning: Structural Role for eIF3c and Its Control by eIF5. *Cell reports*, 18(11), 2651-2663. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.052>
- Ochsenreiter, R., Hofacker, I. L., & Wolfinger, M. T. (2019). Functional RNA Structures in the 3' UTR of Tick-Borne, Insect-Specific and No-Known-Vector Flaviviruses. *Viruses*, 11(298). <https://doi.org/10.3390/v11030298>
- Olsthoorn, R. C., & Bol, J. F. (2001). Sequence comparison and secondary structure analysis of the 3' noncoding region of flavivirus genomes reveals multiple pseudoknots. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(10), 1370-1377. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.14.6719-6728.2001>

- Ooi, Y. S., Majzoub, K., Flynn, R. A., Mata, M. A., Diep, J., Li, J. K., van Buuren, N., Rumachik, N., Johnson, A. G., Puschnik, A. S., Marceau, C. D., Mlera, L., Grabowski, J. M., Kirkegaard, K., Bloom, M. E., Sarnow, P., Bertozzi, C. R., & Carette, J. E. (2019). An RNA-centric dissection of host complexes controlling flavivirus infection. *Nature microbiology*, 4(12), 2369-2382. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0518-2>
- Otto, G. A., Lukavsky, P. J., Lancaster, A. M., Sarnow, P., & Puglisi, J. D. (2002). Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(7), 913-923. <https://doi.org/10.1017/s1355838202022057>
- Paranjape, S. M., & Harris, E. (2007). Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30497-30508. <https://doi.org/10.1074/jbc.m705755200>
- Parsyan, A., Svitkin, Y., Shahbazian, D., Gkogkas, C., Lasko, P., Merrick, W. C., & Sonenberg, N. (2011). mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4), 235-245. <https://doi.org/10.1038/nrm3083>
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A. A., Lorsch, J. R., & Ramakrishnan, V. (2007). The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Molecular Cell*, 26(1), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.018>
- Patton, J. T. (2001). Rotavirus RNA Replication and Gene Expression. *Novartis Foundation Symposium*, 238, 64-81. <https://doi.org/10.1002/0470846534.ch5>
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320-325. <https://doi.org/10.1038/334320a0>
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (2019). The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annual review of biochemistry*, 88, 307-335. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111042>
- Perez, M., & de la Torre, J. C. (2003). Characterization of the Genomic Promoter of the Prototypic Arenavirus Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology*, 77(2), 1184-1194. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.1184-1194.2003>
- Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., & Shatsky, I. N. (1996a). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Molecular and cellular biology*, 16(12), 6859-6869. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.6859>
- Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., & Hellen, C. U. T. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, 403(6767), 332-335. <https://doi.org/10.1038/35002118>
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., & Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & development*, 12(1), 67-83. <https://doi.org/10.1101/gad.12.1.67>
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., & Hellen, C. U. T. (1996b). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Molecular and cellular biology*, 16(12), 6870-6878. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.6870>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The Continued Emerging Threat of Flaviviruses. *Nature microbiology*, 5(6), 796. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>

- Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P. Y., Hall, R. A., & Khromykh, A. A. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host and Microbe*, 4(6), 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007>
- Pirakitikulr, N., Kohlway, A., Lindenbach, B. D., & Pyle, A. M. (2016). The Coding Region of the HCV Genome Contains a Network of Regulatory RNA Structures. *Molecular cell*, 62(1), 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.024>
- Pisarev, A. V., Chard, L. S., Kaku, Y., Johns, H. L., Shatsky, I. N., & Belsham, G. J. (2004). Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *Journal of virology*, 78(9), 4487-4497. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4487-4497.2004>
- Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2008). Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *The EMBO journal*, 27(11), 1609-1621. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.90>
- Pisarev, A. V., Unbehauen, A., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2007). Assembly and Analysis of Eukaryotic Translation Initiation Complexes. *Methods in Enzymology*, 430, 147-177. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(07\)30007-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(07)30007-4)
- Pnueli, L., & Arava, Y. (2007). Genome-wide polysomal analysis of a yeast strain with mutated ribosomal protein S9. *BMC Genomics*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-285>
- Polacek, C., Friebe, P., & Harris, E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *Journal of General Virology*, 90(3), 687-692. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007021-0>
- Poncet, D., Laurent, S., & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO journal*, 13(17), 4165-4173. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06734.x>
- Popenda, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K. J., Lukasiak, P., Bartol, N., Blazewicz, J., & Adamiak, R. W. (2012). Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Research*, 40(14), e112-e112. <https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
- Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature structural & molecular biology*, 24(2), 184-186. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3352>
- Proutski, V., Gaunt, M. W., Gould, E. A., & Holmes, E. C. (1997a). Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: Implications for virulence, attenuation and vaccine development. *Journal of General Virology*, 78(7), 1543-1549. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-7-1543>
- Proutski, V., Gould, E. A., & Holmes, E. C. (1997b). Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: Similarities and differences. *Nucleic Acids Research*, 25(6), 1194-1202. <https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1194>
- Proutski, V., Gritsun, T. S., Gould, E. A., & Holmes, E. C. (1999). Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure. *Virus research*, 64(2), 107-123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00079-9)
- Querido, J. B., Sokabe, M., Kraatz, S., Gordiyenko, Y., Skehel, J. M., Fraser, C. S., & Ramakrishnan, V. (2020). Structure of a human 48S translational initiation complex. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), 1220. <https://doi.org/10.1126/science.aba4904>
- Rakotondrafara, A. M., Polacek, C., Harris, E., & Miller, W. A. (2006). Oscillating kissing stem-loop interactions mediate 5' scanning-dependent translation by a viral 3'-cap-independent translation element. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(10), 1893-1906. <https://doi.org/10.1261/rna.115606>

- Ramos-Lorente, S., Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2021). Information Encoded by the Flavivirus Genomes beyond the Nucleotide Sequence. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3738. <https://doi.org/10.3390/ijms22073738>
- Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas, T. S., Zhou, Y., Li, H., & Shi, P.-Y. (2006). West Nile Virus 5'-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2'-O Methylations by Nonstructural Protein 5. *Journal of Virology*, 80(17), 8362. <https://doi.org/10.1128/jvi.00814-06>
- Reiter, P. (2010). West Nile virus in Europe: Understanding the present to gauge the future. *Eurosurveillance*, 15(10), 4-10. <https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19508-en>
- Rice, G. M., Leonard, C. W., & Weeks, K. M. (2014). RNA secondary structure modeling at consistent high accuracy using differential SHAPE. *RNA*, 20(6), 846-854. <https://doi.org/10.1261/rna.043323.113>
- Ríos-Marco, P., Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2016). The cis-acting replication element of the Hepatitis C virus genome recruits host factors that influence viral replication and translation. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep25729>
- Romero-López, C., Barroso-DelJesus, A., & Berzal-Herranz, A. (2017). The chaperone-like activity of the hepatitis C virus IRES and CRE elements regulates genome dimerization. *Scientific reports*, 7, 43415. <https://doi.org/10.1038/srep43415>
- Romero-Lopez, C., Barroso-DelJesus, A., Garcia-Sacristán, A., Briones, C., & Berzal-Herranz, A. (2014). End-to-end crosstalk within the hepatitis C virus genome mediates the conformational switch of the 3'X-tail region. *Nucleic acids research*, 42(1), 567-582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt841>
- Romero-López, C., Barroso-DelJesus, A., García-Sacristán, A., Briones, C., & Berzal-Herranz, A. (2012). The folding of the hepatitis C virus internal ribosome entry site depends on the 3'-end of the viral genome. *Nucleic acids research*, 40(22), 11697-11713. <https://doi.org/10.1093/nar/gks927>
- Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2009). A long-range RNA–RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA*, 15(9), 1740-1752. <https://doi.org/10.1261/rna.1680809>
- Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2012). The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Cellular and molecular life sciences*, 69(1), 103-113. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0729-z>
- Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2020). The Role of the RNA–RNA Interactome in the Hepatitis C Virus Life Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1479. <https://doi.org/10.3390/ijms21041479>
- Romero-López, C., Díaz-González, R., & Berzal-Herranz, A. (2007). Inhibition of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation by an RNA targeting the conserved III_f domain. *Cellular and molecular life sciences*, 64(22), 2994-3006. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7345-y>
- Romero-López, C., Ramos-Lorente, S. E., & Berzal-Herranz, A. (2021). In Vitro Methods to Decipher the Structure of Viral RNA Genomes. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1192. <https://doi.org/10.3390/ph14111192>
- Romero-López, C., Ríos-Marco, P., Berzal-Herranz, B., & Berzal-Herranz, A. (2018). The HCV genome domains 5BSL3.1 and 5BSL3.3 act as managers of translation. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34422-7>
- Romero-López, C., Roda-Herreros, M., Berzal-Herranz, B., Ramos-Lorente, S. E., & Berzal-Herranz, A. (2023). Inter- and Intramolecular RNA–RNA Interactions Modulate the Regulation of Translation Mediated by the 3' UTR in West Nile Virus. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5337. <https://doi.org/10.3390/ijms24065337>

- Rossi, S. L., Ross, T. M., & Evans, J. D. (2010). West Nile Virus. *Clinics in laboratory medicine*, 30(1), 47. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>
- Sanford, T. J., Mears, H. V., Fajardo, T., Locker, N., & Sweeney, T. R. (2019). Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits de novo translation initiation. *Nucleic acids research*, 47(18), 9789-9802. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz686>
- Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4433-4448. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2299-6>
- Sansom, J., Phipps, P., Johnson, N., McElhinney, L. M., & Roberts, H. (2018). West Nile virus season in Europe. *The Veterinary record*, 183(7), 224. <https://doi.org/10.1136/vr.k3497>
- Seong, K. M., Jung, S. O., Kim, H. D., Kim, H. J., Jung, Y. J., Choi, S. Y., & Kim, J. (2012). Yeast ribosomal protein S3 possesses a β -lyase activity on damaged DNA. *FEBS letters*, 586(4), 356-361. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.030>
- Sevlever, F., Di Bella, J. P., & Ventura, A. C. (2020). Discriminating between negative cooperativity and ligand binding to independent sites using pre-equilibrium properties of binding curves. *PLOS Computational Biology*, 16(6), e1007929. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007929>
- Sharma, S., & Varani, G. (2020). NMR structure of Dengue West Nile viruses stem-loop B: A key cis-acting element for flavivirus replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 531(4), 522-527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.115>
- Shetty, S., Stefanovic, S., & Mihailescu, M. R. (2013). Hepatitis C virus RNA: molecular switches mediated by long-range RNA–RNA interactions? *Nucleic acids research*, 41(4), 2526-2540. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1318>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 98(1), 2-3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Simon, A. E., & Miller, W. A. (2013). 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annual review of microbiology*, 67, 21-42. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155609>
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6284), 467-470. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
- Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N., & Hellen, C. U. T. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *Journal of virology*, 72(6), 4775-4782. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.6.4775-4782.1998>
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-20(4), 471-492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>
- Song, Y., Mugavero, J. A., Stauff, C. B., & Wimmer, E. (2019). Dengue and zika virus 5' untranslated regions harbor internal ribosomal entry site functions. *mBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00459-19>
- Sorokin, I. I., Vassilenko, K. S., Terenin, I. M., Kalinina, N. O., Agol, V. I., & Dmitriev, S. E. (2021). Non-Canonical Translation Initiation Mechanisms Employed by Eukaryotic Viral mRNAs. *Biochemistry*, 86(9), 1060. <https://doi.org/10.1134/s0006297921090042>
- Steen, K. A., Rice, G. M., & Weeks, K. M. (2012). Fingerprinting Non-Canonical and Tertiary RNA Structures by Differential SHAPE Reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 134(32), 13160. <https://doi.org/10.1021/ja304027m>

- Stupina, V. A., Meskauskas, A., McCormack, J. C., Yingling, Y. G., Shapiro, B. A., Dinman, J. D., & Simon, A. E. (2008). The 3' proximal translational enhancer of Turnip crinkle virus binds to 60S ribosomal subunits. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(11), 2379-2393. <https://doi.org/10.1261/rna.1227808>
- Stupina, V. A., Yuan, X., Meskauskas, A., Dinman, J. D., & Simon, A. E. (2011). Ribosome binding to a 5' translational enhancer is altered in the presence of the 3' untranslated region in cap-independent translation of turnip crinkle virus. *Journal of virology*, 85(10), 4638-4653. <https://doi.org/10.1128/jvi.00005-11>
- Sun, C., Querol-Audí, J., Mortimer, S. A., Arias-Palomo, E., Doudna, J. A., Nogales, E., & Cate, J. H. D. (2013). Two RNA-binding motifs in eIF3 direct HCV IRES-dependent translation. *Nucleic acids research*, 41(15), 7512-7521. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt510>
- Swarbrick, C. M. D., Basavannacharya, C., Chan, K. W. K., Chan, S. A., Singh, D., Wei, N., Phoo, W. W., Luo, D., Lescar, J., & Vasudevan, S. G. (2017). NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic acids research*, 45(22), 12904-12920. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1127>
- Sweeney, T. R., Abaeva, I. S., Pestova, T. V., & Hellen, C. U. T. (2014). The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *The EMBO journal*, 33(1), 76-92. <https://doi.org/10.1002/embj.201386124>
- Sztuba-Solinska, J., Teramoto, T., Rausch, J. W., Shapiro, B. A., Padmanabhan, R., & Le Grice, S. F. J. (2013). Structural complexity of Dengue virus untranslated regions: Cis-acting RNA motifs and pseudoknot interactions modulating functionality of the viral genome. *Nucleic Acids Research*, 41(9), 5075-5089. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt203>
- Terenin, I. M., Akulich, K. A., Andreev, D. E., Polyanskaya, S. A., Shatsky, I. N., & Dmitriev, S. E. (2016). Sliding of a 43S ribosomal complex from the recognized AUG codon triggered by a delay in eIF2-bound GTP hydrolysis. *Nucleic acids research*, 44(4), 1882-1893. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1514>
- Tilgner, M., Deas, T. S., & Shi, P. Y. (2005). The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology*, 331(2), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.022>
- Treder, K., Pettit Kneller, E. L., Allen, E. M., Wang, Z., Browning, K. S., & Miller, W. A. (2008). The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(1), 134-147. <https://doi.org/10.1261/rna.777308>
- Tuplin, A., Evans, D. J., & Simmonds, P. (2004). Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *The Journal of general virology*, 85(10), 3037-3047. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80141-0>
- Tuplin, A., Struthers, M., Simmonds, P., & Evans, D. J. (2012). A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication. *Nucleic acids research*, 40(14), 6908-6921. <https://doi.org/10.1093/nar/gks370>
- Valášek, L., Nielsen, K. H., Zhang, F., Fekete, C. A., & Hinnebusch, A. G. (2004). Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9437-9455. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.21.9437-9455.2004>
- Vashist, S., Anantpadma, M., Sharma, H., & Vrati, S. (2009). La protein binds the predicted loop structures in the 3' non-coding region of Japanese encephalitis virus genome: Role in virus replication. *Journal of General Virology*, 90(6), 1343-1352. <https://doi.org/10.1099/vir.0.010850-0>

- Vende, P., Piron, M., Castagné, N., & Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *Journal of virology*, 74(15), 7064-7071. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
- Veo, C., Della Ventura, C., Moreno, A., Rovida, F., Percivalle, E., Canziani, S., Torri, D., Calzolari, M., Baldanti, F., Galli, M., & Zehender, G. (2019). Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011-2018. *Viruses*, 11(9), 814. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
- Vicens, Q., Kieft, J. S., & Rissland, O. S. (2018). Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5'-3' Communication. *Molecular cell*, 72(5), 805-812. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.047>
- Villa, T. G., Abril, A. G., Sánchez, S., de Miguel, T., & Sánchez-Pérez, A. (2021). Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. *Archives of Microbiology*, 203(2), 443-464. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02040-5>
- Villordo, S. M., Alvarez, D. E., & Gamarnik, A. V. (2010). A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA*, 16, 2325-2335. <https://doi.org/10.1261/rna.2120410>
- Villordo, S. M., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2016). RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology*, 24(4), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>
- Villordo, S. M., Filomatori, C. V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C. D., & Gamarnik, A. V. (2015). Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLoS Pathogens*, 11(1), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004604>
- Villordo, S. M., & Gamarnik, A. V. (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Research*, 139(2), 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.016>
- Villordo, S. M., & Gamarnik, A. V. (2013). Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 87(16), 9365-9372. <https://doi.org/10.1128/jvi.00567-13>
- Wan, Y., Kertesz, M., Spitale, R. C., Segal, E., & Chang, H. Y. (2011). Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nature reviews. Genetics*, 12(9), 641-655. <https://doi.org/10.1038/nrg3049>
- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N., & Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*, 1(5), 526-537. PMID: 7489514; PMCID: PMC1482419.
- Wang, T., Merits, A., Wu, Y., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, L., Yu, Y., Pan, L., Chen, S., & Cheng, A. (2020). cis-Acting Sequences and Secondary Structures in Untranslated Regions of Duck Tembusu Virus RNA Are Important for Cap-Independent Translation and Viral Proliferation. *Journal of Virology*, 94(16), 906-926. <https://doi.org/10.1128/jvi.00906-20>
- Wang, Z., Parisien, M., Scheets, K., & Miller, W. A. (2011). The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element. *Structure (London, England : 1993)*, 19(6), 868-880. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.013>
- Wang, Z., Treder, K., & Miller, W. A. (2009). Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F. *The Journal of biological chemistry*, 284(21), 14189-14202. <https://doi.org/10.1074/jbc.m808841200>

- Wei, Y., Qin, C., Jiang, T., Li, X., Zhao, H., Liu, Z., Deng, Y., Liu, R., Chen, S., Yu, M., & Qin, E. (2009). Translational regulation by the 3' untranslated region of the dengue type 2 virus genome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), 817-824. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0595>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Wengler, G., Castle, E., Leidner, U., Nowak, T., & Wengler, G. (1985). Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. *Virology*, 147(2), 264-274. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90129-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90129-1)
- Wengler, G., & Wengler, G. (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology*, 113(2), 544-555. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90182-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90182-3)
- Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., & Sarnow, P. (2000). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell*, 102(4), 511-520. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00055-6)
- World Health Organization. (2022). *Virus de Zika*. Virus de Zika. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- Wu, B., Qi, Z., & Qian, X. (2023). Recent Advancements in Mosquito-Borne Flavivirus Vaccine Development. *Viruses*, 15(4), 813. <https://doi.org/10.3390/V15040813>
- Yamamoto, H., Unbehaun, A., Loerke, J., Behrmann, E., Collier, M., Bürger, J., Mielke, T., & Spahn, C. M. T. (2014). Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA. *Nature structural & molecular biology*, 21(8), 721-727. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2859>
- Yong, W. H., Shabihkhani, M., Telesca, D., Yang, S., Tso, J. L., Menjivar, J. C., Wei, B., Lucey, G. M., Mareninov, S., Chen, Z., Liao, L. M., Lai, A., Nelson, S. F., Cloughesy, T. F., & Tso, C. L. (2015). Ribosomal Proteins RPS11 and RPS20, Two Stress-Response Markers of Glioblastoma Stem Cells, Are Novel Predictors of Poor Prognosis in Glioblastoma Patients. *PloS one*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141334>
- You, S., Stump, D. D., Branch, A. D., & Rice, C. M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*, 78(3), 1352-1366. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1352-1366.2004>
- Yu, Y., Ji, H., Doudna, J. A., & Leary, J. A. (2005). Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: Native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 14(6), 1438. <https://doi.org/10.1110/ps.041293005>
- Yueh, A., & Schneider, R. J. (2000). Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes & Development*, 14(4), 414. <https://doi.org/10.1101/gad.14.4.414>
- Zeng, L., Falgout, B., & Markoff, L. (1998). Identification of Specific Nucleotide Sequences within the Conserved 3'-SL in the Dengue Type 2 Virus Genome Required for Replication. *Journal of Virology*, 72(9), 7510-7522. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7510-7522.1998>
- Zeng, M., Duan, Y., Zhang, W., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, L., Yu, Y., Chen, S., & Cheng, A. (2020). Universal RNA Secondary Structure Insight Into Mosquito-Borne Flavivirus (MBFV) cis-Acting RNA Biology. *Frontiers in Microbiology*, 11, 473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00473>

- Zhang, B., Dong, H., Stein, D. A., Iversen, P. L., & Shi, P. Y. (2008a). West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology*, 373(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.016>
- Zhang, B., Dong, H., Zhou, Y., & Shi, P.-Y. (2008b). Genetic Interactions among the West Nile Virus Methyltransferase, the RNA-Dependent RNA Polymerase, and the 5' Stem-Loop of Genomic RNA. *Journal of Virology*, 82(14), 7047-7058. <https://doi.org/10.1128/jvi.00654-08>
- Zhou, C., Sun, J., Zheng, Z., Weng, J., Atyah, M., Zhou, Q., Chen, W., Zhang, Y., Huang, J., Yin, Y., Mao, H., Zhang, Z., Yi, Y., & Ren, N. (2020). High RPS11 level in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis after curative resection. *Annals of Translational Medicine*, 8(7), 466-466. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.92>
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K. A., Shi, P.-Y., & Li, H. (2007). Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *Journal of virology*, 81(8), 3891-3903. <https://doi.org/10.1128/jvi.02704-06>