



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Trabajo Final de Grado

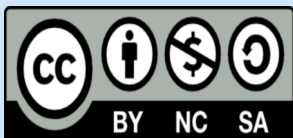
Agustina Lujan Suárez

Estudio del impacto de la expresión de la P5B-ATPasa 13A2 sobre la infección del virus Chikunguña en células SH-SY5Y

Instituto de Ciencias de la Salud

2025

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – No comercial – Compartir igual 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Suárez, A. L. (2025). *Estudio del impacto de la expresión de la P5B-ATPasa 13A2 sobre la infección del virus Chikunguña en células SH-SY5Y* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3626>



Instituto de Ciencias de la Salud. Bioquímica.

Trabajo final para optar por el título de Bioquímica

**Estudio del impacto de la expresión de la P5B-ATPasa
13A2 sobre la infección del virus Chikunguña en
células SH-SY5Y**

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Dr. Alejandro Paladini,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Paraguay
2155, C1121 ABG, Cdad. Autónoma de Buenos Aires.

Tesista: Agustina Lujan Suárez

Directora: Dra. Felicitas de Tezanos Pinto

RESUMEN

Las ATPasas de tipo P pertenecen a una superfamilia de proteínas que transportan cationes inorgánicos y otros sustratos a través de las membranas celulares. Utilizan la hidrólisis de ATP para realizar el transporte del sustrato y se caracterizan por la formación de un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción. Por similitud de secuencia se han dividido en cinco subfamilias denominadas tipo I-V o P1-P5 (1). La subfamilia de P5-ATPasas se expresa únicamente en eucariotas y se divide en dos grupos denominados P5A y P5B; la ATP13A1 pertenece al grupo de las P5A, mientras que las ATP13A2-5 se agrupan dentro del grupo de las P5B (2). Las P5A-ATPasas se encuentran en el retículo endoplásmico y afectan la maduración y secreción de proteínas, mientras que las P5B-ATPasas se localizan en endosomas tardíos (conocidos también como cuerpos multivesiculares, MVBs) y lisosomas y están implicadas en el correcto funcionamiento del sistema endolisosomal (3).

Se ha demostrado que las P5B-ATPasas, como la P5B-ATPasa 13A2 (ATP13A2), exportan poliaminas como la espermidina desde el interior de los MVBs y lisosomas hacia el citosol (4). En este sentido, resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que la ATP13A2 provoca un aumento en la capacidad de almacenamiento de la poliamina natural espermidina (6) y altera la homeostasis lipídica de manera consistente con la exocitosis del sistema endolisosomal (7).

Inicialmente, la disfunción de las P5B-ATPasas ha sido vinculada a varias neuropatologías. Mutaciones que causan la pérdida de función del gen humano ATP13A2 subyacen una forma de aparición temprana de Parkinson denominada Síndrome de Kufor Rakeb (KRS) (8), así como un tipo de Lipofusinos Ceroidea Neuronal (NCL) (9), Paraplegia Espástica Hereditaria (10) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (11). Sin embargo, recientemente se encontró que la expresión de la ATP13A2 está aumentada en pacientes con cáncer colorrectal (12) y cervical (13), mientras que la ATP13A3 está incrementada en cáncer de páncreas (14, 15). Estos hallazgos amplían el abanico de enfermedades en las que esta subfamilia de P5B-ATPasas está involucrada y demuestra que tanto la ausencia como la sobreexpresión de estas proteínas afectan profundamente la homeostasis celular, lo cual sugiere que podrían afectar el desarrollo de otras patologías hasta ahora no exploradas.

Una vasta evidencia indica que la regulación del metabolismo de lípidos ejercida por los virus tiene un rol importante en su ciclo de replicación e impacta en la infección (16). Además, muchos virus requieren poliaminas para uno o varios pasos de su ciclo de replicación como la polimerización del ADN y ARN, empaquetamiento de los ácidos nucleicos y síntesis proteica (17). Asimismo, muchos virus con envoltura dependen del tráfico endolisosomal de la célula huésped para ingresar a las células e iniciar su ciclo de infección (18). Con este propósito, el objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la expresión de la ATP13A2 sobre la infección del virus Chikunguña (CHIKV) en células derivadas de un neuroblastoma humano denominadas SH-SY5Y.

Con el propósito de obtener clones de células con el gen ATP13A2 inactivado mediante el sistema CRISPR-Cas9, inicialmente se generó un plásmido que codifica el ARN guía dirigido al gen ATP13A2, junto con la nucleasa Cas9, con el cual se transfectaron las células SH-SY5Y. Algunos clones mostraron una menor tasa de división celular respecto de las células SH-SY5Y salvajes, lo cual es esperable dado que las poliaminas estimulan la proliferación celular. A continuación, se seleccionó uno de los clones con menor tasa de división y se utilizó junto con un clon de células que sobreexpresan la ATP13A2 activa, así como una versión mutante inactiva de esta proteína, generados previamente en nuestro laboratorio. Con estas líneas celulares se evaluó la replicación viral del CHIKV mediante titulación por ensayo de unidades formadoras de placas (UFP). A partir de esta estimación se pudo observar que, si bien las diferencias no son significativas, la línea celular que no expresaría la ATP13A2, mostró un título viral menor que el de las células control o que sobreexpresan la ATPasa.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. P-ATPasas.....	6
1.2. Características estructurales.....	6
1.3. P5-ATPasas.....	8
1.3.1. ATP13A2 en el sistema endolisosomal y la homeostasis de lípidos.....	9
1.3.2. El rol de los lípidos y del sistema endolisosomal en la infección viral.....	10
2. Poliaminas.....	11
2.1. Poliaminas como sustratos de la ATP13A2.....	12
2.2. Poliaminas en la infección viral.....	13
2.3. Relación entre lípidos y poliaminas.....	15
3. Características del virus Chikunguña.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo General	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y METODOS.....	19
3.1. Materiales.....	19
3.1.1. Reactivos.....	19
3.1.2. Células de mamífero y virus Chikunguña (CHIKV).....	19
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Construcción del plásmido CRISPR-Cas9 con la guía específica para inactivar el gen codificante de la ATP13A2.....	19
3.2.2. Preparación de las bacterias competentes.....	22

3.2.3. Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> de la cepa DH5 α	23
3.2.4. Selección de clones recombinantes.....	23
3.2.5 Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación).....	24
3.2.6. Verificación del ADN plasmídico aislado.....	25
3.2.7. Cultivo de células.....	25
3.2.8. Transfección de células SH-SY5Y para obtener clones de células con el gen codificante de la ATP13A2 inactivado.....	26
3.2.9. Aislamiento de clones de células SH-SY5Y transfectadas.....	26
3.2.10. Ensayo de proliferación celular.....	27
3.2.11. Infección de células SH-SY5Y con CHIKV.....	27
3.2.12. Titulación de CHIKV en los sobrenadantes colectados.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Inserción de los oligonucleótidos hibridados en el vector CRISPR-Cas9.....	29
4.2. Transfección de células SH-SY5Y para obtener clones con el gen de la ATP13A2 inactivado.....	33
4.2.1. Estimación de la tasa de crecimiento de los clones de células SH-SY5Y transfectados.....	35
4.3. Infección de células SH-SY5Y con CHIKV.....	37
5. CONCLUSIONES	39
6. REFERENCIAS	40

1. INTRODUCCION

1.1. P-ATPasas

Las ATPasas de tipo P o P-ATPasas pertenecen a una superfamilia de proteínas que transportan cationes inorgánicos y otros sustratos a través de las membranas celulares. Utilizan la hidrólisis de ATP para realizar el transporte del sustrato y se caracterizan por la formación de un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción. Están presentes en procariontes y eucariotes y de acuerdo con su similitud de secuencia se han dividido en cinco subfamilias denominadas tipo I-V o P1-P5 (1). Las P1A-ATPasas forman parte de los sistemas de transporte de K^+ , las P1B-ATPasas son bombas de metales pesados, las P2A-ATPasas y las P2B-ATPasas son bombas de Ca^{2+} , las P2C-ATPasas son bombas de Na^+/K^+ y H^+/K^+ de los animales, las P2D-ATPasas son bombas de Na^+ de los hongos, las P3A-ATPasas son bombas de H^+ de la membrana plasmática y las P4-ATPasas son flipasas de lípidos (19, 20). La subfamilia de P5-ATPasas a la que pertenece la ATP13A2 es la menos estudiada hasta el momento y se describirá más adelante.

1.2. Características estructurales

Esta familia de proteínas presenta cinco dominios donde tres de ellos se encuentran en el citoplasma: el dominio A "actuador o accionador", el dominio N de unión a nucleótido y el dominio P de fosforilación. Los otros dos dominios están compuestos por segmentos transmembrana: el dominio T de transporte y el dominio S de soporte (figura 1). Puede existir también un dominio regulador que se encuentra en uno o ambos extremos de la proteína. El dominio P es el dominio catalítico que contiene la secuencia aminoacídica Asp-Lys-Thr-Gly (DKTG) conservada en todas las P-ATPasas, que incluye el residuo de ácido aspártico (D) que se fosforila durante el ciclo de reacción y que da nombre a esta familia de proteínas. Asimismo, contiene otras dos secuencias aminoacídicas conservadas involucradas en la coordinación del Mg^{2+} asociado con la unión del ATP en el sitio de fosforilación. En cada ciclo de reacción, el dominio P es fosforilado por el dominio N (que tiene actividad de quinasa) y desfosforilado por el dominio A (con actividad fosfatasa) (21). El dominio T de transporte consiste en 6 segmentos transmembrana que alojan el sitio de unión al sustrato, mientras que el dominio S de soporte -generalmente está formado por 4 segmentos transmembrana- es una unidad auxiliar que provee soporte estructural al dominio T. La mayoría de las P-ATPasas

contienen un dominio regulador en el extremo N-terminal (bombas de metales pesados y Ca^{2+} -ATPasas de las plantas), en el extremo C-terminal (Na^+/K^+ ATPasa y Ca^{2+} -ATPasas) o en ambos extremos (H^+ -ATPasa de las plantas). Estos dominios actúan como autoinhibidores mediante su interacción con el resto de la molécula, inhibiendo el movimiento de otros dominios o modulando la afinidad de los sustratos transportados. Algunas P-ATPasas están compuestas por una sola subunidad catalítica mientras que otras requieren de subunidades accesorias; las cuales se necesitan para alcanzar la maduración funcional, la salida del retículo endoplasmático o la estabilización de conformaciones de baja o alta afinidad (21).

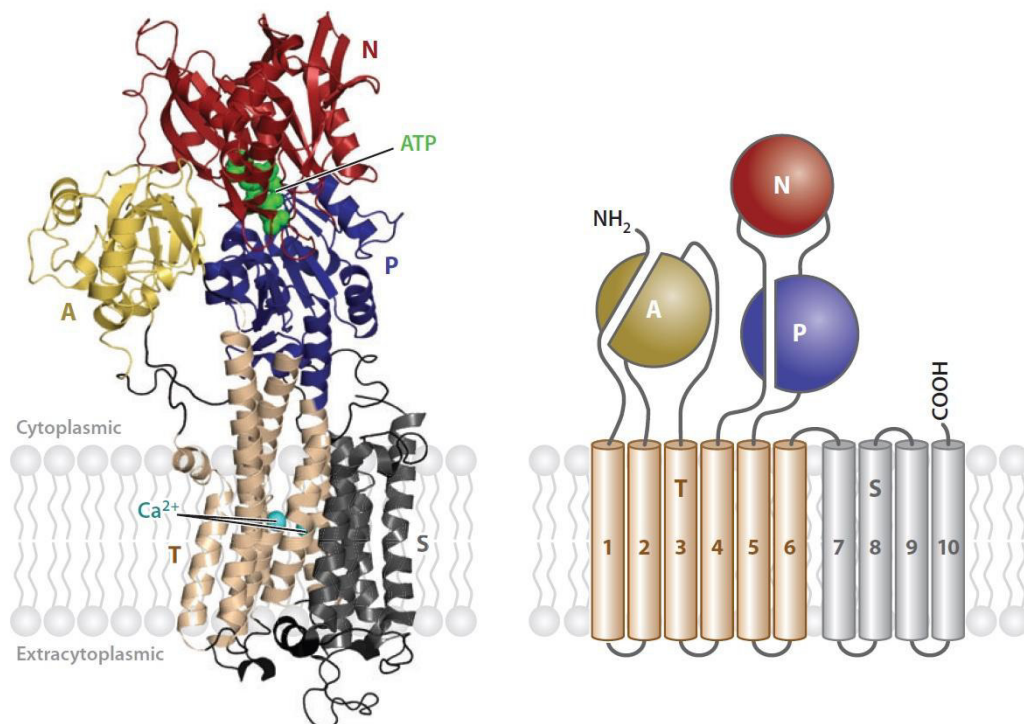


Figura 1. Representación esquemática de la organización estructural de las P-ATPasas. Panel de la izquierda: Modelo de la estructura cristalográfica de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplasmático 2a (SERCA2a) (número de acceso PDB 1T5S; Referencia 138). La bomba está organizada en tres dominios citoplasmáticos (A, P, y N) y dos dominios incluidos en la membrana denominados T y S. El dominio N une el ATP y actúa como una proteína quinasa que fosforila al dominio P. El dominio A actúa como una proteína fosfatasa que desfosforila el dominio P durante cada ciclo catalítico. Los iones transportados (en este caso calcio) se unen en el medio del dominio T y alteran entre estar expuestos al lado citoplasmático o extracitoplasmático. Panel de la derecha: Diagrama esquemático de la misma estructura. Los distintos dominios están indicados en mayúscula. El dominio A está formado por la extensión N-terminal de la primera asa citoplasmática. El dominio N es una inserción dentro del dominio P y ambos están incluidos dentro de la segunda y mayor asa citoplasmática. La región inserta dentro de la membrana está constituida por 10 segmentos transmembránicos; los 6 primeros forman el dominio T mientras que el dominio S incluye los 4 segmentos alfa hélice remanentes. Figura extraída de Palmgren y col., 2011.

1.3. P5-ATPasas

La subfamilia de P5-ATPasas se expresa únicamente en eucariotas y se divide en dos grupos denominados P5A y P5B; la ATP13A1 pertenece al grupo de las P5A, mientras que las ATP13A2-5 se agrupan dentro del grupo de las P5B (2). Las P5A-ATPasas actúan como dislocasas de hélices hidrofóbicas mal insertadas flanqueadas por aminoácidos básicos, desde el retículo endoplásmico (RE), corrigiendo errores en el direccionamiento o en la topogénesis de proteínas (20). Las P5A-ATPasas se encuentran en el retículo endoplásmico y afectan la maduración y secreción de proteínas, mientras que las P5B-ATPasas se localizan en endosomas tardíos (conocidos también como cuerpos multivesiculares, MVBs) y lisosomas y están implicadas en el correcto funcionamiento del sistema endolisosomal (3).

El interés por estudiar las P5B-ATPasas reside en que han sido vinculadas a varias neuropatologías y otras enfermedades. Mutaciones que causan la pérdida de función del gen codificante de la ATP13A2 humano (ATP13A2) subyacen una forma de aparición temprana de Parkinson denominada Síndrome de Kufor Rakeb (KRS) (8), así como un tipo de Lipofusinos Ceroidea Neuronal (NCL) (9), Paraplegia Espástica Hereditaria (10) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (11). Recientemente se encontró un aumento en la expresión de la ATP13A2 que activa la vía de las pentosas fosfato promoviendo el desarrollo del cáncer colorrectal (12) y cervical (13), lo cual amplía el abanico de enfermedades en las que esta proteína está involucrada. Además, se observó sobreexpresión de la ATP13A3 en células de cáncer pancreático (14). Por otro lado, se han identificado mutaciones en el gen codificante de ATP13A4 en pacientes con diferentes tipos de autismo y trastornos del lenguaje (22, 23), mientras que mutaciones en el gen codificante de ATP13A5 son responsables de una forma rara de la enfermedad de Hailey-Hailey (24). Estos resultados sugieren que la ausencia de esta proteína favorece el desarrollo de enfermedades neurológicas asociadas a la acumulación de productos citotóxicos mientras que su sobreexpresión se asocia a procesos tumorales.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que la ATP13A2 provoca un aumento en la capacidad de almacenamiento de la poliamina natural espermidina (6), protege a las células de la citotoxicidad causada por el hierro al reducir la permeabilidad de la membrana lisosomal inducida por este ion (25) y altera la homeostasis lipídica (7). Hasta el 2020 se desconocía el sustrato transportado por estas P5B-ATPasas, pero una publicación de ese año mostró que la ATP13A2 exporta poliaminas como la espermidina

desde el interior de los MVBs y lisosomas hacia el citosol (4). Poco tiempo después se reportaron varias publicaciones donde utilizaron crioelectromicroscopía para determinar el mecanismo de transporte de la ATP13A2 donde corroboraron este resultado, siendo la poliamina natural espermina el sustrato transportado con mayor afinidad (26, 27, 28, 29, 30, 31).

El cADN de la ATP13A2 se compone de 3543 nucleótidos que codifican para una proteína de hasta 1180 aminoácidos. El gen ubicado en el cromosoma 1 en humanos consta de 26kb codificantes de 29 exones que se expresa ubicuamente.

1.3.1. ATP13A2 en el sistema endolisosomal y la homeostasis de lípidos

Los MVBs y lisosomas forman parte del sistema endolisosomal y son organelas que reciben macromoléculas provenientes de la vía secretoria, endocítica, fagocítica y autofágica. Están involucrados no solo en la degradación de compuestos sino también en procesos como la secreción, la reparación de membranas, la señalización y el metabolismo energético, ya que son responsables del recambio de los constituyentes celulares (32). Es evidente que la distribución y el procesamiento de la carga transportada mediante tráfico vesicular es una función inherente al sistema endolisosomal, y su mal funcionamiento promueve una acumulación de material no degradable que ocasiona trastornos severos en la salud humana. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que la expresión de la ATP13A2 modifica el contenido y la síntesis de ciertos lípidos de manera consistente con la promoción de la secreción extracelular de vesículas (7). Esto concuerda con resultados previos que mostraron que la sobreexpresión de la ATP13A2 promueve la liberación de exosomas (33, 34) y regula pasos cruciales del tráfico y distribución vesicular de manera independiente de su actividad catalítica (35).

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que células sobreexpresando la ATP13A2 tienen disminuido el contenido de colesterol y bis(monoacil)glicerofosfato (BMP), (7), el cual es un fosfolípido aniónico particular que solo se encuentra en MVBs y lisosomas y es esencial para la degradación lipídica dentro de estas organelas (36, 37, 38, 39). Esto concuerda con resultados previos obtenidos con ratones knock out de esta P5B-ATPasa donde se observa un nivel elevado de este lípido de carga negativa (40). Esta disminución del BMP y colesterol debido a la expresión de la ATP13A2, sugiere que se está favoreciendo el desplazamiento del BMP desde las ILVs hacia la membrana perimetral para favorecer la salida del colesterol. En concordancia, observamos un

aumento del nivel de ésteres de colesterol en las células que expresan la ATPasa (7), lo que sugiere que la salida de colesterol de los endosomas está favorecida y se almacena en su versión esterificada para su posterior uso en el metabolismo celular. También encontramos que la expresión de ATP13A2 produce una disminución en el contenido de ceramida (7), lo cual es esperable en un escenario de mayor externalización de exosomas ya que estas vesículas están enriquecidas en este lípido. Asimismo, observamos que la sobreexpresión de la P5B-ATPasa disminuyó el contenido de triglicéridos y gotas lipídicas y aumentó la síntesis de lípidos polares (7), lo cual es coherente con un aumento de la demanda de lípidos para abastecer la síntesis de nuevas membranas en un contexto de alta exocitosis.

1.3.2. El rol de los lípidos y del sistema endolisosomal en la infección viral

Los lípidos cumplen funciones esenciales más allá del mero soporte estructural, esto es debido a que participan activamente en las distintas fases del ciclo viral (entrada, replicación, ensamblaje y liberación) y modulan la respuesta inmune del hospedador. La capacidad de los virus para reprogramar rutas del metabolismo lipídico y del tráfico vesicular es una estrategia clave para asegurar su propagación. Durante la unión y entrada, muchos virus dependen de microdominios lipídicos de la membrana plasmática, como rafts ricos en colesterol y esfingolípidos, que concentran receptores y cofactores necesarios para la fusión o endocitosis (41, 42). El colesterol es un lípido esencial en el ciclo de vida de prácticamente todos los virus. Estos parecen haber desarrollado múltiples estrategias para modular el metabolismo del colesterol, favoreciendo tanto su captación como su síntesis de novo. (43). Además, la disminución del colesterol puede perjudicar la inmunidad innata, ya que este sistema está regulado por este lípido y se ve estimulado por sus derivados (43).

Una gran cantidad de virus invade la vía endocítica y recorre el sistema endolisosomal, transitando por endosomas tempranos y tardíos hasta llegar a los lisosomas. Durante este tránsito, los cambios en el pH intraluminal y en la composición lipídica de las membranas endosomales (por ejemplo, fosfoinosítidos, esfingolípidos y colesterol) favorecen transformaciones conformacionales de las glicoproteínas virales que permiten la fusión o la liberación del genoma viral al citoplasma (44, 45). En este sentido es importante destacar que la ausencia de la ATP13A2 con la consecuente acumulación de poliaminas, induce un aumento del pH endolisosomal (3).

El sistema endolisosomal es fundamental para la respuesta celular frente a los patógenos ya que posee mecanismos moleculares para detectarlos como el receptor tipo Toll 3 (TLR3), TLR7 y TLR9, que detectan ácidos nucleicos virales en el lumen endosomal. La activación de estos TLR depende de la organización lipídica de la membrana endosomal, y modificaciones en dicha composición pueden alterar la sensibilidad y localización de los TLR, afectando la producción de interferones e inflamación (42, 46). En este sentido se ha observado que las alteraciones en la salida de colesterol endosomal pueden inhibir la señalización de TLR y reducir la respuesta mediada por interferón del hospedador, favoreciendo la evasión viral (43). Otro factor antiviral endógeno es la proteína transmembrana 3 inducible por interferón (IFITM3), que se localiza en endosomas tardíos/ lisosomas promoviendo la acumulación de colesterol y dificultando la fusión viral con la membrana endosomal al ser estimulado por interferón. De este modo, el aumento de colesterol en endolisomas actúa como una barrera temprana contra la entrada de virus como el de la influenza (47). En este sentido, cabe recordar que la expresión de la ATP13A2 produjo una disminución en el nivel de colesterol endosomal y su ausencia produce un deterioro severo en el funcionamiento del sistema endolisosomal.

2. Poliaminas

Las poliaminas fisiológicas espermidina, espermina, putrescina y cadaverina son una clase esencial de metabolitos que se encuentran en todos los reinos vivos. Son moléculas pequeñas y abundantes que están cargadas positivamente al pH fisiológico y sus funciones están relacionadas con su carácter policatiónico. Desempeñan diversos roles en la regulación de la transcripción, la traducción, la expresión génica, la autofagia y la resistencia al estrés. Por lo tanto, el papel de las poliaminas se ha asociado con el crecimiento celular, la proliferación, el envejecimiento, el rendimiento de la memoria, las enfermedades neurodegenerativas, los trastornos metabólicos y el cáncer (48-59). La síntesis celular de poliaminas está estrictamente regulada a los niveles de síntesis, degradación, interconversión y transporte (60, 61), y las células invierten una cantidad significativa de energía para mantener los reservorios de poliaminas. Sin embargo, las poliaminas pueden ser eliminadas de las células mediante inhibidores específicos como la difluorometilornitina (DFMO), que inhibe irreversiblemente la ornitina descarboxilasa 1 (ODC1), que es quien cataliza el primer paso en la síntesis de poliaminas (62, 63). El

tratamiento con DFMO, tanto en células *in vitro* como en animales *in vivo*, incluidos los humanos, es generalmente bien tolerado y tiene pocos efectos secundarios que son reversibles (64). Por lo tanto, a pesar de su importancia en una variedad de procesos celulares críticos, la depleción de poliaminas no parece afectar gravemente la salud y función celular.

2.1. Poliaminas como sustratos de la ATP13A2

La captación de poliaminas es mediada por transportadores y dependiente de energía (65, 66), pero hay muy poca información acerca de las moléculas involucradas. El hallazgo que demostró que las P5B-ATPasas exportan poliaminas desde el interior de MVBs y lisosomas hacia el citosol (4) hizo un gran aporte en esta área del conocimiento.

Muchos estudios demuestran que las poliaminas promueven la longevidad en varios modelos animales (67). Este efecto antienvjecimiento estaría producido por la capacidad de las poliaminas de estimular la autofagia, el cual es un proceso dependiente del sistema endolisosomal donde reside la ATP13A2. La espermidina sirve como sustrato en la reacción que permite el agregado de hipusina a una lisina característica del factor de inicio de la traducción 5A (eIF5A); esto provoca la activación de este factor que consecuentemente estimula la traducción del factor de transcripción EB (TFEB) (68). El TFEB estimula la mitofagia (eliminación de mitocondrias por degradación) al inducir un aumento de la autofagia. El resultado general de la activación de eIF5A es la promoción de la biogénesis mitocondrial y la degradación/eliminación de productos a través de la autofagia. La sobreexpresión del factor de transcripción TFEB – el cual no solo induce la autofagia, sino que también es el principal estimulador de la biogénesis lisosomal – revierte la acumulación de agregados tóxicos y restaura la morfología en células de pacientes que sufren enfermedades de desorden lisosomal al inducir la exocitosis lisosomal, que involucra la fusión de lisosomas con la membrana plasmática para eliminar su contenido al espacio extracelular (69). Es importante destacar que el TFEB no sólo regula la biogénesis y la función lisosomal, sino que también induce la expresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) (70), que es un factor de transcripción que estimula la transcripción de ATP13A2 (71). Asimismo, se demostró que la disminución de la expresión de la ATP13A2 reduce la traslocación nuclear del TFEB, mientras que su sobreexpresión produce el efecto inverso (12, 72). Consecuentemente, un aumento de la expresión de la P5B-ATPasa inducido por TFEB a través de HIF- 1α -y consecuentemente

un aumento del exporte de poliaminas hacia el citosol- parecería ser una respuesta frente a la necesidad celular de aumentar el tráfico vesicular para favorecer la exocitosis. Esto no solo disminuiría la acumulación de desechos citotóxicos característicos de las enfermedades neurodegenerativas, sino que también favorecería la secreción de exosomas al medio extracelular que caracteriza a las células tumorales durante los procesos metastásicos. En este sentido, recientemente se observó que la ATP13A2 disminuye la multimerización de la α -sinucleína (componente principal de los cuerpos de Lewis característicos de la Enfermedad de Parkinson) inducida por espermina de manera dependiente del transporte de la poliamina, pero la eliminación de los agregados de α -sinucleína en nanovesículas es promovida de manera independiente de su actividad catalítica (73). Estos resultados sugieren que la ATP13A2 cumple un rol importante más allá de su actividad de transporte y que se requieren más estudios para dilucidar su papel en los mecanismos de detoxificación asociados al sistema endolisosomal.

2.2. Poliaminas en la infección viral

Dada la abundancia de poliaminas en el interior celular y la importancia de estas moléculas para la neutralización de cargas de nucleótidos, entre otras funciones, no resulta sorprendente que los virus utilicen y manipulen las poliaminas para su propia replicación (resumido en la Tabla 1). Los virus dependen de las poliaminas en numerosas etapas de su ciclo de vida, incluyendo el empaquetamiento del genoma, la polimerización de ARN dependiente de ADN, la replicación del genoma y la traducción de proteínas virales. Además, algunos virus parecen estimular la síntesis de poliaminas tras la infección, lo que destaca la importancia de esta vía metabólica para la replicación viral.

(17)

TABLE 1 Roles of polyamines in viral infection

Virus	Virus type	Host factor/pathway	Proposed mechanism/processes involved	Reagent(s) used	Peak reduction ^a	Reference(s)
Herpes simplex virus 1	dsDNA	Polyamines	Present in virion to neutralize viral DNA	DFMO	2-log	30
			Decreased infectivity through impairment of DNA synthesis Inhibition of infectious mechanism postentry and synthesis of immediate early genes, before or during DNA replication	MGBG	63-fold	44 83
Vaccinia virus	dsDNA	Polyamines	Present in virion to neutralize viral DNA	Radiolabeled polyamines		31
			MGBG inhibition late in viral life cycle, viral DNA dissociated from viral inclusions Upregulation of ODC activity	MGBG	2.9-fold	45 46
Human cytomegalovirus	dsDNA	Polyamines	Reduction of infectious virus produced; mechanism likely through virus assembly (DNA packaging and/or capsid envelopment)	DFMO	4-log, 6-log	43, 84
Semliki Forest virus	(+) ssRNA	Polyamines	Decreased activity of viral RNA polymerase	DFMO	10-fold	60, 61
Chikungunya virus	(+) ssRNA	Polyamines	Decreased activity of viral RNA polymerase, decreased viral translation, reduction in infectious virus produced	DFMO, DENSp ^m	200-fold	62, 63
Zika virus	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO, DENSp ^m	15-fold	62, 63
MERS coronavirus	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	30-fold	63
Enterovirus A71	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	12-fold	63
Coxsackievirus B3	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO, DENSp ^m	10-fold	62, 63
Japanese encephalitis virus	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	5-fold	63
Yellow fever virus	(+) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	90-fold	63
Rabies virus	(-) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	2-fold	63
Rift Valley fever virus	(-) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO	200-fold	63
Vesicular stomatitis virus	(-) ssRNA	Polyamines	Reduction in infectious virus produced	DFMO, DENSp ^m	20-fold	63
Ebolavirus	(-) ssRNA	Polyamines, eIF5A	Reduction in infectious virus produced, mechanism through decreased accumulation of VP30	CPX, GC7, DEF, DFMO, MDL, SAM486A	3-log	64
Marburgvirus	(-) ssRNA	Polyamines, eIF5A	Reduction in infectious virus produced	CPX	3-log	64
Human immunodeficiency virus	ssRNA-RT	eIF5A	Required for Rev-dependent nuclear transport	eIF5A mutants		67
			Decrease in virus production; required for RNA translation and Rev-induced gene expression Inhibition of gene expression at transcription initiation	eIF5A siRNA CPX, DEF	2-fold 200-fold	85 86

^aPeak reduction represents experimental time point/condition where the peak effect was observed. Experimental details and alternative time points/conditions can be found in the indicated references.

Tabla 1. Rol de las poliaminas en la infección viral. Tabla extraída de Mounce y col., 2017.

Una de las etapas de la replicación en la que se ha implicado a las poliaminas es el empaquetamiento del genoma viral en los viriones. El empaquetamiento del genoma es un proceso esencial en el ciclo viral. Las cargas negativas del esqueleto del ADN o ARN deben equilibrarse para permitir un empaquetamiento compacto. Los virus han desarrollado varios mecanismos para facilitar este empaquetamiento ajustado, incluyendo el balanceo de cargas negativas mediante dominios cargados positivamente de proteínas de la cápside, el revestimiento del genoma con proteínas de unión a ARN/ADN monocatenario (ssARN/ssADN) cargadas positivamente, o la neutralización de la carga mediante poliaminas (74).

El papel de las poliaminas en la replicación viral de diversos virus de ARN ha sido demostrado. El tratamiento de las células con DFMO redujo significativamente los títulos del virus del Bosque Semliki (SFV), un alfavirus y patógeno humano poco frecuente (74-76). Más recientemente, un estudio de Mounce et al. amplió la lista de virus de ARN sensibles a la depleción de poliaminas e incluye familias diversas, como los alfavirus (virus Chikunguña, CHIKV), coronavirus (virus del síndrome respiratorio de Medio Oriente, MERS), enterovirus (enterovirus A71 y poliovirus), filovirus (virus del Ébola, EBOV, y del Marburgo, MARV), flavivirus (virus del dengue serotipo 1, virus de la encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla), rhabdovirus (virus de la rabia) y bunyavirus (virus de la fiebre del Valle del Rift) (resumido en la Tabla 1) (17, 78, 79 80). La replicación de todos estos virus se vio afectada en distintos grados cuando las poliaminas fueron depletadas con DFMO y se recuperó al reponerlas exógenamente.

En general, las poliaminas parecen ser importantes en las etapas intermedias del ciclo viral en virus de ARN, como la expresión génica y la replicación del genoma. En particular, las poliaminas parecen ser necesarias para la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) durante la infección por SFV (76) y CHIKV (78). Estudios adicionales mostraron que la traducción de los transcritos virales del virus CHIKV, dengue y Zika también se reduce al depletar las poliaminas por tratamiento con DFMO (78).

El agregado de hipusina al eIF5A dependiente de espermidina no solo estimula la traducción del TFEB, sino que también se requiere para la traducción de proteínas de distintos virus como los filovirus, Ébola (EBOV), del Marburgo (MARV) y HIV (80). El requisito tanto de poliaminas como de eIF5A hipusinada para la replicación de diversos virus sugiere que el control celular de las poliaminas podría ser un medio eficaz para suprimir infecciones virales. En este sentido, el uso de inhibidores de la hipusinación como GC7, ciclopirox y deferiprona han mostrado eficacia antiviral contra coronavirus (81) y el virus del Ébola (80) in vitro, lo que sugiere un gran potencial para tratar infecciones virales con inhibidores que apunten a esta modificación post traduccional.

El metabolismo de poliaminas también se ve modificado como respuesta a la infección viral. La respuesta innata inducida por interferón activada por la infección viral activa una cascada de señales que culmina con la expresión de genes que suprimen la infección. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento de células con interferón β , estimula la expresión de la espermidina-espermina acetiltransferasa (SAT1) reduciendo los niveles de poliaminas y limitando la infección viral en cultivos celulares (78). No obstante, aún no está claro si SAT1 aumenta la expresión in vivo en respuesta a una infección viral.

2.3. Relación entre lípidos y poliaminas

Se ha descrito que las poliaminas afectan el metabolismo lipídico, específicamente al potenciar la lipólisis (82) y proteger los lípidos de la peroxidación (83, 84). Además, la depleción de poliaminas reduce la traducción ARNm del factor regulador de elementos de esteroides 2 (SREBP2) al reducir la hipusinación de eIF5A. Esto resulta en una disminución del colesterol celular debido a que el SREBP2 es un regulador maestro de los genes implicados en la síntesis de colesterol (85). Asimismo, se ha demostrado que lípidos de carga negativa facilitan el transporte de poliaminas mediado por la ATP13A2

(27,28) y nuestros resultados demostraron que la ATP13A2 altera la homeostasis lipídica. Estos resultados favorecen la idea de la existencia de una interrelación entre ambos tipos de compuestos. Sin embargo, aún no se comprende completamente cómo las poliaminas afectan la lipólisis ni si intervienen en otras etapas de la síntesis o degradación de lípidos.

Se ha demostrado que las células con depleción de poliaminas presentan un aumento en el contenido de gotas lipídicas (86). De manera consistente, resultados de nuestro laboratorio mostraron que la sobreexpresión de la ATP13A2 produce una disminución de las gotas lipídicas (7); lo cual es esperable siendo que el transporte de poliaminas de la ATP13A2 produciría un aumento del contenido citoplasmático de estos compuestos policatiónicos. Asimismo, se observó que la depleción de poliaminas no solo disminuye la expresión de genes codificantes de proteínas involucradas en la síntesis de lípidos como la enzima que convierte el citrato en acetil-CoA, la enzima que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA y la sintasa de ácidos grasos, sino que también se observó una disminución notable del catabolismo lipídico (86). Estos datos revelan una conexión entre las poliaminas y la síntesis lipídica. Siendo que los virus requieren tanto lípidos como poliaminas para facilitar una infección viral productiva, estos resultados sugieren al metabolismo de poliaminas y lípidos como posibles blancos antivirales.

3. Características del virus Chikunguña

El virus Chikunguña (CHIKV) es un arbovirus perteneciente al género Alphavirus dentro de la familia Togaviridae. Es un virus envuelto, de simetría icosaédrica, que contiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 11.8 kb. Su nombre proviene del idioma makonde y significa “el que se encorva”, en alusión a la postura que adoptan los pacientes debido al dolor articular característico de la infección. El CHIKV es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes* (principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*) y causa una enfermedad febril aguda acompañada de artralgia persistente, mialgia, cefalea y, en algunos casos, complicaciones neurológicas o cardiovasculares (87).

El virión tiene un diámetro aproximado de 70 nm y está formado por una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora, que contiene dos glicoproteínas de superficie: E1 y E2, organizadas en heterodímeros que se agrupan en trímeros sobre la superficie viral. En el interior, el ARN genómico está asociado a la proteína de la cápside (C), formando una nucleocápside icosaédrica (87).

La entrada del virus CHIKV en células humanas o de otros mamíferos depende de la vía endocítica dependiente de clatrina. El virus se une a través de su proteína E2 con receptores de superficie de la célula huésped, como la proteína asociada a la remodelación de la matriz 8 (MXRA8) (88), y el complejo virus-receptor es internalizado por endocitosis mediada por clatrina. A continuación, el virión es transportado hacia los endosomas tempranos y luego a los endosomas tardíos (o MVBs); proceso que es acompañado de una acidificación progresiva del lumen endosomal (pH $\sim 6.5 \rightarrow 5.5$). Este descenso de pH en los MVBs induce un cambio conformacional irreversible en la glicoproteína E1 que entonces expone su péptido de fusión, permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal y liberando la nucleocápside en el citoplasma (89). Se ha demostrado que el colesterol es necesario para este paso de la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal (90). Una vez en el citosol, la nucleocápside se desensambla liberando el ARN genómico que actúa directamente como ARNm permitiendo la traducción de las proteínas virales necesarias para iniciar la replicación viral.

Tal como fue mencionado, las poliaminas son fundamentales para la replicación de CHIKV. Se ha demostrado que la expresión de SAT1 aumenta por estimulación de IFN-1 en respuesta a la infección por CHIKV, provocando una disminución de espermidina y espermina. Asimismo, se observó que la sobreexpresión de SAT1 limita la replicación de CHIKV, lo que sugiere que SAT1 actúa como un factor de restricción viral. Además, se observó que la depleción de poliaminas redujo la replicación viral por CHIKV en varios tipos celulares y organismos modelo y que las poliaminas contribuyen a la síntesis y traducción del ARN viral (78). En conjunto, estos datos sugieren que CHIKV depende de las poliaminas en múltiples etapas de su ciclo viral y que la vía metabólica de las poliaminas representa un objetivo prometedor para el desarrollo de antivirales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Las evidencias muestran que la ausencia de una ATP13A2 funcional está relacionada al desarrollo de neuropatologías mientras que su sobreexpresión se asocia a procesos tumorales. Estos resultados sugieren que tanto su ausencia como su sobreexpresión podrían influir en otros procesos patológicos hasta ahora no explorados. En este sentido resulta importante mencionar que esta proteína altera procesos como la homeostasis de lípidos y poliaminas y el funcionamiento del sistema endolisosomal, los cuales son esenciales para el ciclo de replicación de muchos virus. Consecuentemente, este trabajo propone explorar si la ATP13A2 también está involucrada en procesos de infección viral.

2.2. Objetivos específicos

En particular, este proyecto propuso evaluar si la expresión de la ATP13A2 tiene impacto sobre la infección del virus Chikunguña (CHIKV), ya que se ha demostrado que tanto el metabolismo de lípidos y poliaminas como el sistema endolisosomal, son cruciales para llevar a cabo su ciclo viral. Para esto se disponía de células derivadas de un neuroblastoma humano denominadas SH-SY5Y salvajes, o que sobreexpresaban la ATP13A2 activa o una versión mutante inactiva de esta proteína. Además, se propuso silenciar el gen codificante de la ATP13A2 en células SH-SY5Y mediante el sistema de CrisprCas9. Una vez obtenido un clon de células con el gen codificante de la ATP13A2 inactivado, se evaluó si se afecta la replicación viral del CHIKV mediante titulación por ensayo de unidades formadoras de placas en todas las líneas celulares mencionadas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos

Los reactivos fueron comprados a las siguientes compañías: enzimas utilizadas en las modificaciones de ADN, Thermofisher; oligonucleótidos iniciadores, Sigma; columnas para purificación de ADN, Quiagen Inc.; reactivos para cultivo de células, Sigma; suero fetal bovino, Natocor.

3.1.2. Células de mamífero y virus Chikunguña (CHIKV)

En este estudio se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266, American Type Culture Collection, ATCC) que expresan la ATP13A2 endógena. Las variantes de células SH-SY5Y transfectadas por lipofección con el vector de expresión pcDNA3.1 que expresan de manera estable la proteína humana ATP13A2 (ATP13A2) o una variante mutante de esta proteína en la cual el residuo catalítico Asp 508 fue sustituido por Asn (ATP13A2-D508N), fueron obtenidas previamente en nuestro laboratorio (7). El stock viral de CHIKV utilizado fue obtenido previamente y cedido generosamente por la Dra. Claudia Filomatori (91).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Construcción del plásmido CRISPR-Cas9 con la guía específica para inactivar el gen codificante de la ATP13A2

Para la generación del constructo CRISPR-Cas9 se emplearon los oligonucleótidos:

Forward:5'-CACCGTCCGGACGGCCCGGGGCGAG-3'

Reverse:5'-AAACCTCGCCCGGGCCGTCCGGAC-3'

Corresponden a la secuencia guía **GTCCGGACGGCCCGGGGCGAG** flanqueada por nucleótidos adaptadores requeridos para su inserción en el vector pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (plásmido #62988, Addgene, figura 2).

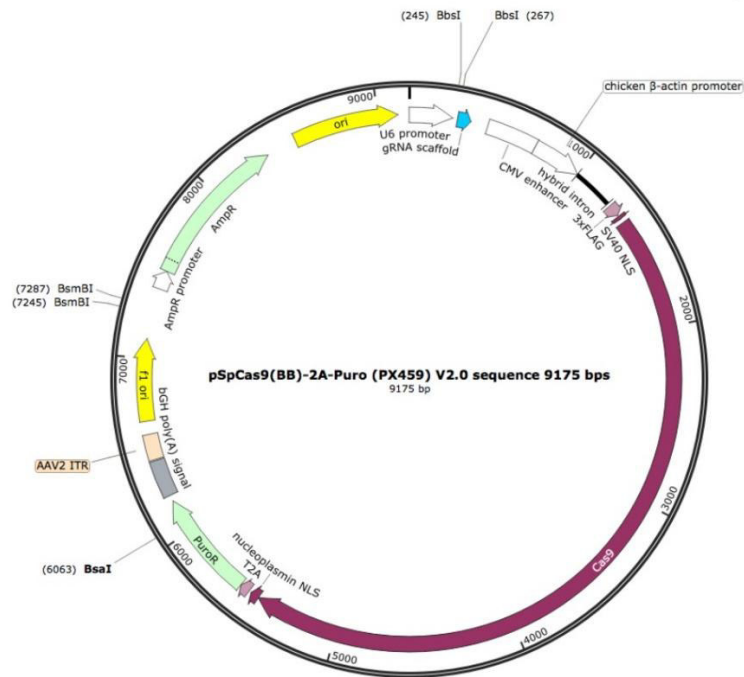


Figura 2. Mapa del vector pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (vector CRISPR-Cas9). Se indica el sitio de corte con BbsI en la posición 245 donde se insertarán los oligonucleótidos hibridados corriente arriba de la secuencia codificante del ARN guía (gARN). En violeta se muestra la secuencia correspondiente al gen codificante de la nucleasa Cas9. En verde claro se muestra el gen de selección que confiere resistencia a la ampicilina.

La secuencia blanco del genoma donde se dirigió el corte mediado por la nucleasa Cas9 para inactivar el gen de la ATP13A2 se encuentra en el exón 1 del gen:

Cadena codificante del exón 1:

5' TAGCCCAGCGCCCCTCGCCCCGGGGCCGTCCGGA CCGCGCCCCCGCCCAGGGCCTTGCGCACGCCG 3'

ARN guía-GAGCGGGGCCCGCAGGCCT 5' (se une a la codificante y la corta)

Cadena complementaria o molde del exón 1:

3' ATCGGGTCGC GGGGAGCGGGGCCCGCAGGCCTGGCGCGGGGGCGGGTCCCAGAACGCGTGCGGC 5'

5' CACCGTCCGACGGCCCCGGGCGAG 3' primer forward

Reverse 3' CAGGCCTGCCGGGCCCGCTC CAAA 5'

Exón 1 del gen codificante de la ATP13A2

Secuencia blanco

Secuencia PAM (sitio de corte de la Cas9)

Secuencias agregadas a los primers o cebadores para insertar los oligonucleótidos en el vector CRISPR-Cas9.

Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración final de 100 μM en agua libre de nucleasas. Para la formación del dúplex de oligonucleótidos, se mezclaron 1 μl de cada oligo (forward y reverse), 1 μl de tampón T4 polinucleótido quinasa (10 \times), 6.5 μl de agua libre de nucleasas y 0.5 μl de T4 polinucleótido quinasa, en un volumen total de 10 μl . La mezcla se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, seguida de una desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y un enfriamiento gradual hasta temperatura ambiente, con el fin de permitir la fosforilación y el apareamiento de los oligos en un termociclador VeritiPro, Thermofisher.

El vector CRISPR-Cas9 (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0) se digirió con la enzima de restricción BbsI. Para ello, se incubaron 1–2 μg de ADN plasmídico con 1 μl de BbsI y 2 μl de tampón 10 \times en un volumen total de 20 μL a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Al vector se lo trató con fosfatasa alcalina intestinal (1 U/ μl). Es recomendado para disminuir la probabilidad de religado del vector. Se utilizó la fosfatasa intestinal la cual es activa en la mayoría de los buffers de digestión. Para el tratamiento con fosfatasa se agregó 1 μl de la enzima al medio de digestión. Luego se mezcló e incubó por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, el vector digerido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa seguida de extracción del gel mediante el kit de Quiagem. Se armó el gel en cuba horizontal de 50 ml (49 ml de agua destilada + 1 ml de buffer TAE 50X) con un porcentaje de agarosa 1%. La detección se realizó con Bromuro de Etidio, es por eso que se incorporó el bromuro a la solución antes de gelificar: 15 μl de Bromuro de Etidio cada 50 ml de solución de agarosa. Se agregó solución de siembra para geles de agarosa (10x) al tubo conteniendo el vector digerido. Se sembró en una calle 1 μg de ADN plasmídico sin digerir como control.

Composición del buffer de siembra: para 10X 50% glicerol, 0.5 % P/V Azul de bromofenol, 1 mM EDTA. La electroforesis se llevará a cabo a en buffer TAE 1 X a un voltaje constante de 70 V durante aproximadamente 2 hs. Composición del buffer TAE: Tris-Acetato 40 mM-EDTA 1 mM

Para recuperar el fragmento de ADN a partir del gel se utilizó el método de extracción por adsorción de ADN a partículas de sílice (Qiaex II, Quiagem).

La ligación del dúplex de oligonucleótidos en el vector digerido se realizó en un volumen total de 10 μ l, que contenía 500 ng del vector linealizado, 1 μ l del dúplex de oligos (dilución 1:200), 1 μ l de tampón T4 ADN ligasa (10 \times), 0.5 μ l de T4 ADN ligasa y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. La mezcla se incubó durante 24 hs a 5°C.

Esta mezcla de ligación se utilizó posteriormente para transformar bacterias competentes como se describe a continuación.

3.2.2. Preparación de las bacterias competentes

Para estimular la capacidad de las bacterias de captar ADN (competencia) se utilizó un método químico basado en el tratamiento de las células con soluciones conteniendo cloruro de rubidio (RbCl₂). Las soluciones A (10 mM MOPS, pH 6.5 y 10 mM RbCl₂) y B (10 mM MOPS, pH 6.5, 50 mM CaCl₂ y 10 mM RbCl₂) se esterilizaron por filtración. A continuación, se detalla el protocolo utilizado para obtener bacterias competentes:

1. Se inocularon 5 ml de medio Luria Bertani (LB) con 10 μ l del stock de glicerol de bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α . Se incubó a 37°C overnight con agitación vigorosa.
2. Se inocularon 20 ml de medio LB con 0.2 ml del cultivo bacteriano obtenido overnight.
3. Las células crecieron hasta que la O.D₆₀₀ sea 0.13- 0.15 (aproximadamente 1-2 hs. A 37° C) para obtener células en crecimiento exponencial.
4. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 3000 x g 4°C en un tubo Sorvall estéril de 50 ml.
5. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 10 ml de solución A y se precipitaron nuevamente como se describió arriba.
6. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de solución B.
7. Se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos. Posteriormente las células se precipitaron como se describió arriba (5 minutos a 3000 xg)
8. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de solución B. Estas células competentes se transformaron con el ADN plasmídico obtenido previamente como se describe a continuación,

3.2.3. Transformación de bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α

Las bacterias competentes obtenidas como se indicó arriba fueron transformadas con el ADN plasmídico conteniendo el gARN y el gen codificante de la nucleasa Cas9 obtenido en el punto 3.2.1 de esta sección. Para esto se realizó el siguiente protocolo:

1. Se agregaron 3 μ l de DMSO a 200 μ l de células competentes DH5 α obtenidas como se describió en el punto anterior. Luego se agregó toda la mezcla de ligación obtenida en el punto 3.2.1 de esta sección.
2. Se incubaron las células 30 minutos en hielo.
3. Se realizó un Heat shock: 42°C- 2 minutos.
4. Se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37° C por 1 hora para permitir que las células se recuperen.
5. Se centrifugaron los microtubos por 5 minutos a 3000 xg.
6. Se descartó el sobrenadante por volcado y se resuspendieron las células en el volumen de medio residual.
7. Se plaquearon las células en una placa de LB-agarosa conteniendo 125 μ g/ml ampicilina debido al gen de selección del vector plasmídico utilizado y se incubaron las placas a 37° C por 16- 18 horas.

3.2.4. Selección de clones recombinantes

Se analizó el resultado de la transformación mediante el conteo del número de colonias. Se consideró la relación entre el número de colonias de la placa control -con bacterias transformadas solo con el vector plasmídico digerido pero sin la mezcla de oligonucleótidos hibridados (control de religación)- y de la placa con bacterias transformadas con el vector plasmídico digerido y la mezcla de oligonucleótidos hibridados (placa muestra). Algunas de las colonias recombinantes obtenidas en la placa muestra se analizaron para verificar la presencia del inserto (oligonucleótidos hibridados). Para esto se tomaron muestras de las colonias individuales, se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina durante 18 hs a 37°C y se purificó el ADN plasmídico mediante minipreparación como se describe a continuación.

3.2.5 Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación)

- 1) Se procedió a picar una colonia e inocular en 5 ml de LB con ampicilina. Creció hasta saturación overnight (18 hs) con agitación a 37° C.
- 2) Se alicuotó de a 1.5 ml en tubos de microcentrífuga y centrifugó a 3 000 xg por 1 min. Al descartar el sobrenadante, se agregó otros 1.5 ml y el procedimiento se repitió. Luego se resuspendió el precipitado mediante agitación y pipeteo en 300 μ l de solución **P1** con ARNsa (se guardó en heladera) todo se realizó a temperatura ambiente.

Hasta aquí todo se hizo en esterilidad, de tal manera de no contaminar el cultivo inicial.

- 3) Se agregó 300 μ l de solución **P2** a cada tubo y se homogeneizó inmediatamente por inversión. Se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 4) Se agregaron 300 μ l de solución **P3** fría, se homogeneizó por inversión varias veces y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Por 15 minutos se centrifugó a 13 000 xg en centrífuga refrigerada y con extremo cuidado se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo.
- 6) El ADN plasmídico se precipitó mediante el agregado de 700 μ l de isopropanol 100%. Se invirtió varias veces y centrifugó a 13 000 xg por 15 min a temperatura ambiente.
- 7) Luego se descartó el sobrenadante por volcado y se lavó el precipitado con 700 μ l de etanol 70% frío (en el freezer). Las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13000 xg, y se descartó el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado.
- 8) Por último, se dejó secar el precipitado conteniendo el ADN plasmídico asilado por 10- 15 min y se resuspendió en 20 μ l de H₂O bd.

Composición de buffers: P1, P2, P3.

P1: 50 mM Tris-HCl (pH8); 10 mM EDTA-TRIS; 100 μ g ARNsa/ml

P2: 200 mM NaOH; 1% SDS;

P3: 2.55 M KAc (pH 4.8)

3.2.6. Verificación del ADN plasmídico aislado

La inserción de los oligonucleótidos para generar el ARN guía (gARN) en el vector plasmídico, se verificó inicialmente por PCR utilizando como templado los distintos plásmidos (ADN plasmídicos) aislados mediante minipreparación, junto con el cebador universal U6-F y el cebador reverse mencionado en el punto 3.2.1 de esta sección. Considerando que el sitio de unión del primer U6-F en el plásmido se encuentra unos 350 pares de bases (bp) corriente arriba del sitio de inserción de los oligonucleótidos hibridados en el vector digerido, se espera un amplicón de aproximadamente 350 bp en esta reacción de PCR si la inserción se realizó correctamente. Los productos amplificados se separaron y visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se eligió uno de los plásmidos donde se observó un producto amplificado del tamaño deseado (350 bp) para verificar la presencia del gARN mediante secuenciación de Sanger (Macrogen) utilizando el cebador universal U6-F. Este ADN plasmídico con la secuencia del ADN codificante del gARN corroborada por secuenciación, se empleó posteriormente para la transfección en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

3.2.7. Cultivo de células

Las variantes de células SH-SY5Y transfectadas por lipofección con el vector de expresión pcADN3.1 (SH-SY5Y) que expresan de manera estable la proteína humana ATP13A2 (ATP13A2) o una forma mutante de esta proteína en la cual el residuo catalítico Asp 508 fue sustituido por Asn (ATP13A2-D508N), fueron obtenidas obtuvieron previamente en nuestro laboratorio (7).

Las células se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 300 µg/ml de geneticina (G418) en células ATP13A2 y ATP13A2-D508N (debido al marcador de selección proporcionado por el vector), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (SFB). El pH de los medios utilizados fue de 7.4. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂/aire sobre placas de cultivo de plástico estándar. El medio fue renovado cada 3-4 días aproximadamente, cuando las monocapas celulares alcanzaron la confluencia se las transfirió a nuevos recipientes mediante disociación con tripsina. Este procedimiento consistió en la incubación con una solución de tripsina 0.5 g/l – EDTA 2.75 mM durante 2 minutos a 37°C. La solución de tripsina-EDTA fue

descartada las células fueron resuspendidas en medio de cultivo y se estimó su concentración mediante cámara de Neubauer. Finalmente, se plaqueó el número adecuado de células en frascos nuevos, se agregó medio de cultivo y la incubación se realizó en las condiciones antes mencionadas.

3.2.8. Transfección de células SH-SY5Y para obtener clones de células con el gen codificante de la ATP13A2 inactivado

Se plaquearon 150000 células SH-SY5Y en placas multiwell de 24 pocillos y al día siguiente se les cambió el medio de cultivo por 300 µl de DMEM sin SFB. A las 24 hs se transfectaron con el ADN plasmídico obtenido según lo descrito en el punto 3.2.6. de esta sección, utilizando el reactivo Polyethylenimine (PEI, Sigma) según:

- Se incubaron 0.8 µg ADN plasmídico con 50 µl DMEM sin suplementar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- A esta mezcla se agregaron 7.5 µl PEI y se incubaron por otros 10 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente se agregó toda la mezcla a las células y se incubaron durante 4 hs a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂/aire. A continuación, se cambió el medio de cultivo por 400 µl de medio DMEM suplementado con SFB y se dejó incubando en las condiciones mencionadas previamente.
- Transcurridas 48 hs, las células fueron tripsinizadas y contabilizadas como se describió en la sección anterior. A continuación, se tomó el volumen adecuado para sembrar 1000 células en placas de cultivo de 10 cm que se incubaron en las condiciones mencionadas con el objetivo de obtener clones individuales aislados.

3.2.9. Aislamiento de clones de células SH-SY5Y transfectadas

La incubación de la placa de 10 cm con las células SH-SY5Y transfectadas con el vector portando el gARN y el gen codificante de la nucleasa Cas9, se prolongó durante 10-14 días hasta la visualización de clones individuales. El medio de cultivo fue cambiado cada 5-6 días. Las células de clones individuales fueron levantadas por tripsinización y traspasadas a distintos pocillos de una placa multiwell de 96 pocillos. Se dejaron incubando en las condiciones mencionadas anteriormente hasta llegar a confluencia. Posteriormente, las células fueron nuevamente traspasadas por tripsinización a pocillos

individuales de una placa multiwell de 24 pocillos para aumentar el número de células de cada uno de los clones aislados.

3.2.10. Ensayo de proliferación celular

Las células fueron sembradas en medio completo en placas de cultivo de 96 pocillos (10^4 células/pocillo) a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO_2 tal como se describió previamente. Después de 24, 48 y 72 h, se evaluó la viabilidad celular midiendo la actividad de la β -hexosaminidasa endógena (92). Brevemente, luego del tiempo mencionado de cultivo, las células se lavaron dos veces con 100 μl de PBS y se agregaron 60 μl de una solución conteniendo 3.8mM del sustrato de la hexosaminidasa (p-nitrofenil N-acetil β -D-glucosaminida, Sigma), buffer citrato de sodio 50 mM, y Tritón X-100 0,25%. Se incubó durante 4 h en estufa a 37°C . Finalmente, se agregaron 90 μl del reactivo revelador (Glicina/NaOH 0,1 M pH 10,4, EDTA 10 mM) y se registró la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (BioTek Synergy H1).

3.2.11. Infección de células SH-SY5Y con CHIKV

Se sembraron 80000 células por pocillo en placa multiwell de 24 pocillos y a las 96 hs fueron infectadas con CHIKV según:

- Se extrajo el medio de cultivo y las células se lavaron con 250 μl de buffer fosfato salino (PBS).
- Se agregaron 200 μl de DMEM sin suplementar + 8 μl de un stock viral (MOI 0.5, 5 partículas virales por cada 10 células) por pocillo y se incubó por 1h a 37°C atmósfera humidificada con 5% de CO_2 /aire, agitando suavemente cada 20 minutos.
- Finalmente, se extrajo el medio de infección y se agregaron 800 μl de DMEM suplementado y se dejó incubando en las condiciones recién mencionadas.
- A las 8, 24 y 48 hs post infección se tomaron alícuotas del sobrenadante de cultivo de 50 μl cada una, las cuales se almacenaron a -80°C para la posterior titulación de la carga viral.

3.2.12. Titulación de CHIKV en los sobrenadantes colectados

Se realizó la titulación de la carga viral de cada una de las alícuotas almacenadas a distintos tiempos obtenidas a partir de los sobrenadantes de los distintos cultivos celulares según:

- Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) de cada alícuota que se utilizaron para infectar células Vero previamente sembradas en placa multiwell de 24 pocillos en medio DMEM suplementado.
- Se incubó durante 1 h a 37°C
- Se agregaron 500 ml de medio DMEM conteniendo 2% SFB y 0.8 % metil celulosa y se incubó a 37°C durante 3 días.
- Se agregó 1 ml de formaldeído 10% y se dejó 1 h en el flujo laminar
- Se lavó 5 veces con H_2O y se dejó secar boca abajo durante 5 minutos
- Se incubó durante 1 h con solución de cristal violeta 0.1%
- Se repitió el paso de lavado y secado descrito anteriormente
- Se registraron las placas de lisis mediante fotografía de los cultivos de células Vero y se estimó el número de unidades formadoras de placa (UFP) según:
$$\text{UFP/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de placas de lisis/volumen inoculado (ml) x factor de dilución.}$$

4. RESULTADOS

4.1. Inserción de los oligonucleótidos hibridados en el vector CRISPR-Cas9.

Se inició el estudio mediante la generación del vector CRISPR-Cas9 codificante del gARN para inactivar el gen endógeno codificante de la ATP13A2, tal como se describió en el punto 3.2.1. Con este propósito, primero se determinaron las condiciones de digestión del vector CRISPR-Cas9 con la enzima BbsI. En la figura 3 puede observarse una única banda de ADN correspondiente a 3 μ g de vector CRISPR-Cas9 digerido con 1 U de la enzima BbsI durante 24h a 37°C. En la calle 1 de la figura 3 (panel de la izquierda), se sembraron 2 μ g del vector sin digerir; puede observarse una banda de ADN mayoritaria que corresponde el vector superenrollado que migra como si tuviera un peso molecular menor, y otra banda de ADN minoritaria correspondiente al vector linealizado cuya migración coincide con la del vector digerido de la calle 2. En la calle 2 se observa una banda de ADN única del tamaño correspondiente al vector linealizado, lo que demuestra que la digestión fue del 100 % en las condiciones mencionadas.

En el panel de la derecha de la figura 3 se muestra el taco de agarosa conteniendo el vector digerido que fue removido para su purificación como fue mencionado en la sección 3.2.1.

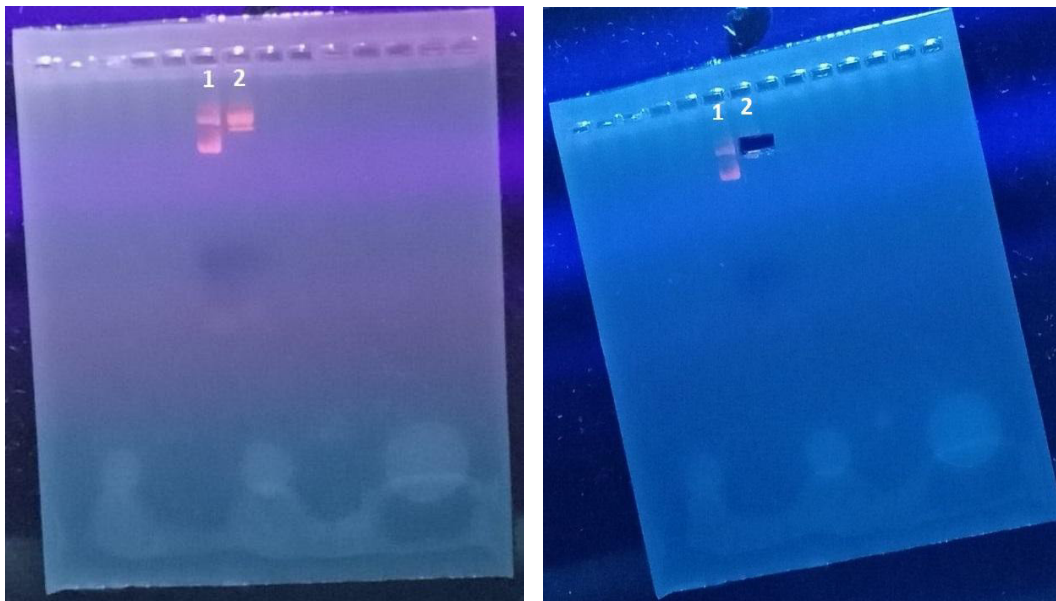


Figura 3. Observación de la digestión del vector CRISPR-Cas9 con BbsI mediante electroforesis en gel de agarosa. Las bandas de ADN de las calles 1 y 2 corresponden al vector

sin digerir y digerido (linealizado). El panel de la derecha muestra el taco de gel de agarosa extraído para purificar el vector linealizado de la calle 2.

La eficiencia de la extracción del ADN del taco de gel de agarosa resultó del 60% ya que se recuperaron 1,8 µg de ADN de los 3 µg iniciales (tabla 2).

Tipo de muestra	ADN
Well ID	Muestra
260 nm	0.098
280 nm	0.052
260/280	1,88
ng/µl	90,15

Tabla 2. Cuantificación de ADN mediante el módulo Take3 del lector de placas BioTek Synergy H1. La concentración de ADN fue determinada utilizando el módulo Take3 del lector de microplacas BioTek Synergy H1, el cual permite realizar mediciones espectrofotométricas en microvolúmenes. Se muestra la absorbancia a 260nm, 280nm y la relación entre ambos valores, Para la cuantificación se utilizó 1 µl de la muestra de los 20 µl totales obtenidos. La última fila muestra el valor obtenido para la muestra expresado en ng/µL.

La ligación del vector digerido con los oligonucleótidos hibridados se realizó como se describió en la sección 3.2.1. A continuación se utilizó esta mezcla de ligación para transformar bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5α tal como se detalló en las secciones 3.2.2 y 3.2.3. En la figura 4 se observan las placas conteniendo las colonias de bacterias transformadas. Se logró obtener células competentes que se transformaron eficientemente tal como lo muestra el elevado número de colonias obtenidas en la placa de células transformadas con un vector control no digerido (a). Asimismo, puede observarse que la placa conteniendo la mezcla de ligación del vector digerido y los oligonucleótidos hibridados (b) contiene colonias de células transformadas, mientras que no se obtuvieron colonias en la placa donde las células fueron transformadas con la misma cantidad de vector digerido pero sin la presencia de los oligonucleótidos hibridados (c).

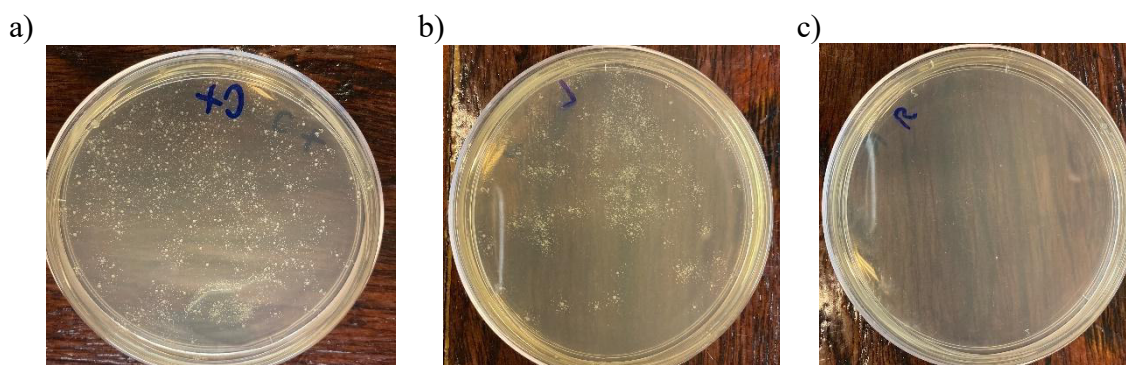


Figura 4. Obtención de colonias de bacterias transformadas con el vector CRISPR-Cas9 conteniendo los oligonucleótidos hibridados. a) Bacterias transformadas con 500 ng de vector control no digerido (control de competencia). b) Bacterias transformadas con la mezcla de ligación del vector digerido y los oligonucleótidos hibridados. c) Bacterias transformadas con la misma cantidad de vector digerido pero sin la presencia de los oligonucleótidos hibridados (control de religación).

A continuación, se tomaron muestras de algunas de las colonias de bacterias transformadas para aislar el ADN plasmídico mediante minipreparación tal como se describió en la sección 3.2.5. En la figura 5 se muestra un gel de agarosa donde se observan las bandas correspondientes al ADN plasmídico aislado de cada colonia de bacterias transformadas. Se puede observar que el ADN plasmídico aislado de cada colonia (calles 2,3,4 y 5) migra como se observa en la calle 1 correspondiente al vector control no digerido.



Figura 5. Observación del ADN plasmídico extraído de colonias de bacterias transformadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Se sembraron 1.5 μ l de ADN plasmídico de cada muestra. La muestra de ADN de la calle 1 corresponde al vector CRISPR-Cas9 original no digerido. Las calles 2 a 5 muestran al ADN plasmídico aislado de 4 colonias transformadas con la mezcla de ligación del vector digerido y los oligonucleótidos hibridados (colonias 1 a 4).

A continuación, se estimó la concentración de ADN plasmídico aislado de cada colonia de bacterias transformadas. Como se desprende de la tabla 3, se obtuvieron valores de concentración similares en todos los casos (entre 1.5 y 2.7 μ g de ADN/ μ l).

Tipo de muestra	DNA	
Well ID	Colonia 1	Colonia 2
260 nm	3,394	2,395
280 nm	3,117	1,309
260/280	1,089	1,829
ng/μl	2714,955	1916,167
Well ID	Colonia 3	Colonia 4
260 nm	2,514	1,993
280 nm	1,363	1,1
260/280	1,845	1,811
ng/μl	2010,882	1594,027

Tabla 3. Cuantificación de ADN plasmídico extraído de cada colonia de bacterias mediante el módulo Take3 del lector de placas BioTek Synergy H1. La concentración de ADN plasmídico extraído de las colonias 1 a 4 fue determinada utilizando el módulo Take3 del lector de microplacas BioTek Synergy H1, el cual permite realizar mediciones espectrofotométricas en microvolúmenes. Se muestra la absorbancia a 260nm, 280nm y la relación entre ambos valores, Para la cuantificación se utilizó 1 μl de la muestra de los 20 μl totales obtenidos. El valor resaltado en negrita corresponde a la concentración de ADN plasmídico expresada en ng/μl obtenida para las colonias 1 a 4.

La verificación de la presencia de los oligonucleótidos hibridados en el vector se realizó inicialmente mediante PCR utilizando el oligonucleótido universal U6-F y el cebador reverse utilizado en la hibridización, tal como se menciona en el punto 3.2.6. En la figura 6 se muestra el resultado de la PCR en un gel de agarosa. En la calle 1 se utilizó como templado en la reacción de PCR un ADN plasmídico control obtenido previamente; allí se observa una banda de ADN amplificado del tamaño esperado (control positivo). En las calles 2 a 4, se observa que la única banda de ADN amplificada en la reacción de PCR donde se usó como templado el ADN plasmídico aislado de las colonias de bacterias 1 a 3, coincide con el tamaño del ADN amplificado de la calle 1. Esto demuestra la presencia del oligonucleótido reverse utilizado durante el paso de hibridización y sugiere que el par de oligonucleótidos hibridados está presente en el ADN plasmídico aislado que se utilizó como templado en la reacción de PCR.

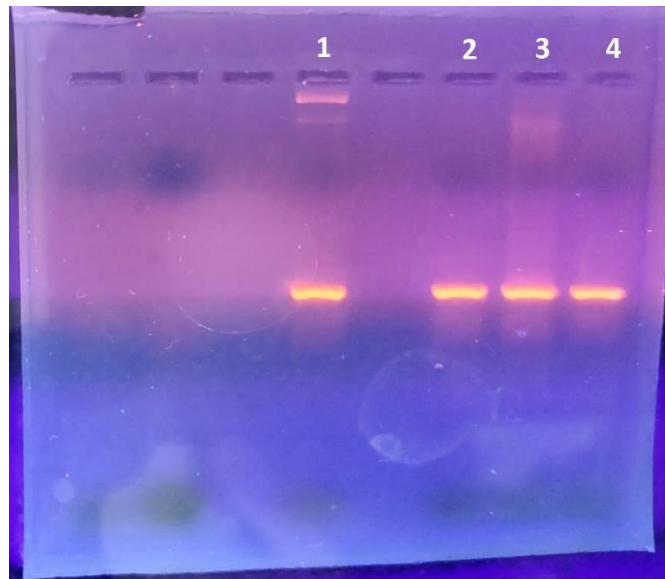


Figura 6. Observación del ADN amplificado mediante PCR utilizando el ADN plasmídico extraído de colonias de bacterias como templado. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde se sembraron los 50 µl de cada reacción de PCR. En la calle 1 se usó como templado en la reacción de PCR un ADN plasmídico control que contiene un par de oligonucleótidos en la posición adecuada y por lo tanto muestra el tamaño del amplicón esperado (control positivo). En las calles 2 a 4 se muestra la banda de ADN amplificado en cada reacción de PCR donde se usó como templado el ADN plasmídico extraído de las colonias de bacterias transformadas 1 a 3.

La presencia del par de oligonucleótidos fue corroborada mediante secuenciación (Macrogen) en el ADN plasmídico extraído a partir de la colonia de bacterias transformadas número 3. Consecuentemente, este fue el ADN plasmídico elegido para la transfección de células eucariotas.

4.2. Transfección de células SH-SY5Y para obtener clones con el gen de la ATP13A2 inactivado.

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron transfectadas con el ADN plasmídico de la colonia de bacterias número 3 como se describió en el punto 3.2.8. En la figura 7 se muestran las placas de cultivo de células eucariotas a los 10-14 días post transfección donde se visualizan los clones individuales macroscópicamente.

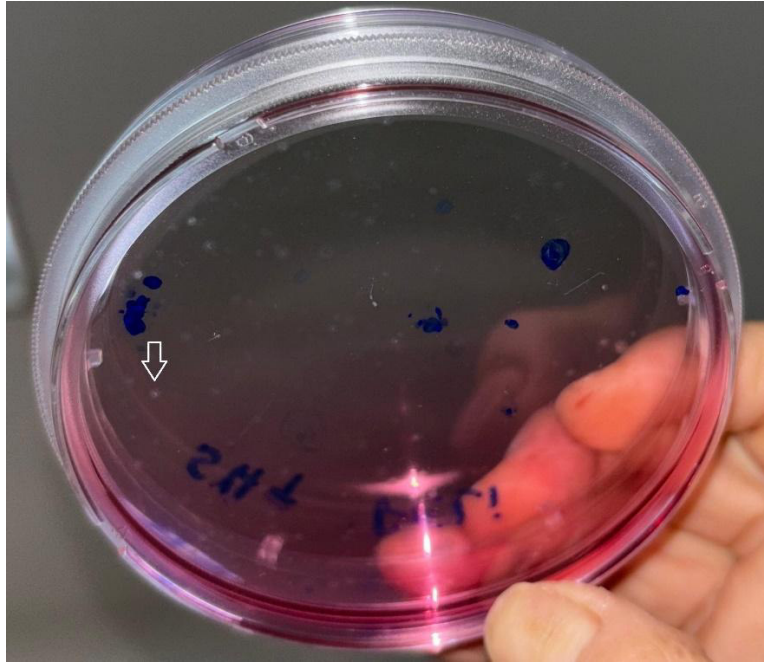


Figura 7. Observación de clones individuales de células SH-SY5Y transfectadas con el ADN plasmídico codificante del gARN para inactivar el gen de la ATP13A2 y la nucleasa Cas9. Algunas de las células transfectadas fueron sembradas en placas de 10 cm y mantenidas en las condiciones mencionadas en el punto 3.2.7. En la figura se muestra una de las placas donde se visualizan los clones independientes luego de 14 días de incubación. La flecha blanca indica uno de los clones de células.

Los clones individuales fueron visualizados también microscópicamente (figura 8) y marcados para su aislamiento como se mencionó en la sección 3.2.9 en placas multiwell de 96 pocillos.

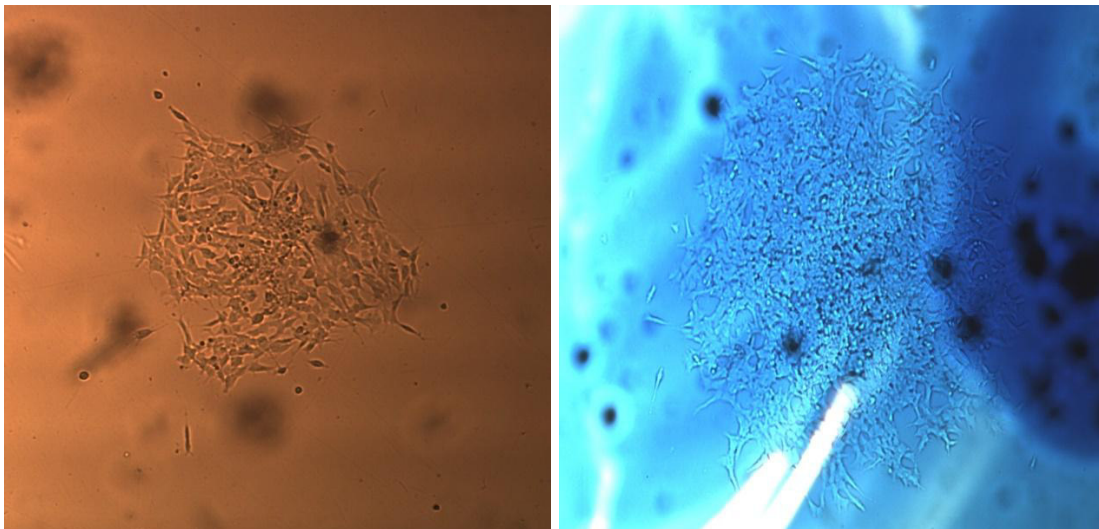


Figura 8. Observación de clones individuales de células SH-SY5Y transfectadas con el ADN plasmídico codificante del gARN para inactivar el gen de la ATP13A2 y la nucleasa Cas9 mediante microscopía de campo claro con un aumento de 100x. El panel de la izquierda muestra un clon individual de células SH-SY5Y luego de 14 días de incubación. La imagen de la

derecha muestra un clon que se marcó para su posterior aislamiento y pasaje a placa multiwell de 96 pocillos.

Se logró aislar exitosamente 10 clones independientes (1 a 10) que crecieron hasta poder ser traspasados a placas multiwell de 24 pocillos para aumentar el número de células de cada clon. Notablemente, se observó una marcada diferencia en la tasa de proliferación entre los distintos clones obtenidos.

4.2.1. Estimación de la tasa de crecimiento de los clones de células SH-SY5Y transfectadas.

Siendo que se observó una clara diferencia en la velocidad de crecimiento de los distintos clones de células transfectadas con el ADN plasmídico codificante del gARN para inactivar el gen de la ATP13A2 y la nucleasa Cas9, se eligieron los clones 3,4,5,6 y 9 para estimar la tasa de proliferación. Para esto se sembraron células SH-SY5Y o de los clones mencionados en una placa multiwell de 96 pocillos y se estimó el número de células mediante la cuantificación de la actividad β -hexosaminidasa durante 72 horas, como se mencionó en el punto 3.2.10. En la figura 9 se puede observar que los clones 3,4 y 6 tienen una tasa de crecimiento inferior que los clones 5 y 9 que no se diferenciaron de las células SH-SY5Y usadas como control.

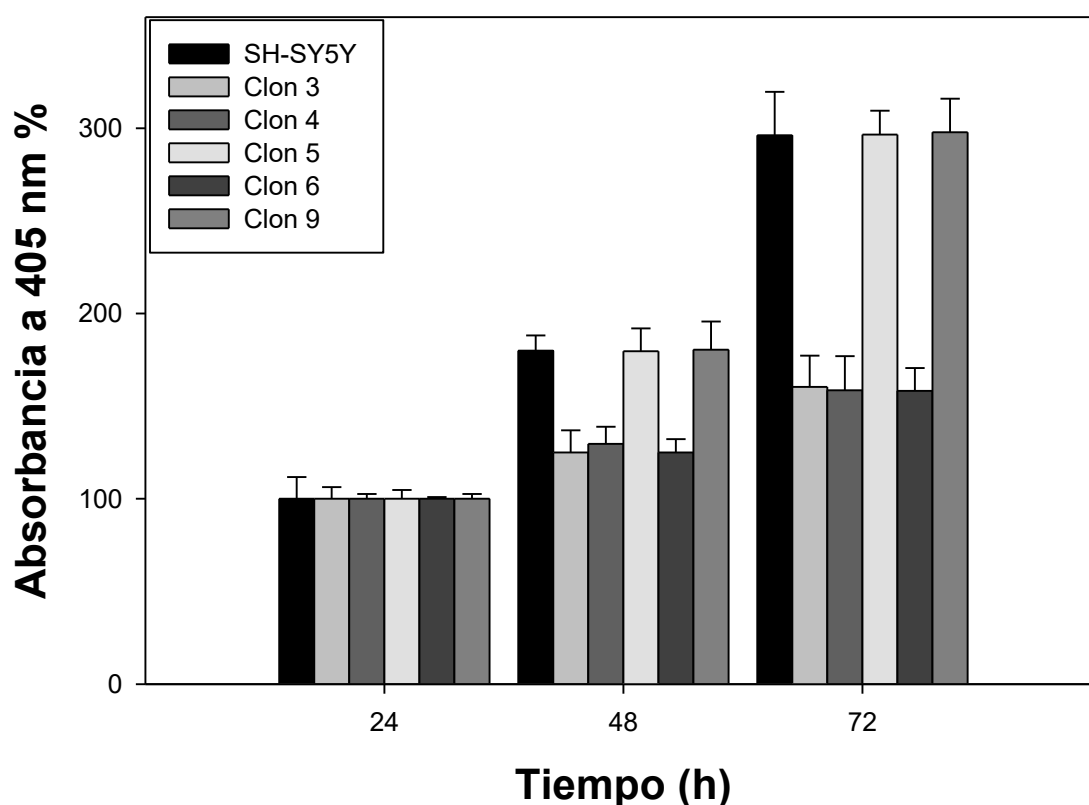


Figura 9. Crecimiento de células SH-SY5Y o de los clones 3,4,5,6 y 9. Las células sembradas en microplacas se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37 °C en condiciones de subconfluencia. El ensayo de viabilidad se realizó midiendo la actividad de la enzima endógena β -hexosaminidasa. Aunque se sembraron 10^4 células en cada pocillo, los valores se expresan como el porcentaje de la absorbancia medida a 405 nm para cada línea celular incubada durante 24 h; esto es para evitar errores en el recuento de células o en la supervivencia celular durante el procedimiento de siembra. Los datos se muestran como medias \pm el desvío estándar de un experimento realizado por duplicado.

Para corroborar la delección del gen que codifica la ATP13A2, actualmente se está amplificando el clon 6 con el fin de extraer el ADN y enviarlo a secuenciar. Esto no pudo realizarse antes de la fecha de entrega de esta tesina debido a que las células crecen muy lentamente, y se priorizó el congelamiento de varias muestras del clon antes de obtener la cantidad suficiente de células que permitiera extraer exitosamente la cantidad necesaria de ADN.

4.3. Infección de células SH-SY5Y con CHIKV.

Para realizar los ensayos destinados a evaluar la infección con CHIKV se utilizaron células SH-SY5Y salvajes que expresan ATP13A2 endógena, células que sobreexpresan ATP13A2 (ATP13A2), células que expresan la variante inactiva de esta proteína (ATP13A2-D508N) y el clon 6, correspondiente a células transfectadas con el ADN plasmídico codificante del gARN para inactivar el gen de ATP13A2 y la nucleasa Cas9, como se detalla en el punto 3.2.11.

Pudimos observar que, a las 48 h, las células ya se encontraban muy afectadas por la infección viral, por lo cual no se realizó la titulación correspondiente este punto. Como resultado preliminar, fue interesante observar que las células del clon 6 parecieron presentar una leve mayor resistencia a la infección por CHIKV.

La titulación de las partículas virales obtenidas a partir de las alícuotas de los sobrenadantes colectadas a las 0, 8 y 24 h post infección se realizó según lo descrito en el punto 3.2.12. El título viral fue determinado a partir del recuento de unidades formadoras de placas (UFP) obtenidas tras la infección de la monocapa celular. En la Figura 10 se muestra una imagen representativa de las unidades formadoras de placa.

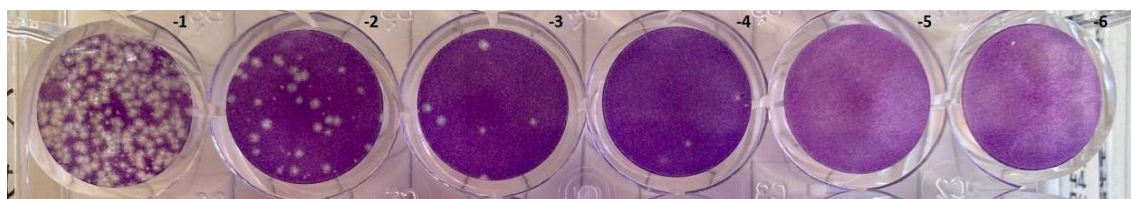


Figura 10. Titulación de las partículas virales contenidas en el sobrenadante de células SH-SY5Y infectadas con CHIKV mediante recuento de UFP. Se observan las unidades formadoras de placas como puntos blancos sobre la monocapa celular teñida con cristal violeta. Se muestra la imagen utilizada para calcular el título viral de la alícuota recolectada a partir del sobrenadante de células SH-SY5Y a las 8 h de la infección con CHIKV. Los números indican el factor de dilución.

En la tabla 4 y figura 11 se muestran los valores de UFP obtenidos para cada línea celular a las 8 y 24 h post infección con CHIKV. No se observaron UFP para las alícuotas recolectadas a tiempo 0 en ninguna de las líneas celulares.

Línea celular	UFP/ml (8hs post infección)	UFP/ml (24hs post infección)
SH-SY5Y	$2,3 \times 10^4 \pm 0.7$	$3,5 \times 10^5 \pm 0.6$
ATP13A2	$2.5 \times 10^4 \pm 0.5$	$3.7 \times 10^5 \pm 0.5$
ATP13A2-D508N	$2,6 \times 10^4 \pm 0.6$	$3.8 \times 10^5 \pm 0.4$
Clon 6 (ATP13A2-)	$1.8 \times 10^4 \pm 0.5$	$3.1 \times 10^5 \pm 0.6$

Tabla 4. UFP obtenido para cada línea celular. El cálculo se realizó eligiendo las diluciones que permiten contar el número de placas de lisis para cada tiempo evaluado. El UFP informado resulta del promedio de los UFPs obtenidos \pm el desvío estándar, para cada muestra a las 8 y 24 h post infección.

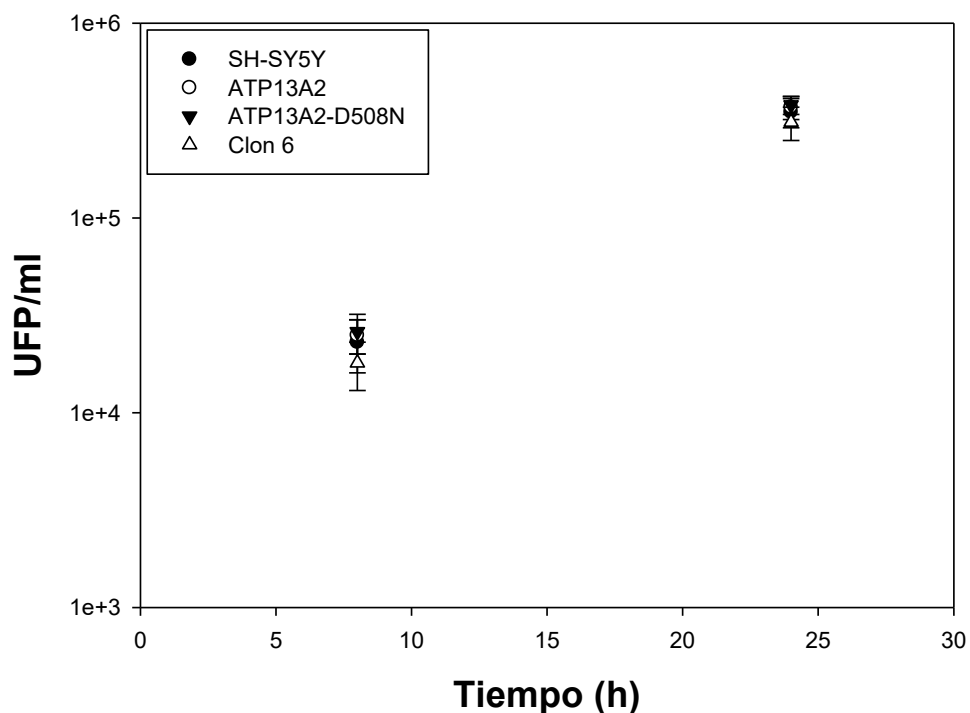


Figura 11. Curva de crecimiento viral obtenido a partir del sobrenadante de cultivo de cada línea celular luego de la infección con CHIKV.

Si bien no se observaron diferencias significativas entre las líneas celulares — debido a que no se pudo realizar la cantidad de réplicas del ensayo necesarias— el sobrenadante aislado de células del clon 6 que no expresaría la ATP13A2, mostró una tendencia a una menor formación de UFPs.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se construyó exitosamente el vector plasmídico CRISPR-Cas9 con la guía específica para inactivar el gen codificante de la ATP13A2. A partir del resultado de secuenciación se pudo constatar que la inserción de los oligos hibridados en la región 5' de la secuencia codificante del gARN fue exitosa, lo que permitió avanzar con la edición génica en células SH-SY5Y.

Mediante la transfección de células SH-SY5Y con dicho vector plasmídico, se aislaron 10 clones independientes. La observación microscópica de cada clon permitió su aislamiento y expansión individual para continuar el estudio.

Los clones obtenidos mostraron diferencias marcadas en sus tasas de proliferación, evaluadas mediante la cuantificación de la actividad β -hexosaminidasa durante 72 h. En particular, los clones 3, 4 y 6 exhibieron un crecimiento más lento que las células SH-SY5Y control, lo que sugiere que la inactivación del gen ATP13A2 podría afectar procesos celulares asociados al crecimiento y a la proliferación. Esto es esperable considerando que es sabido que las poliaminas estimulan la división celular y que esta ATPasa actúa exportando poliaminas desde el interior de los endolisosomas hacia el citosol.

Finalmente, se implementó con éxito el protocolo de infección con CHIKV y la recolección de sobrenadantes para su titulación mediante la formación de placas. Si bien no se pudo evaluar la significancia de las diferencias, se establecieron las condiciones para futuros análisis comparativos de replicación viral entre las distintas líneas celulares. La obtención de un clon de células SH-SY5Y con la delección del gen de la ATP13A2 permite disponer de las cuatro líneas celulares necesarias para el estudio comparativo de la infección por CHIKV, conformando un modelo experimental adecuado para analizar cómo las variaciones en la expresión o función de ATP13A2 pueden modular la replicación viral.

6. REFERENCIAS

- 1- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G. "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." (1998) *J. Mol. Evol.* 46, 84e101.
- 2- Schultheis, P.J., Hagen, T.T., O'Toole, K.K., Tachibana, A., Burke, C.R., McGill, D.L., Okunade, G.W., Shull, G.E. "Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice." (2004) *Biochem Biophys Res Commun.*; 323(3):731-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.156. PMID: 15381061.
- 3- Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron MH, Doudnikoff E, Vital A, Vila M, Klein C, Bezard E. Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 12;109(24):9611-6. doi: 10.1073/pnas.1112368109. Epub 2012 May 30. PMID: 22647602; PMCID: PMC3386132.
- 4- van Veen S, Martin S, Van den Haute C, Benoy V, Lyons J, Vanhoutte R, Kahler JP, Decuyper JP, Gelders G, Lambie E, Zielich J, Swinnen JV, Annaert W, Agostinis P, Ghesquière B, Verhelst S, Baekelandt V, Eggermont J, Vangheluwe P. "ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export." (2020) *Nature*;578(7795):419-424. doi: 10.1038/s41586-020-1968-7.
- 5- Liu, J., Li, J., Lu, Y., Tang, Y., Wang, Z., Shen, Y., Wang, L., Hao, H., Chen, G., Zhang, M. "Neurodegenerative disorders reversed by ATP13A2 flipping sphingomyelin across lysosome." (2025) *Research Square*, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6008074/>
- 6- de La Hera, D.P., Corradi, G.R., Adamo, H.P., de Tezanos Pinto, F. "Parkinson's disease-associated human P5B-ATPase ATP13A2 increases spermidine uptake." (2013) *Biochem. J.*; 450, 47e53. <https://doi.org/10.1042/BJ20120739>.
- 7- Marcos AL, Corradi GR, Mazzitelli LR, Casali CI, Fernández Tome MDC, Adamo HP, de Tezanos Pinto F. The Parkinson-associated human P5B-ATPase ATP13A2 modifies lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019 Oct 1;1861(10):182993. doi: 10.1016/j.bbmem.2019.05.015. Epub 2019 May 24. PMID: 31132336.
- 8- Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I., Kubisch, C. "Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase." (2006) *Nat. Genet.*; 38 (10), 1184e1191.
- 9- Bras, J., Verloes, A., Schneider, S.A., Mole, S.E., Guerreiro, R.J. "Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis." (2012) *Hum. Mol. Genet.*; 21 (12), 2646e2650. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds089>.
- 10- Estrada-Cuzcano, A., Martin, S., Chamova, T., Synofzik, M., Timmann, D., Holemans, T., Andreeva, A., Reichbauer, J., De Rycke, R., Chang, D., van Veen, S., Samuel, J., Scho, L., Poppel, T., Mollerup Sørensen, D., Asselbergh, B., Klein, C., Zuchner, S., Jordanova, A., Vangheluwe, P., Tournev, I., and Schule, R. "Loss-of-function mutations in the ATP13A2/PARK9 gene cause complicated hereditary spastic paraplegia." (2017) *Brain*; 140 (Pt 2), 287-305.
- 11- Spataro, R., Kousi, M., Farhan, S.M.K., Willer, J.R., Ross, J.P., Dion, P.A., Rouleau, G.A., Daly, M.J., Neale, B.M., La Bella, V., Katsanis, N. "Mutations in ATP13A2 (PARK9) are associated with an amyotrophic lateral sclerosis-like phenotype, implicating this locus in further phenotypic expansion." (2019) *Hum Genomics.*;13(1):19. doi: 10.1186/s40246-019-0203-9.

- 12- Zhang, F., Wu, Z., Yu, B., Ning, Z., Lu, Z., Li, L., Long, F., Hu, Q., Zhong, C., Zhang, Y., Lin, C. "ATP13A2 activates the pentose phosphate pathway to promote colorectal cancer growth through TFE3-PGD axis." (2023) *Clin Transl Med.*;13(5):e1272. doi: 10.1002/ctm2.1272.
- 13- Zhao Z, Peng Y, Yang Y, Li S, Ling J, Zhu Z, He C. ATP13A2 as a prognostic biomarker and its correlation with immune infiltration in cervical cancer: A retrospective study. *J Cell Mol Med.* 2025 Apr;29(7):e70097. doi: 10.1111/jcmm.70097. PMID: 40197818; PMCID: PMC11976316.
- 14- Madan, M., Patel, A., Skrubber, K., Geerts, D., Altomare, D.A., Iv, O.P. "ATP13A3 and caveolin-1 as potential biomarkers for difluoromethylornithine-based therapies in pancreatic cancers." (2016) *Am. J. Cancer Res.*; 6(6):1231-52.
- 15- Sekhar, V., Andl, T., Phanstiel, O. "ATP13A3 facilitates polyamine transport in human pancreatic cancer cells." (2022) *Sci Rep.*; 12(1):4045. doi: 10.1038/s41598-022-07712-4. PMID: 35260637; PMCID: PMC8904813.
- 16- Fariás, M.A., Diethelm-Varela, B., Navarro, A.J., Kalergis, A.M., González, P.A. "Interplay between Lipid Metabolism, Lipid Droplets, and DNA Virus Infections." (2022) *Cells*; 11(14):2224. doi: 10.3390/cells11142224. PMID: 35883666; PMCID: PMC9324743.
- 17- Mounce BC, Olsen ME, Vignuzzi M, Connor JH. 2017. Polyamines and Their Role in Virus Infection. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:10.1128/mmbr.00029-17. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00029-17>.
- 18- Gunaratne, G.S., Marchant, J.S. "The ins and outs of virus trafficking through acidic Ca²⁺ stores." (2022) *Cell Calcium*; 102:102528. doi: 10.1016/j.ceca.2022.102528. Epub 2022 Jan 6. PMID: 35033909; PMCID: PMC8860173.
- 19- Sørensen, D.M., Holen, H.W., Pedersen, J.T., Martens, H.J., Silvestro, D., Stanchev, L.D., Costa, S.R., Günther Pomorski, T., López-Marqués, R.L., Palmgren, M. "The P5A ATPase Spflp is stimulated by phosphatidylinositol 4-phosphate and influences cellular sterol homeostasis." (2019) *Mol Biol Cell.*; 30(9):1069-1084. doi: 10.1091/mbc.E18-06-0365.
- 20- McKenna MJ, Sim SI, Ordureau A, Wei L, Harper JW, Shao S, Park E. "The endoplasmic reticulum P5A-ATPase is a transmembrane helix dislocase." (2020) *Science*; 369(6511):eabc5809. doi: 10.1126/science.abc5809. PMID: 32973005; PMCID: PMC8053355.
- 21- Palmgren, M.G., Nissen, P. "P-ATPases." (2011) *Annu. Rev. Biophys.*; 40, 243e266.
- 22- Kwasnicka-Crawford DA, Carson AR, Roberts W, Summers AM, Rehnström K, Järvelä I, Scherer SW. Characterization of a novel cation transporter ATPase gene (ATP13A4) interrupted by 3q25-q29 inversion in an individual with language delay. *Genomics.* 2005 Aug;86(2):182-94. doi: 10.1016/j.ygeno.2005.04.002. PMID: 15925480.
- 23- Vallipuram, J., Grenville, J. and Crawford, D.A. (2010) *Cell. Mol. Neurobiol.*; 30, 233-246.
- 24- van Beek, N., Patsatsi, A., Gupta, Y., Möller, S., Freitag, M., Lemcke, S., Recke, A., Zillikens, D., Schmidt, E., Ibrahim, S. "A family with atypical Hailey Hailey disease--is there more to the underlying genetics than ATP2C1?" (2015) *PLoS One.*;10(4):e0121253. doi: 10.1371/journal.pone.0121253.
- 25- Rinaldi, D.E., Corradi, G.R., Cuesta, L.M., Adamo, H.P., de Tezanos Pinto F. "The Parkinson-associated human P5B-ATPase ATP13A2 protects against the iron-induced cytotoxicity." (2015) *Biochim. Biophys. Acta*; 1848(8):1646-1655. doi: 10.1016/j.bbamem.

- 26- Chen, X., Zhou, M., Zhang, S., Yin, J., Zhang, P., Xuan, X., Wang, P., Liu, Z., Zhou, B., Yang, M. "Cryo-EM structures and transport mechanism of human P5B type ATPase ATP13A2." (2021) *Cell Discov.*; 7, 106. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00334-6>.
- 27- Sim SI, von Bülow S, Hummer G, Park E. Structural basis of polyamine transport by human ATP13A2 (PARK9). *Mol Cell.* 2021 Nov 18;81(22):4635-4649.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.017. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34715013; PMCID: PMC8604775.
- 28- Tomita A, Daiho T, Kusakizako T, Yamashita K, Ogasawara S, Murata T, Nishizawa T, Nureki O. Cryo-EM reveals mechanistic insights into lipid-facilitated polyamine export by human ATP13A2. *Mol Cell.* 2021 Dec 2;81(23):4799-4809.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.11.001. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34798056; PMCID: PMC7612442.
- 29- Tillinghast J, Drury S, Bowser D, Benn A, Lee KPK. Structural mechanisms for gating and ion selectivity of the human polyamine transporter ATP13A2. *Mol Cell.* 2021 Nov 18;81(22):4650-4662.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2021.10.002. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34715014.
- 30- Li, P., Wang, K., Salustros, N., Grønberg, C., Gourdon, P. "Structure and transport mechanism of P5B-ATPases." (2021) *Nat Commun.*; 12, 3973. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24148-y>
- 31- Mu, J., Xue, C., Fu, L., Yu, Z., Nie, M., Wu, M., Chen, X., Liu, K., Bu, R., Huang, Y., Yang, B., Han, J., Jiang, Q., Chan, K., Zhou, R., Li, H., Huang, A., Wang, Y., Liu, Z. "Conformational cycle of human polyamine transporter ATP13A2." (2023) *Nat Commun.*, 14, 1978. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37741-0>.
- 32- Huotari, J., Helenius, A. "Endosome maturation." (2011) *EMBO J.*; 30, 3481e3500.
- 33- Kong, S.M., Chan, B.K., Park, J.S., Hill, K.J., Aitken, J.B., Cottle, L., Farghaian, H., Cole, A.R., Lay, P.A., Sue, C.M., Cooper, A.A. "Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes α -Synuclein externalization via exosomes." (2014) *Hum. Mol. Genet.*; 23(11):2816-33. doi: 10.1093/hmg/ddu099.
- 34- Usenovic, M., Tresse, E., Mazzulli, J.R., Taylor, J.P., Krainc, D. "Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α -synuclein accumulation, and neurotoxicity." (2012) *J. Neurosci.*; 32 (12), 4240e4246.
- 35- Demirsoy, S., Martin, S., Motamedi, S., van Veen, S., Holemans, T., Van den Haute, C., Jordanova, A., Baekelandt, V., Vangheluwe, P., Agostinis, P. "ATP13A2/PARK9 regulates endo-/lysosomal cargo sorting and proteostasis through a novel PI(3, 5)P2-mediated scaffolding function" (2017) *Hum. Mol. Genet.*; 26, 1656–1669, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx070>.
- 36- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R.G., Gruenberg, J. "Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels." (2008) *J. Biol. Chem.*; 283(41):27871-80. doi: 10.1074/jbc.M801463200.
- 37- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F., Gruenberg, J. "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization." (2004) *Science*; 303(5657):531-4.
- 38- Gallala, H.D., Sandhoff, K. "Biological function of the cellular lipid BMP-BMP as a key activator for cholesterol sorting and membrane digestion." (2011) *Neurochem. Res.*; 36, 1594-1600. doi: 10.1007/s11064-010-0337-6.
- 39- Bissig, C., Gruenberg, J. "Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis." (2013) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*; 5, a016816, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016816>.

- 40- Kett, L.R., Stiller, B., Bernath, M.M., Tasset, I., Blesa, J., Jackson-Lewis, V., Chan, R.B., Zhou, B., Di Paolo, G., Przedborski, S., Cuervo, A.M., Dauer, W.T. “a-Synuclein-independent histopathological and motor deficits in mice lacking the endolysosomal Parkinsonism protein Atp13a2.” (2015) *J. Neurosci.*; 35 (14), 5724e5742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0632-14>.
- 41- Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Front Microbiol.* 2021 Feb 4;12:631274. doi: 10.3389/fmicb.2021.631274. PMID: 33613502; PMCID: PMC7890030.
- 42- Cesar-Silva D, Pereira-Dutra FS, Moraes Giannini AL, Jacques G. de Almeida C. The Endolysosomal System: The Acid Test for SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(9):4576. <https://doi.org/10.3390/ijms23094576>.
- 43- Glitscher M., Hildt, E. “Endosomal Cholesterol in Viral Infections – A Common Denominator?” *Frontiers in Physiology*, 2021, Vol. 12. <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2021.750544>.
- 44- Vázquez-Calvo, Á., Saiz, J.-C., McCullough, K. C., Sobrino, F., & Martín-Acebes, M. A. (2012). Acid-dependent viral entry. *Virus Research*, 167(2), 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.024>.
- 45- Mazzon M, Mercer J. Lipid interactions during virus entry and infection. *Cell Microbiol.* 2014 Oct;16(10):1493-502. doi: 10.1111/cmi.12340. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25131438; PMCID: PMC4265854.
- 46- Carty M, Bowie AG. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clin Exp Immunol.* 2010 Sep;161(3):397-406. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04196.x. PMID: 20560984; PMCID: PMC2962956.
- 47- Kühnl A, Musiol A, Heitzig N, Johnson DE, Ehrhardt C, Grewal T, Gerke V, Ludwig S, Rescher U. Late Endosomal/Lysosomal Cholesterol Accumulation Is a Host Cell-Protective Mechanism Inhibiting Endosomal Escape of Influenza A Virus. *mBio.* 2018 Jul 24;9(4):e01345-18. doi: 10.1128/mBio.01345-18. PMID: 30042202; PMCID: PMC6058292.
- 48- Celano P, Baylin SB, Casero RA. Polyamines Differentially Modulate the Transcription of Growth-associated Genes in Human Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem.* 1989; 264: 8922–8927. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81881-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81881-6) PMID: 2498320
- 49- Frugier M, Florentz C, Hosseini MW, Lehn JM, Giege´ R. Synthetic polyamines stimulate in vitro transcription by T7 ARN polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 2784–2790. <https://doi.org/10.1093/nar/22.14.2784> PMID: 8052534.
- 50- Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Makinoshima H, et al. A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon *. *J Biol Chem.* 2004; 279: 46008–46013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404393200> PMID: 15326188
- 51- Sakamoto A, Terui Y, Uemura T, Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines regulate gene expression by stimulating translation of histone acetyltransferase mARNs. *J Biol Chem.* 2020; 295: 8736–8745. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013833> PMID: 32376690
- 52- Dever TE, Ivanov IP. Roles of polyamines in translation. *J Biol Chem.* 2018; 293: 18719–18729. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338> PMID: 30323064

- 53- Park MH, Wolff EC. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J Biol Chem.* 2018; 293: 18710–18718. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003341> PMID: 30257869
- 54- Mandal S, Mandal A, Johansson HE, Orjalo AV, Park MH. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 2169–2174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219002110> PMID: 23345430
- 55- Pignatti C, Tantini B, Stefanelli C, Flamigni F. Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. *Amino Acids.* 2004; 27: 359–365. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0115-3> PMID: 154527029.
- 56- Ray RM, Bavaria M, Johnson LR. Interaction of polyamines and mTOR signaling in the synthesis of antizyme (AZ). *Cell Signal.* 2015; 27: 1850–1859. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.06.002> PMID:26093026
- 57- Oredsson SM. Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:366–370. <https://doi.org/10.1042/bst0310366> PMID: 12653640
- 58- Laitinen J, Stenius K, Eloranta TO, Ho" Itta" E. Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem.* 1998; 68: 200–212. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(19980201\)68:2<200::aid-jcb7>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(19980201)68:2<200::aid-jcb7>3.0.co;2-z) PMID: 9443076
- 59- Igarashi K, Kashiwagi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 107: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.012> PMID: 30578954
- 60- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant.*1997; 100: 664–674. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03073.x>
- 61- Perez-Leal O, Merali S. Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids.*2012; 42: 611–617. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1036-6> PMID: 21811825
- 62- Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, Pegg AE. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem.* 1992; 267: 150–158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48472-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48472-4) PMID: 1730582
- 63- Pegg AE, McGovern KA, Wiest L. Decarboxylation of α -difluoromethylornithine by ornithine decarboxylase. *Biochem J.* 1987; 241: 305–307. <https://doi.org/10.1042/bj2410305> PMID: 3105526
- 64- Nie L, Feng W, Diaz R, Gratton MA, Doyle KJ, Yamoah EN. Functional Consequences of Polyamine Synthesis Inhibition by l- α -Difluoromethylornithine (DFMO): CELLULAR MECHANISMS FOR DFMOMEDIATED OTOTOXICITY *. *J Biol Chem.* 2005; 280: 15097–15102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409856200> PMID: 15718247
- 65- Seiler, N., Delcros, J. G. and Moulinox, J. "Polyamine transport in mammalian cells" (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 28, 843-861.
- 66- Phanstiel, O., Kaur, N., and Delcros, J.-G. "Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter" (2007) *Amino Acids*; 33, 305-313.
- 67- Hofer SJ, Simon AK, Bergmann M, Eisenberg T, Kroemer G, Madeo F. Mechanisms of spermidine-induced autophagy and geroprotection. *Nat Aging.* 2022 Dec;2(12):1112-1129. doi: 10.1038/s43587-022-00322-9. Epub 2022 Dec 22. PMID: 37118547.

- 68- Park MH, Wolff EC. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J Biol Chem.* 2018 Nov 30;293(48):18710-18718. doi: 10.1074/jbc.TM118.003341. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30257869; PMCID: PMC6290153.
- 69- Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampinato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., Ballabio, A. "Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance." (2011) *Dev. Cell.*; 21, 421-430. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.016.
- 70- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A. "Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways." (2011) *Hum. Mol. Genet.*; 20, 3852-3866. doi: 10.1093/hmg/ddr306.
- 71- Xu Q., Guo H., Zhang X., Tang B., Cai F., Zhou W., Song W. "Hypoxia regulation of ATP13A2 (PARK9) gene transcription." (2016) *J. Neurochem.*; 122, 251-259. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07676.x.
- 72- Bento, C.F., Ashkenazi, A., Jimenez-Sanchez, M., Rubinsztein, D.C. "The Parkinson's disease-associated genes ATP13A2 and SYT11 regulate autophagy via a common pathway." (2016) *Nat. Commun.*; 7, 11803. doi: 10.1038/ncomms11803.
- 73- Si J, Van den Haute C, Lobbestael E, Martin S, van Veen S, Vangheluwe P, Baekelandt V. ATP13A2 Regulates Cellular α -Synuclein Multimerization, Membrane Association, and Externalization. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(5):2689. <https://doi.org/10.3390/ijms22052689>
- 74- Sun S, Rao VB, Rossmann MG. 2010. Genome packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol* 20:114–120. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.006>.
- 75- Raina A, Tuomi K, Mäntyjärvi R. 1981. Roles of polyamines in the replication of animal viruses. *Med Biol* 59:428–432.
- 76- Tuomi K, Raina A, Mäntyjärvi R. 1982. Synthesis of Semliki-forest virus in polyamine-depleted baby-hamster kidney cells. *Biochem J* 206:113–119. <https://doi.org/10.1042/bj2060113>.
- 77- Tuomi K, Mäntyjärvi R, Raina A. 1980. Inhibition of Semliki Forest and herpes simplex virus production in alpha-difluoromethylornithinetreated cells: reversal by polyamines. *FEBS Lett* 121:292–294. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80365-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80365-6).
- 78- Mounce BC, Poirier EZ, Passoni G, Simon-Loriere E, Cesaro T, Prot M, Stapleford KA, Moratorio G, Sakuntabhai A, Levraud J-P, Vignuzzi M. 2016. Interferon-induced spermidine-spermine acetyltransferase and polyamine depletion restrict Zika and Chikungunya viruses. *Cell Host Microbe* 20:167–177. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.011>. (a)
- 79- Mounce BC, Cesaro T, Moratorio G, Hooikaas PJ, Yakovleva A, Werneke SW, Smith EC, Poirier EZ, Simon-Loriere E, Prot M, Tamiotti C, Vitry S, Volle R, Khou C, Frenkiel M-P, Sakuntabhai A, Delpeyroux F, Pardigon N, Flamand M, Barba-Spaeth G, Lafon M, Denison MR, Albert ML, Vignuzzi M. 2016. Inhibition of polyamine biosynthesis is a broad-spectrum strategy against RNA viruses. *J Virol* 90:9683–9692. <https://doi.org/10.1128/JVI.01347-16>. (b)
- 80- Olsen ME, Filone CM, Rozelle D, Mire CE, Agans KN, Hensley L, Connor JH. 2016. Polyamines and hypusination are required for Ebolavirus gene expression and replication. *mBio* 7:e00882-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00882-16>.

- 81- Firpo MR, Mastrodomenico V, Hawkins GM, Prot M, Levillayer L, Gallagher T, et al. Targeting Polyamines Inhibits Coronavirus Infection by Reducing Cellular Attachment and Entry. (2021) *ACS Infect Dis.*; 7: 1423–1432. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00491> PMID: 32966040
- 82- Richelsen B, Pedersen SB, Hougaard DM. Characterization of antilipolytic action of polyamines in isolated rat adipocytes. *Biochem J.* 1989; 261: 661–665. <https://doi.org/10.1042/bj2610661> PMID:2476118
- 83- Bellé NAV, Dalmolin GD, Fonini G, Rubin MA, Rocha JBT. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res.* 2004; 1008: 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.036> PMID: 15145762
- 84- Kitada M, Igarashi K, Hirose S, Kitagawa H. Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979; 87: 388–394. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(79\)91808-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(79)91808-4) PMID: 36078
- 85- Firpo MR, LoMascolo NJ, Petit MJ, Shah PS, Mounce BC. Polyamines and eIF5A hypusination facilitate SREBP2 synthesis and cholesterol production leading to enhanced enterovirus attachment and infection. *PLOS Pathog.* 2023; 19: e1011317. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011317> PMID:37071661
- 86- Cruz-Pulido YE, LoMascolo NJ, May D, Hatahet J, Thomas CE, Chu AKW, Stacey SP, Villanueva Guzman MDM, Aubert G, Mounce BC. Polyamines mediate cellular energetics and lipid metabolism through mitochondrial respiration to facilitate virus replication. *PLoS Pathog.* 2024 Nov 18;20(11):e1012711. doi: 10.1371/journal.ppat.1012711. PMID: 39556649; PMCID: PMC11611256.
- 87- Filomatori CV, Bardossy ES, Merwaiss F, Suzuki Y, Henrion A, et al. (2019) RNA recombination at Chikungunya virus 3'UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability. *PLOS Pathogens* 15(4): e1007706. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007706>
- 88- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., ... & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570–574. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>
- 89- Kielian M, Chanel-Vos C, Liao M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 2010 Mar 26;2(4):796-825. doi: 10.3390/v2040796. PMID: 21546978; PMCID: PMC3086016.
- 90- Wichit S, Hamel R, Bernard E, Talignani L, Diop F, Ferraris P, Liegeois F, Ekchariyawat P, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Thomas F, Merits A, Choumet V, Roques P, Yssel H, Briant L, Missé D. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Sci Rep.* 2017 Jun 9;7(1):3145. doi: 10.1038/s41598-017-03316-5. PMID: 28600536; PMCID: PMC5466638.
- 91- Bardossy, E.S., Volpe, S., Suzuki, Y., Merwaiss, F., Faraj, S., Montes, M., Saleh, M.C., Alvarez, D.E., Filomatori, C.V. “Molecular basis of RNA recombination in the 3'UTR of chikungunya virus genome.” (2024) *Nucleic Acids Research*, Volume 52, Issue 16, Pages 9727–9744, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae650>
- 92- Landegren, U. “Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens.” (1984) *J. Immunol. Methods*; 67, 379–388.

Agustina

AGUSTINA LUJAN SUÁREZ

DNI = 42994785