



**Universidad de
Castilla-La Mancha**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



Instituto de
Biomedicina

“Papel conservado de AKT en la replicación de flavivirus emergentes en vertebrados y vectores. Reposicionamiento de fármacos”

WORKSHOP INVESTIGACIÓN FACULTAD DE FARMACIA 2024

"La investigación nuestro mejor medicamento"

Salon de Grados, 25 de Noviembre de 2024

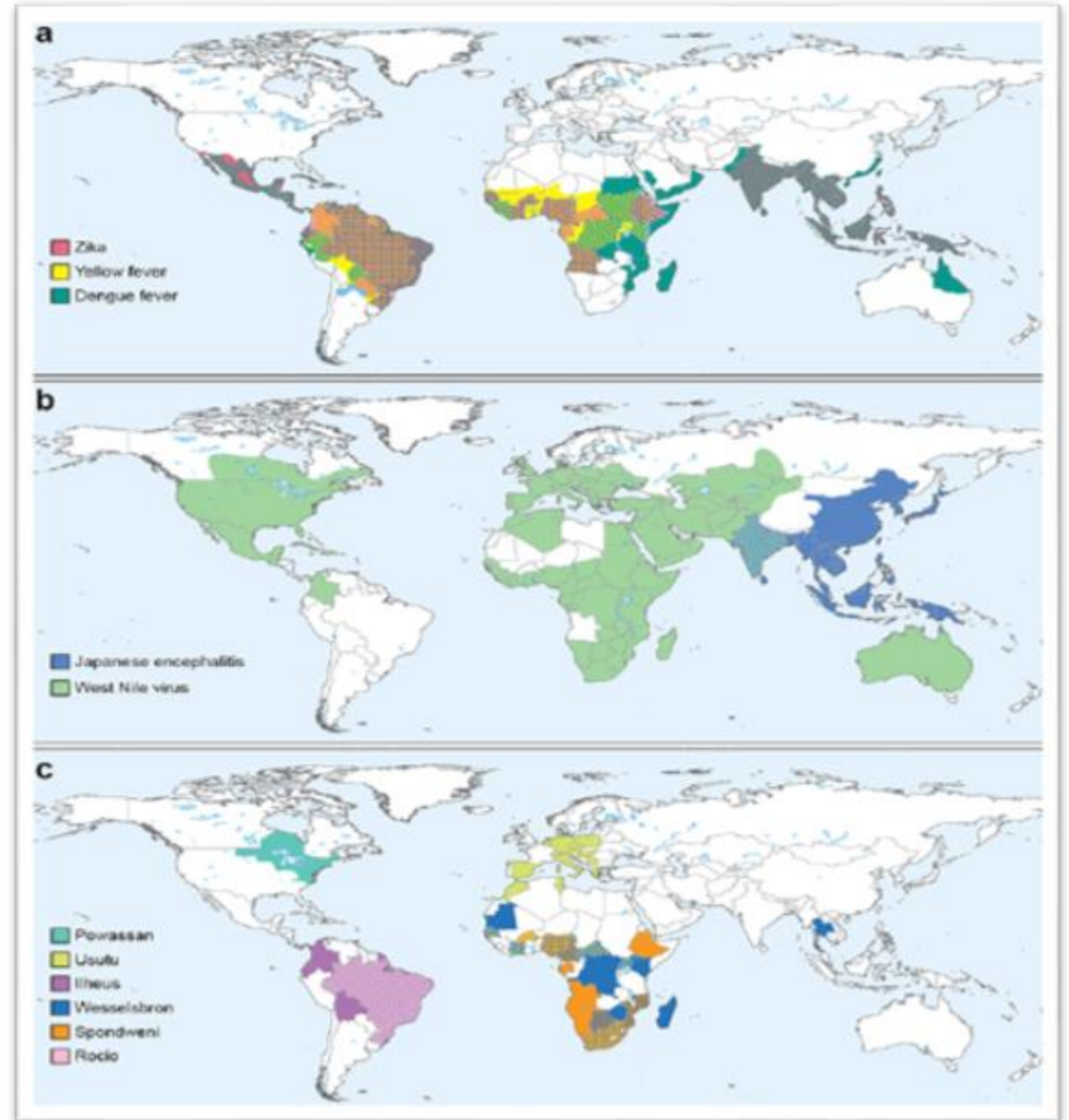
Blanca Palmero Casanova

Directores: Dr. Antonio Mas López

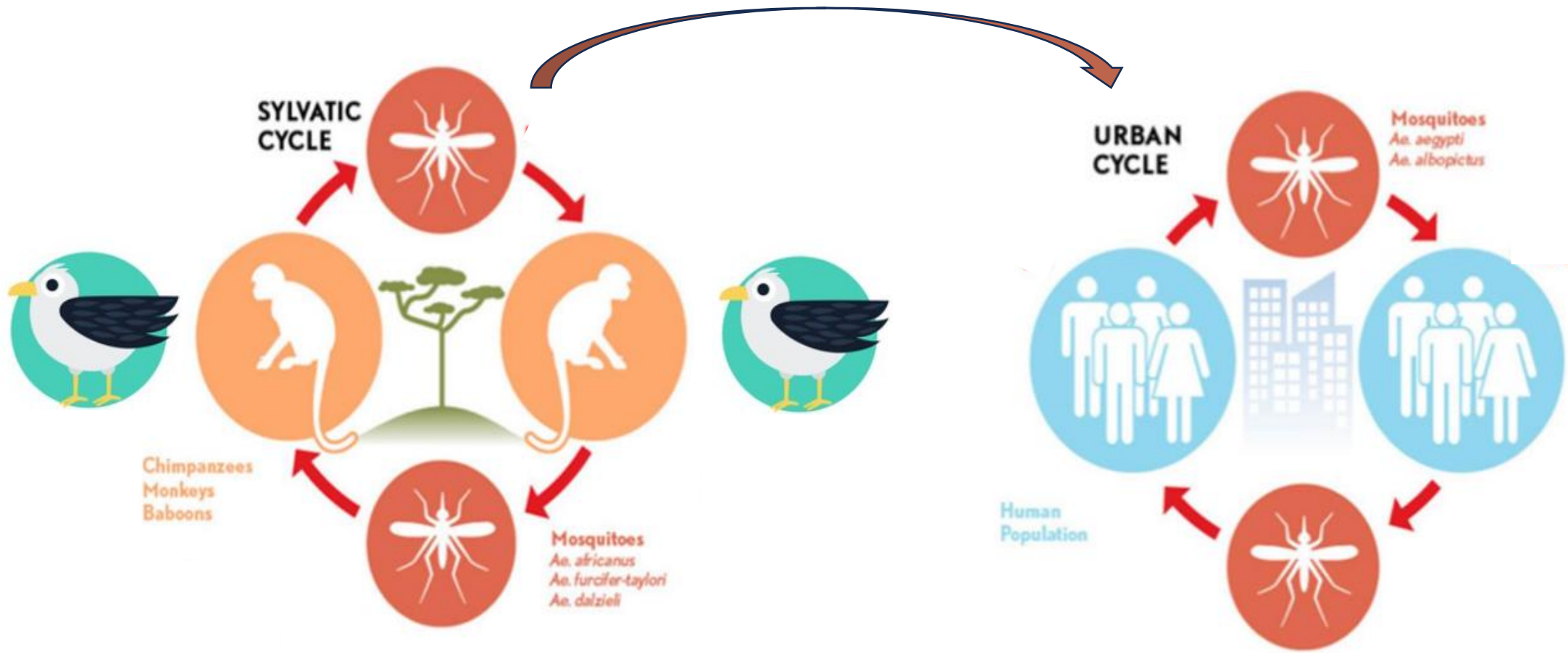
Dra. María del Rosario Sabariegos Jareño

FAMILIA FLAVIVIRIDAE

- ▶ *Hepacivirus*: Hepatitis C..
- ▶ *Pegivirus*: Pegivirus A
- ▶ *Pestivirus*
- ▶ *Orthoflavivirus*: ZIKA, DENGUE, USUTU...

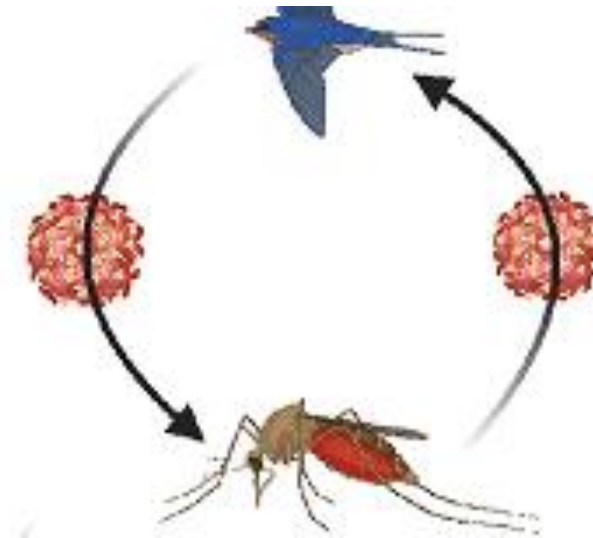


CICLO DE TRANSMISIÓN DE FLAVIVIRUS



VIRUS USUTU

- ▶ Transmitido principalmente por mosquito *Aedes albopictus* (mosquito tigre).



VIRUS USUTU

- ▶ Afecta principalmente a pájaros (mortal).



VIRUS USUTU

► Casos de infección humana con afectación neurológica.

Síntomas



Fiebre



Erupción en la piel



Dolor de cabeza



Afectación neurológica

→ **Meningoencefalitis**

→ **Encefalitis**

→ **Meningitis**

VIRUS ZIKA

- ▶ Transmitido principalmente por mosquito *Aedes aegypti*.



VIRUS ZIKA

► En embarazadas causa microcefalia en el feto y abortos prematuros.

Síntomas



Fiebre



Dolor de cabeza



Dolor muscular



Erupción en la piel

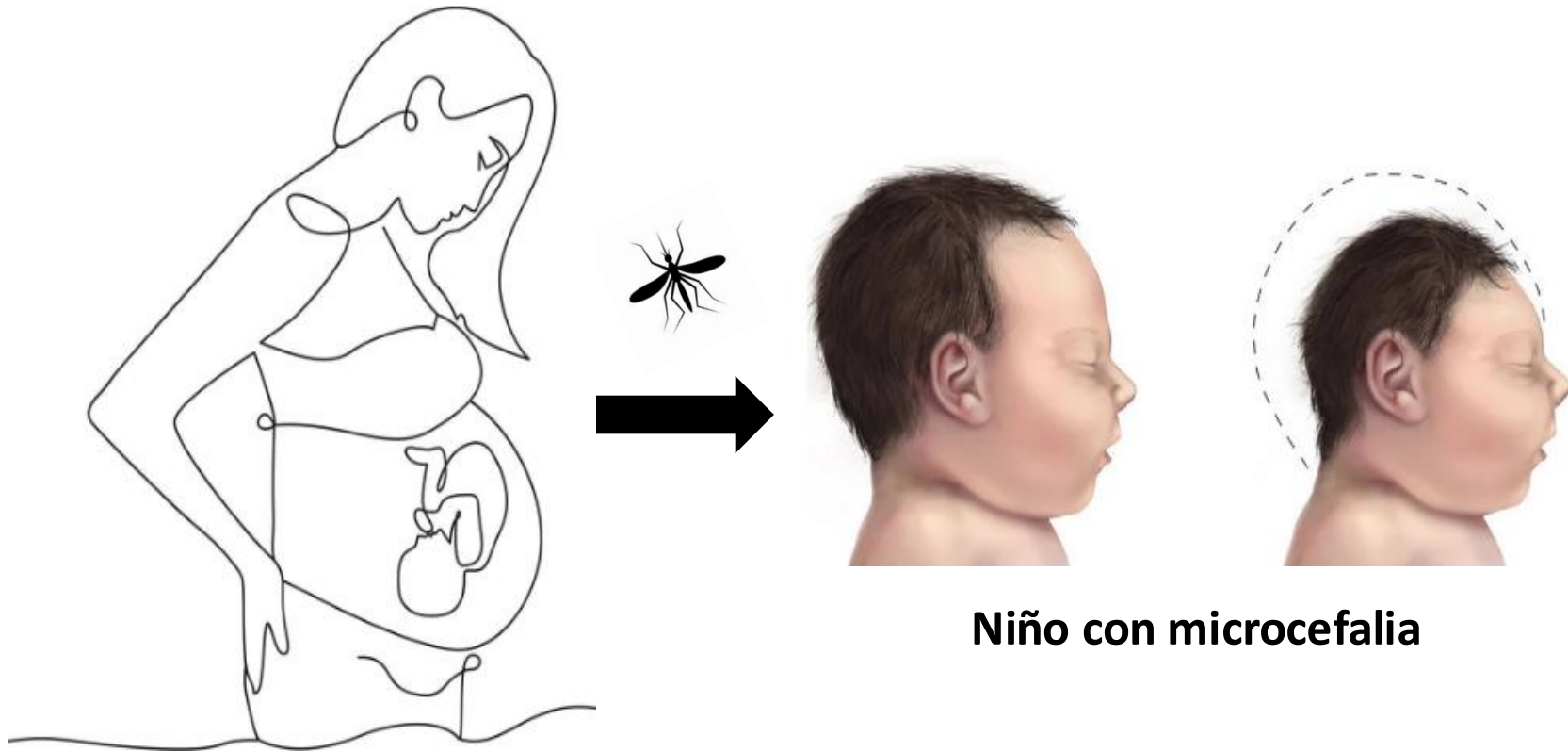


Ojos rojos

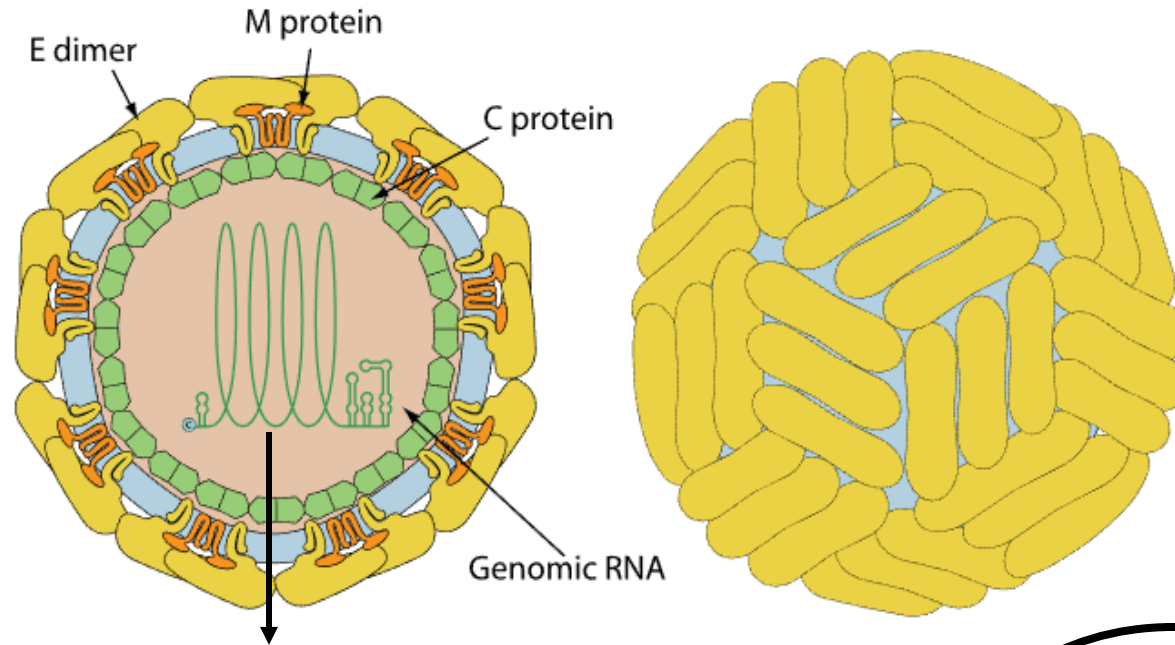


Síndrome de Guillian-Barré

VIRUS ZIKA



ESTRUCTURA DEL GENOMA DE FLAVIVIRUS

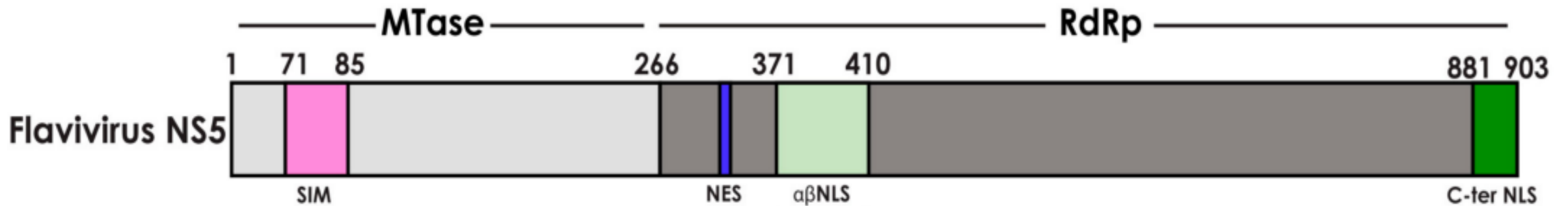


Proteínas estructurales

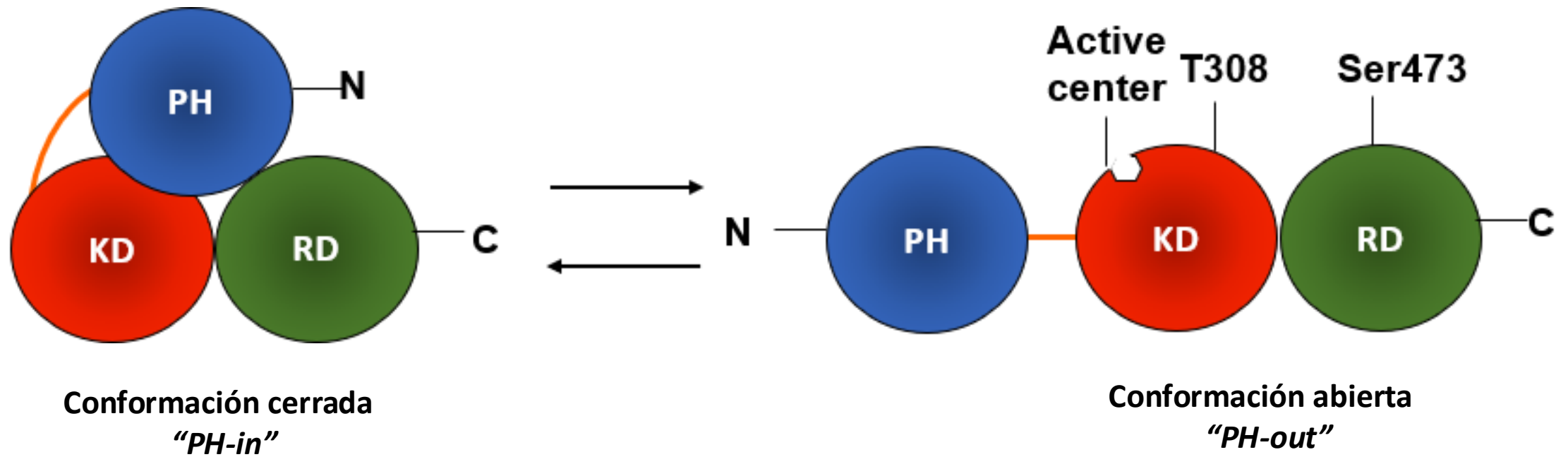
Proteínas no estructurales

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA NS5

- Implicada en la replicación viral
- Modula la respuesta inmune interaccionando con diferentes proteínas del hospedador (STAT1, STAT2, **AKT**...)

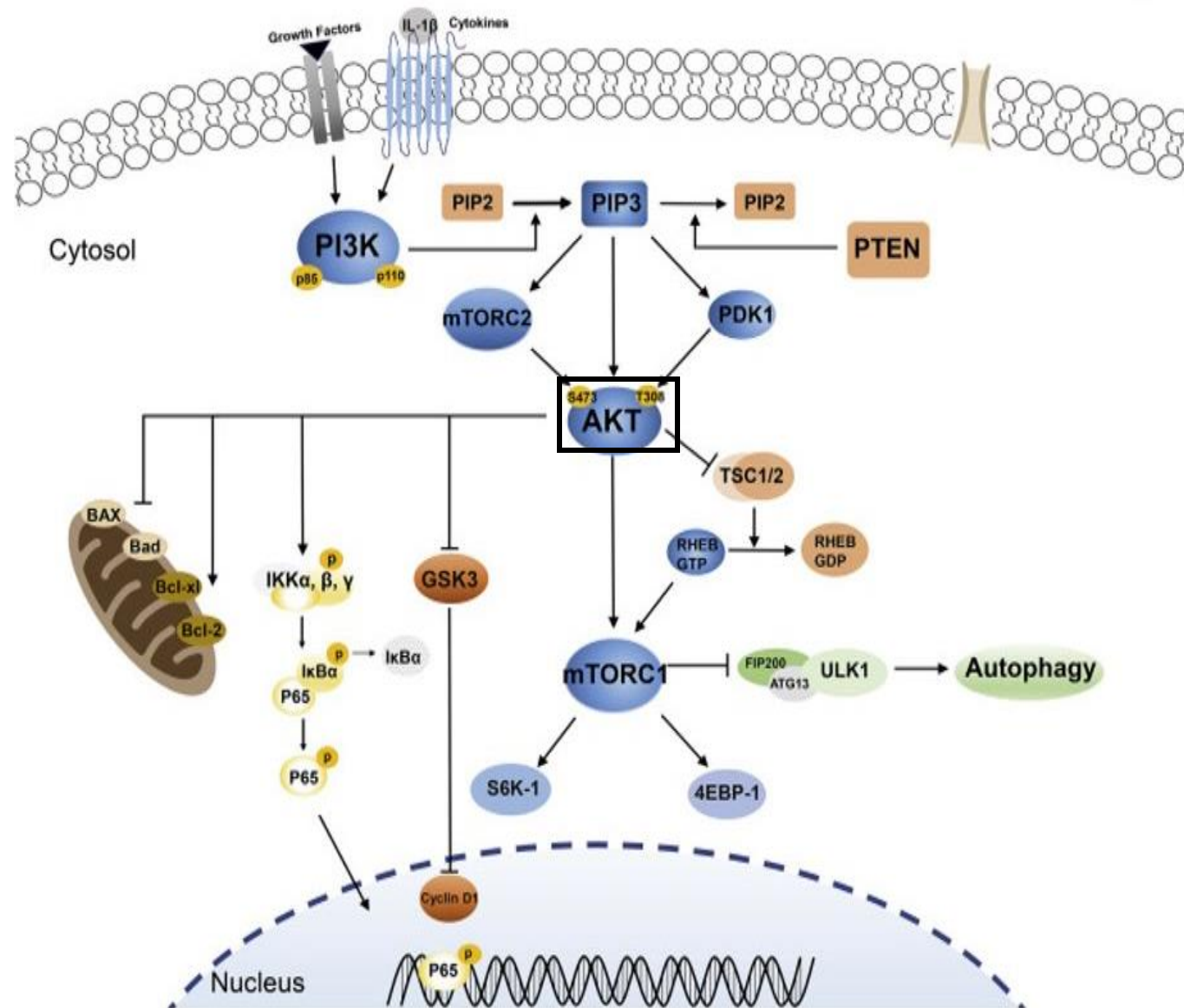


ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA AKT



- PH: dominio de unión a Pleckstrina
- KD: dominio catalítico
- RD: dominio regulador

VÍA PI3K/AKT/mTOR



OBJETIVOS

▶ **OBJETIVO 1:** Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y la proteína AKT interaccionan en diferentes modelos celulares durante el proceso de infección

▶ **OBJETIVO 2:** Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y AKT co-localizan durante la infección viral en diferentes líneas células.

▶ **OBJETIVO 3:** Estudiar si hay cambios en la localización celular de AKT durante la infección viral.

▶ **OBJETIVO 4:** Estudiar el efecto de la inhibición química de AKT en diferentes modelos celulares.

▶ **OBJETIVO 5:** Comparar las secuencias de AKT humano y mosquito y el acoplamiento de los inhibidores a ambas proteínas.

CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE NS5 DE ZIKA Y AKT EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES



Vero



A549

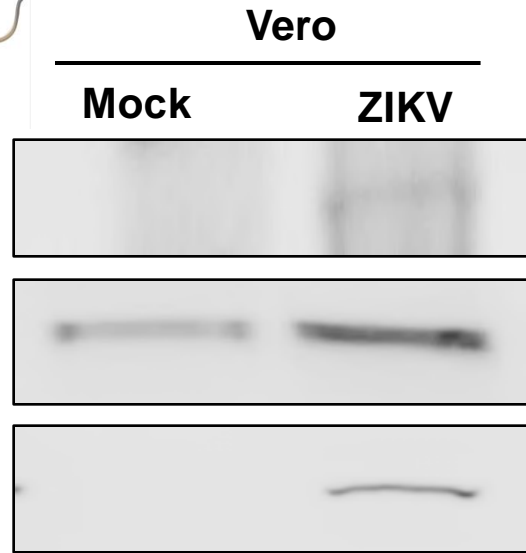


LN-229



Aag2-AF5

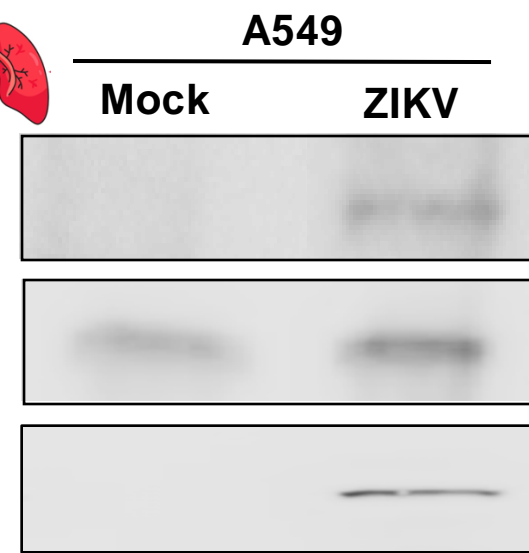
CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE NS5 DE ZIKA Y AKT EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES



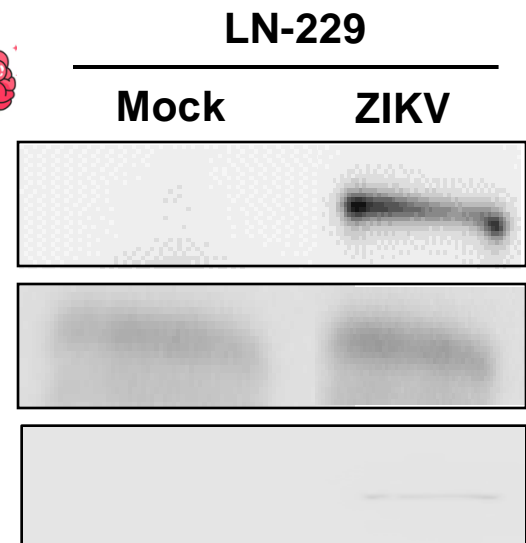
* **CoIP**
α-NS5 IB

α-AKT IB

Input
α-NS5 IB



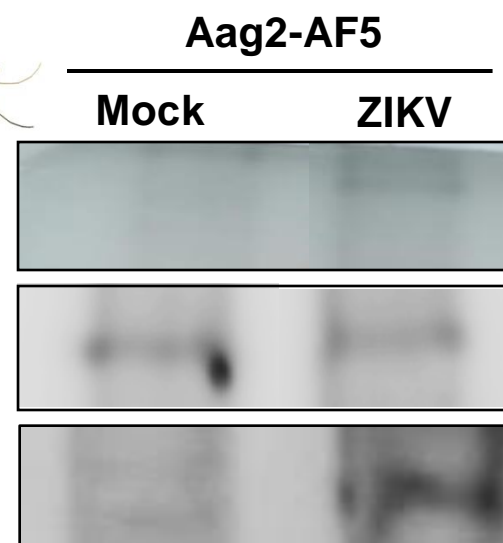
*



* **CoIP**
α-NS5 IB

α-AKT IB

Input
α-NS5 IB

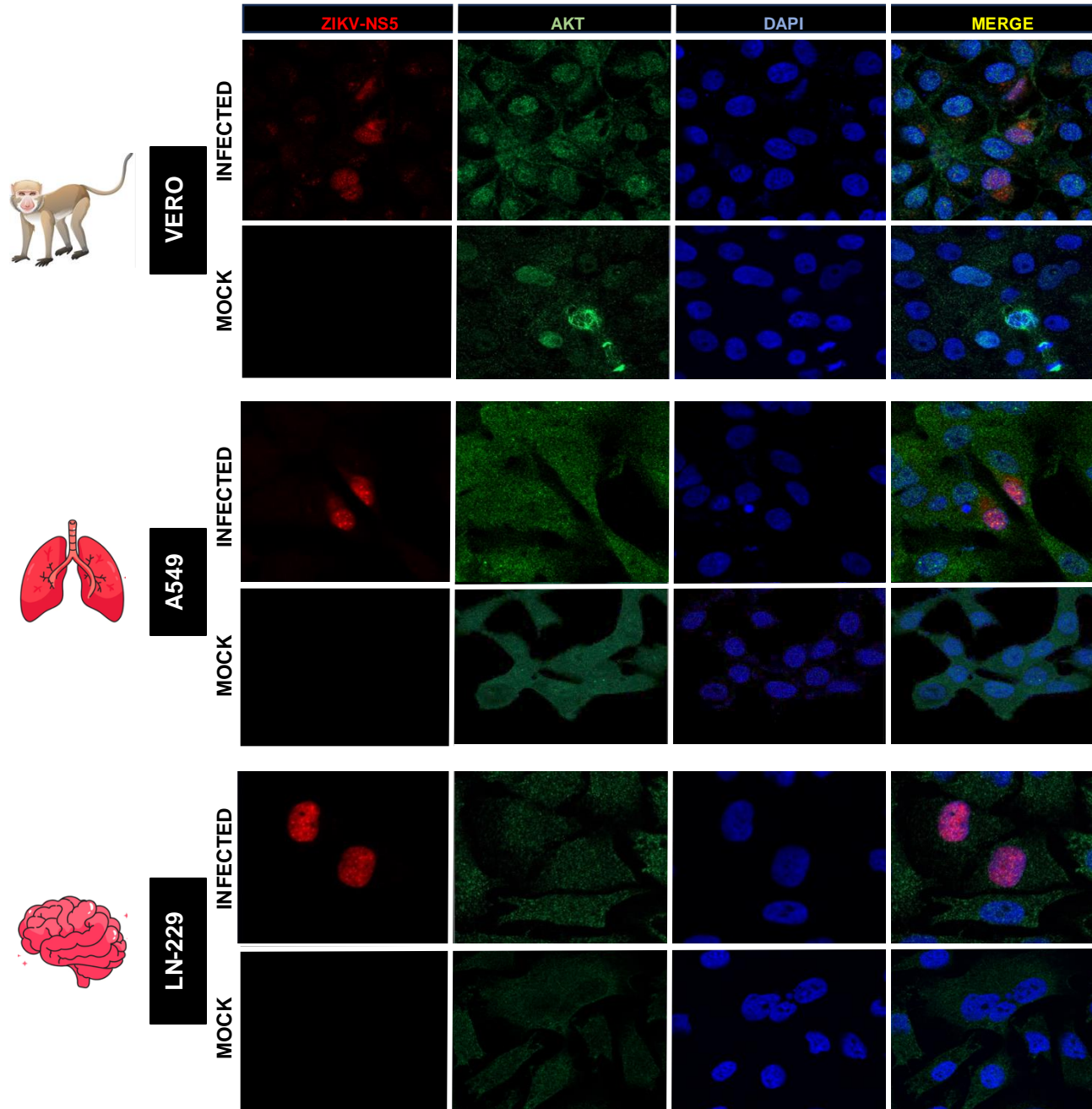


*

OBJETIVOS

- ▶ OBJETIVO 1: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y la proteína AKT interaccionan en diferentes modelos celulares durante el proceso de infección
- ▶ OBJETIVO 2: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y AKT co-localizan durante la infección viral en diferentes líneas células.
- ▶ OBJETIVO 3: Estudiar si hay cambios en la localización celular de AKT durante la infección viral.
- ▶ OBJETIVO 4: Estudiar el efecto de la inhibición química de AKT en diferentes modelos celulares.
- ▶ OBJETIVO 5: Comparar las secuencias de AKT humano y mosquito y el acoplamiento de los inhibidores a ambas proteínas.

CO-LOCALIZACIÓN DE NS5 DE ZIKA Y AKT



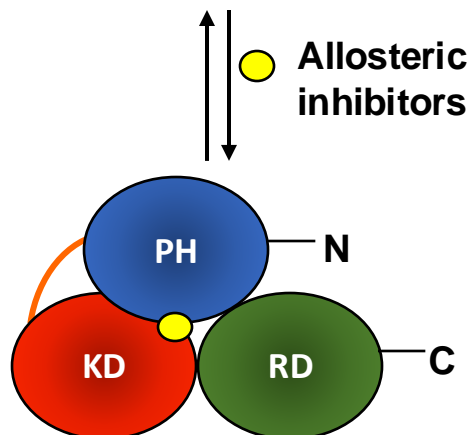
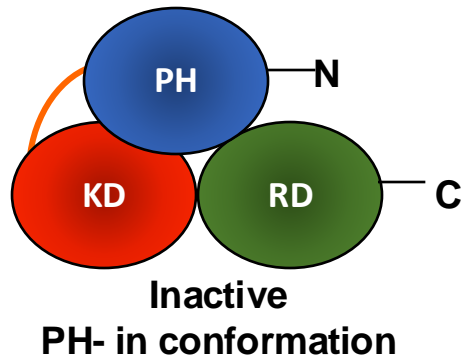
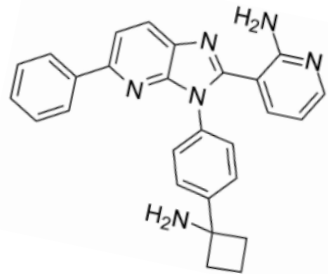
OBJETIVOS

- ▶ OBJETIVO 1: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y la proteína AKT interaccionan en diferentes modelos celulares durante el proceso de infección
- ▶ OBJETIVO 2: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y AKT co-localizan durante la infección viral en diferentes líneas células.
- ▶ OBJETIVO 3: Estudiar si hay cambios en la localización celular de AKT durante la infección viral.
- ▶ **OBJETIVO 4: Estudiar el efecto de la inhibición química de AKT en diferentes modelos celulares.**
- ▶ OBJETIVO 5: Comparar las secuencias de AKT humano y mosquito y el acoplamiento de los inhibidores a ambas proteínas.

INHIBIDORES DE AKT EN LA REPLICACIÓN DE FLAVIVIRUS

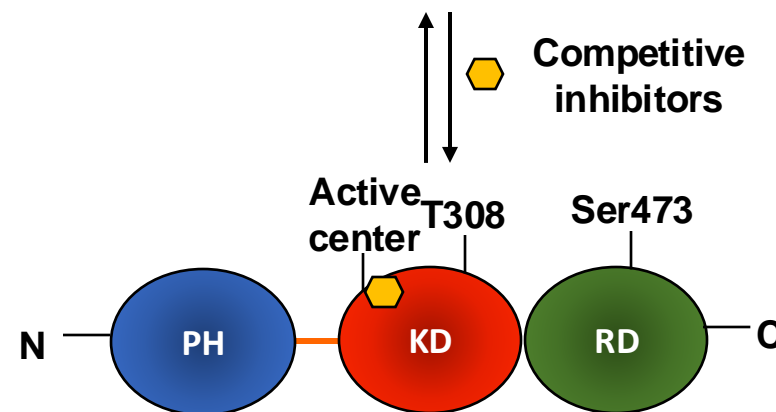
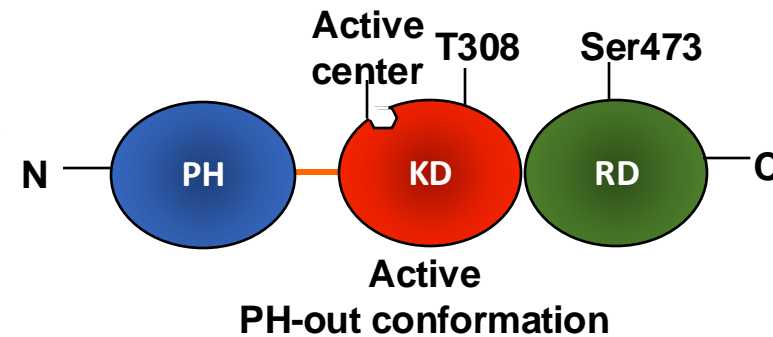
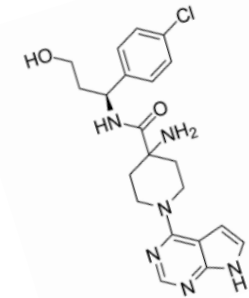
MIRANSERTIB (ARQ-092)

- ▶ Inhibidor alostérico de AKT
- ▶ Efectivo contra otros patógenos como *Leishmania* (Nandal *et al.*, 2018)
- ▶ ¿Efectivo contra virus?



CAPIVASERTIB (AZD5363)

- ▶ Inhibidor competitivo AKT
- ▶ Efectivo contra SARS-CoV-2 (Sun *et al.*, 2024)



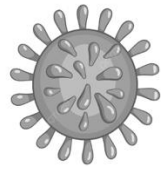
PH: dominio de unión a Pleckstrina
KD: dominio catalítico
RD: dominio regulador

EFFECTO DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION VIRAL

Infección y tratamiento



Células



1 h absorción
de virus



Células infectadas



Eliminar medio. Lavar.
Añadir tratamientos.



Células infectadas y tratadas

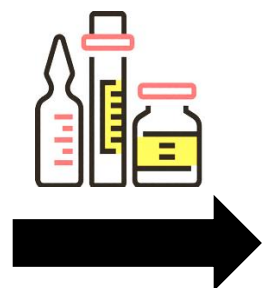
Recoger sobrenadante
a diferentes tiempos y
titular.

EFECTO DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION VIRAL

Pre-tratamiento



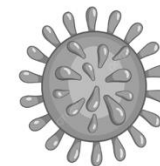
Células



Pretratamiento
o 5/24 h antes
de la infección



Células tratadas

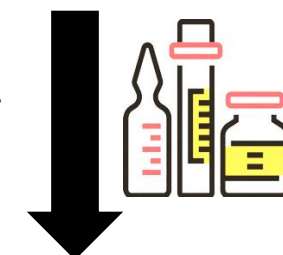


Eliminar medio. Lavar.
Añadir virus. 1 h
absorción.



Células infectadas

Eliminar virus. Lavar. Añadir
tratamientos de nuevo.



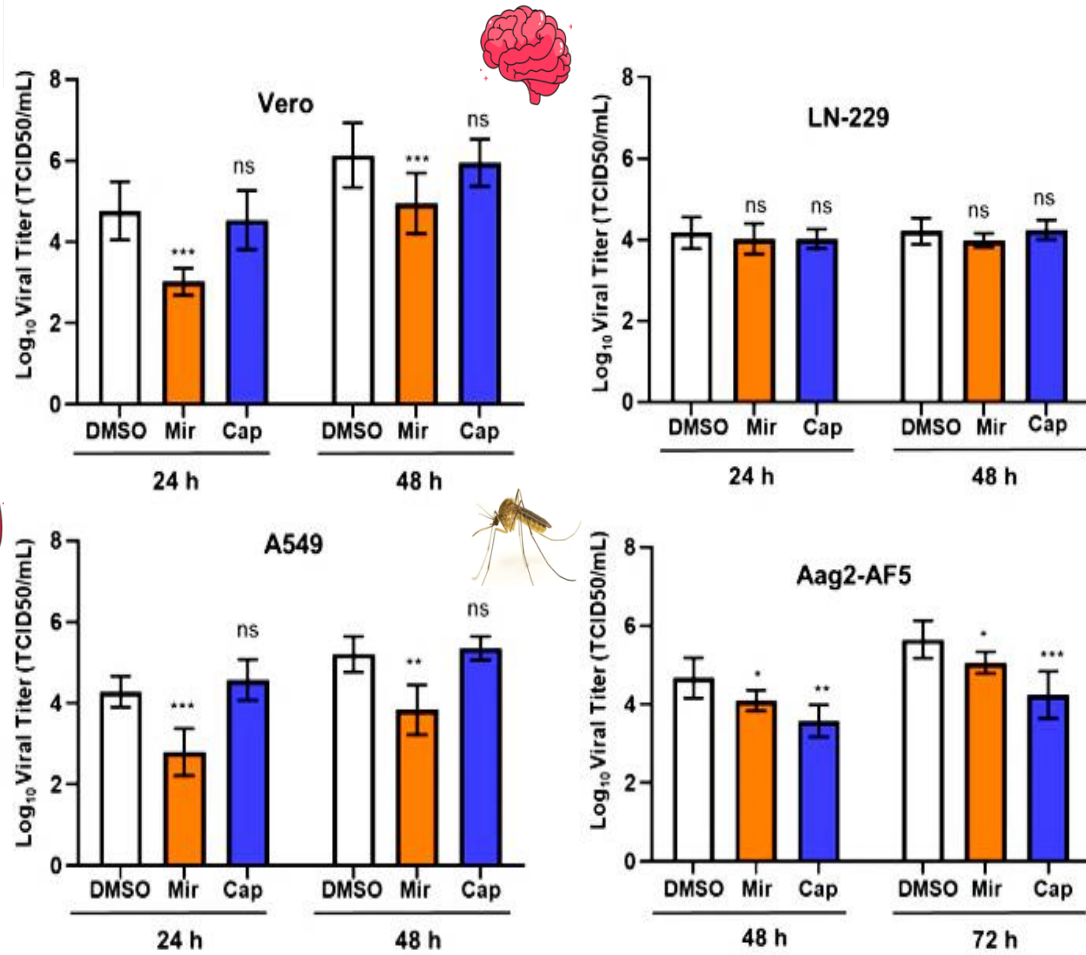
Recoger sobrenadante
a diferentes tiempos y
titular.



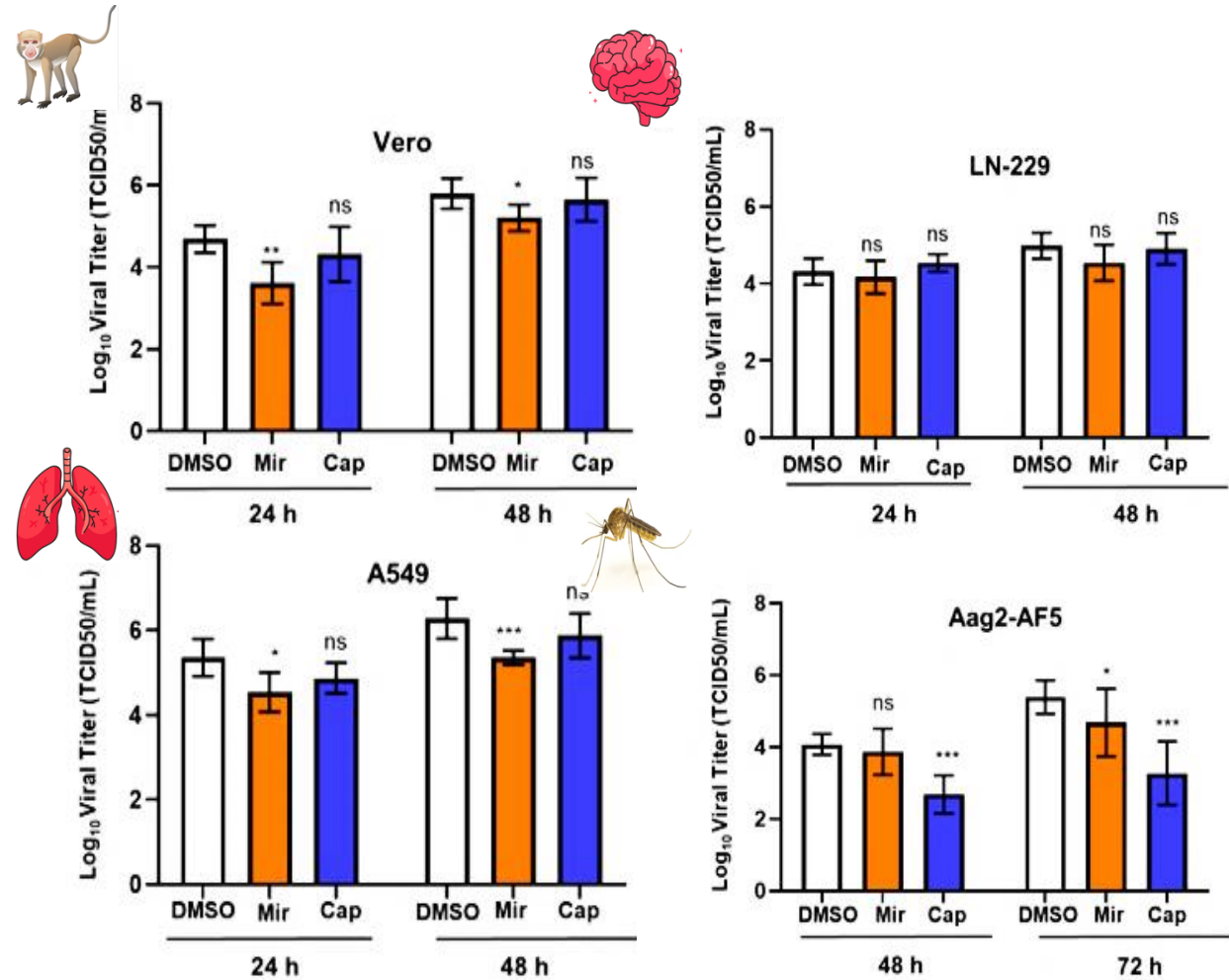
Células infectadas y tratadas

EFECTO DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION DE ZIKA

Infección y tratamiento



Pretratamiento



IC₅₀ DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION DE ZIKA

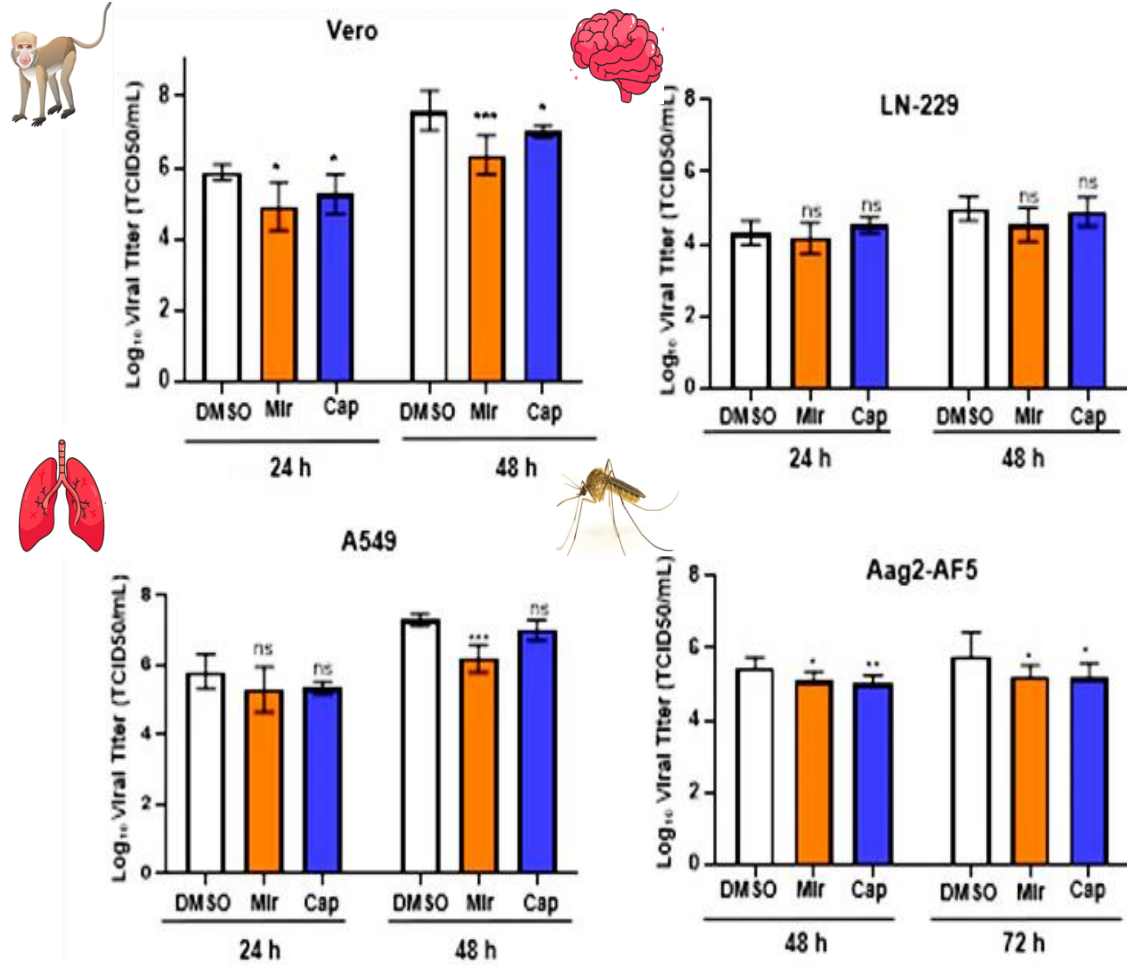
| Miransertib IC₅₀ (SI) | | |
|---|------------------|-----------------|
| | 24 h | 48 h |
| Vero | 0.6 ± 0.3 (26.5) | 1.5 ± 0.5 (7.4) |
| A549 | 0.9 ± 0.1 (16.9) | 2 ± 0.8 (6.2) |

| Capivasertib IC₅₀ (SI) | | |
|--|----------------|------------------|
| | 48 h | 72 h |
| Aag2-AF5 | 13.6 ± 1 (5.8) | 14.2 ± 2.6 (4.3) |

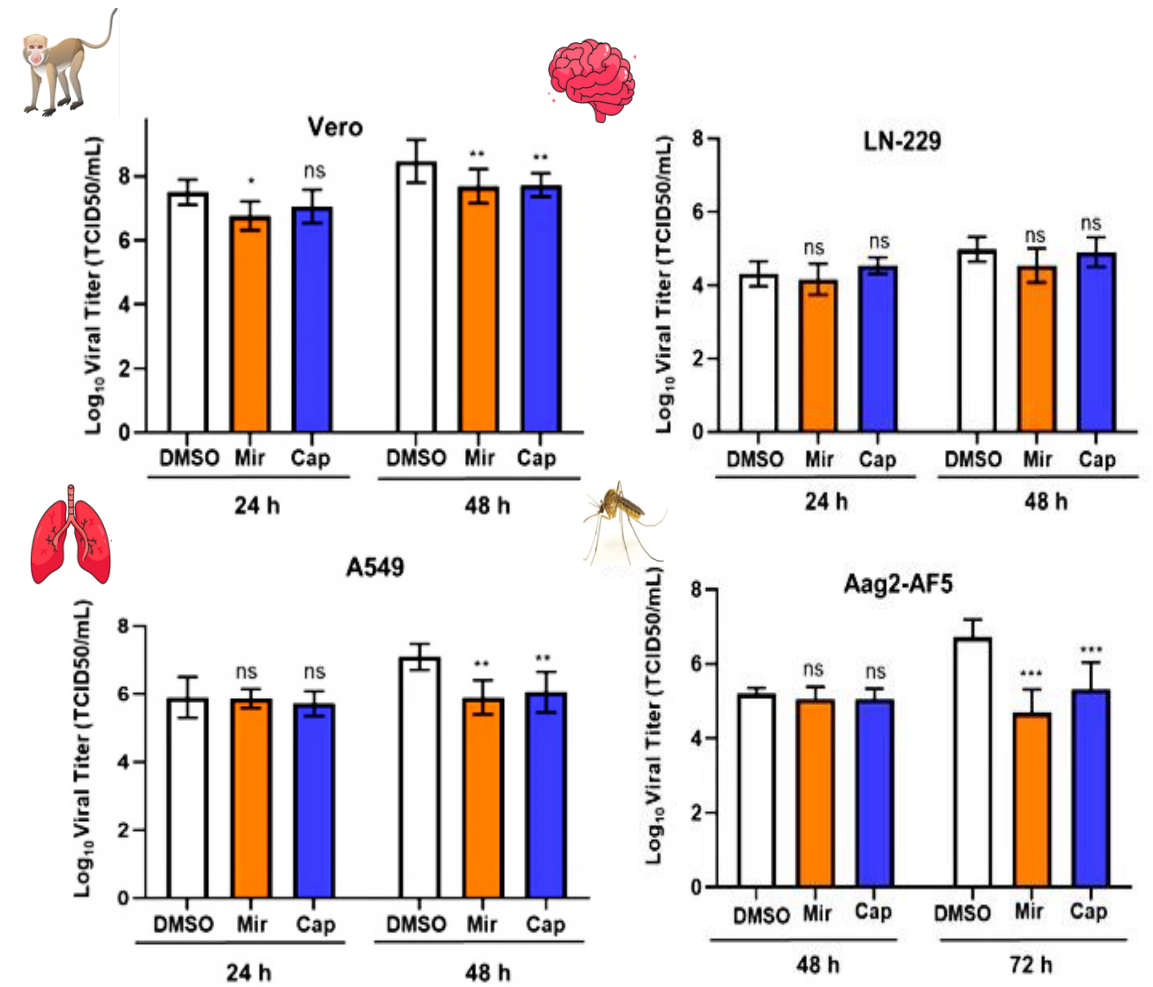
IC₅₀ calculadas a partir de una bajada mayor de 0,6 en escala logarítmica

EFFECTO DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION DE USUTU

Infección y tratamiento



Pretratamiento



IC₅₀ DE MIRANSERTIB Y CAPIVASERTIB EN LA REPLICACION DE ZIKA

Miransertib IC₅₀ (SI)

| | 24 h | 48 h |
|-------------|---------------|------------------|
| Vero | 2.1 ± 0.9 (8) | 2.4 ± 0.5 (4.7) |
| A549 | ND | 1.2 ± 0.2 (10.4) |

IC₅₀ calculadas a partir de una bajada mayor de 0,6 en escala logarítmica

OBJETIVOS

- ▶ OBJETIVO 1: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y la proteína AKT interaccionan en diferentes modelos celulares durante el proceso de infección
- ▶ OBJETIVO 2: Estudiar si la proteína NS5 de ZIKA y AKT co-localizan durante la infección viral en diferentes líneas células.
- ▶ OBJETIVO 3: Estudiar si hay cambios en la localización celular de AKT durante la infección viral.
- ▶ OBJETIVO 4: Estudiar el efecto de la inhibición química de AKT en diferentes modelos celulares.
- ▶ **OBJETIVO 5: Comparar las secuencias de AKT humano y mosquito y el acoplamiento de los inhibidores a ambas proteínas.**

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE AKT HUMANO Y MOSQUITO

PH DOMAIN

hAKT -----MSDVAIVKEGWLHKGREYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPDVDQREAPLNN 54
 mAKT MSSSDTTQPPAVPVTQPARVIQPSAALIVKEGWLYKRGEHIKNWRSRYFILRDDGTLVGYKNRPDASF-QAEPSSNN 76
 * . *****:*****:*. ** ***:*:*:*:*:*:*:*: : * **

PH DOMAIN

LINKER DOMAIN

hAKT FSVAQCQLMKTERPRPNTFIIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREWTTAIQTVDGLKKQEEEEMDFRSGSPDNSG 130
 mAKT FTVRGCQIMSVDPRPFTFIIIRGLQWTTVIERMFHVEEERERQEWVEAIRSVANRLTEAEAYQ-----GSQSNQDG 147
 *: * **:*:*.**** ***** ***** **** .**:* **:*:***: *.: * : ** *:.**

LINKER DOMAIN

CATALYTIC DOMAIN

hAKT AEEM-----EVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVIILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVA 188
 mAKT DVEMASIAEDELLEKFSVQGTSTGKISGRKKVTLENFEFLKVLGKGTFGKVIILCREKTAKLYAIKILKKEVIVQ 223
 ** . . . :*:*:*:*:*:*:*:***** :*:*. : **:*:*****

CATALYTIC DOMAIN

hAKT KDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYL 264
 mAKT KDEVAHTMAENRVLKKTNHPFLISLKYSFQTVDRLCFVMOYVNGGELFFHLSRERVFSEDRTRFYGAEIISALGYL 299
 *****:*****:*.**** :***** *****:*.*****:*****:*****:***. **

CATALYTIC DOMAIN

hAKT HSEKNVVYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMY 340
 mAKT HSH-EIVYRDLKLENLLLDKDGHIKIADFGLCKEQITYGRTTKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGLAVDWWGTGVVMY 374
 ** . :*****:*****:***** * . * * ***** ***** *****

CATALYTIC DOMAIN

hAKT EMMCGRLPFYNDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQHV 416
 mAKT EMMCGRLPFYNRDHDILFTLILMEEVKFPRSISANARDLLAGLLMKQPRDRLLGGGPNVKEIMVHPFFSSINWTDL 450
 *****:*: ** *****:***:.. :*:*****:*** *:*:***** :*.*** * **:* **

REGULATORY DOMAIN

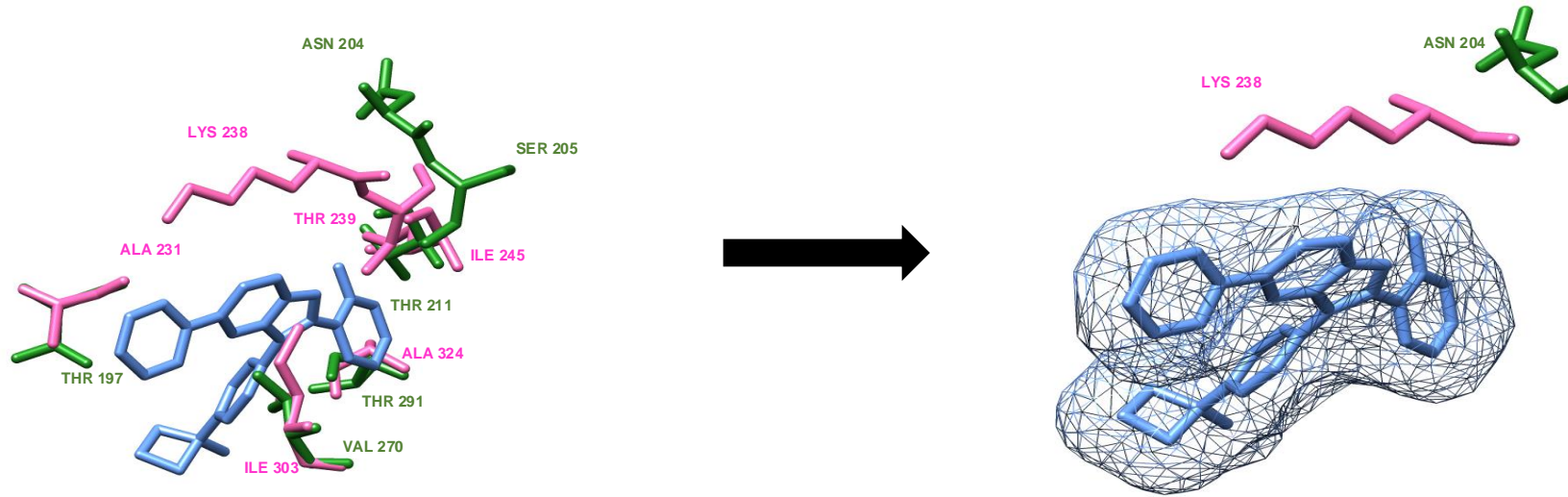
hAKT YEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA----- 480
 mAKT VQKRIAPPFKPQVTSDTDTRYFDSEFTGESVELTPPDNNGPLGAVQ--EEPHFSQFSYQDMASTLNTPSFINNPNS 524
 .:*.**:*****:*****:.. : :*****:.. : .*: ..*** ***** .: :

Identidad: 62%
Similitud: 73,8 %

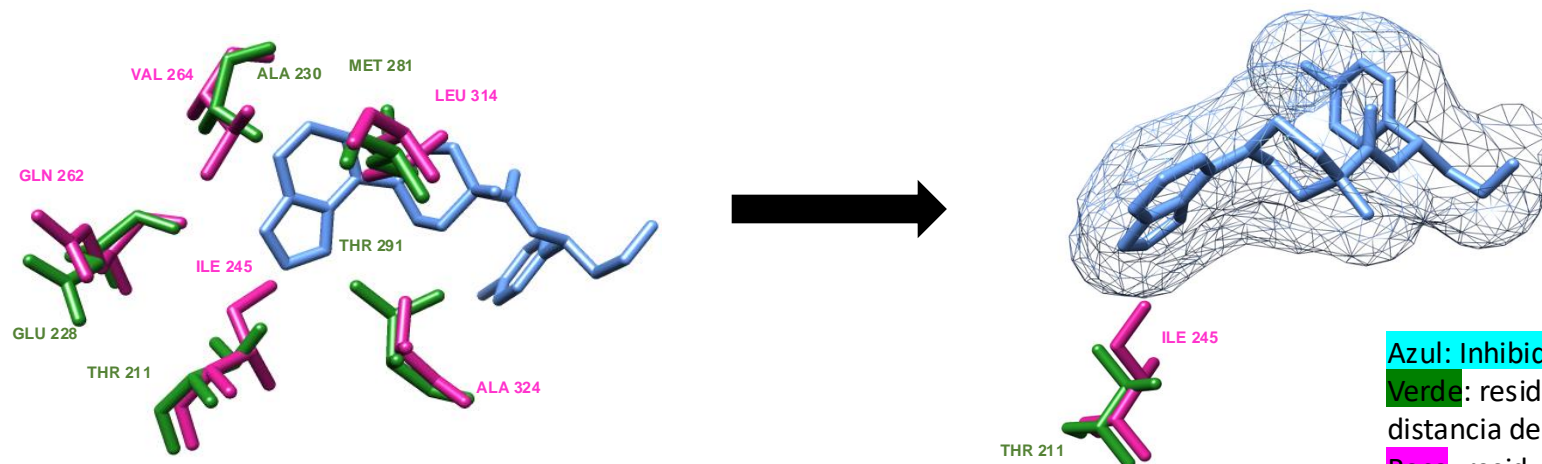
Azul: residuos situados a menos de 5 A de distancia del **Miransertib**
Amarillo: residuos situados a menos de 5 A de distancia del **Capivasertib**
Verde: residuos situados a menos de 5 A de distancia del **Miransertib y Capivasertib**
Gris: zona no definida de la estructura

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE AKT HUMANO Y MOSQUITO

Cambios de aminoácidos para Miransertib entre AKT de humano y de mosquito



Cambios de aminoácidos para Capivasertib entre AKT de humano y de mosquito



Azul: Inhibidor

Verde: residuos de AKT de humano situados a menos de 5 Å de distancia del inhibidor.

Rosa: residuos de AKT de mosquito situados a menos de 5 Å de distancia del inhibidor.

CONCLUSIONES

- ▶ **La proteína AKT tiene un papel muy conservado en la replicación de flavivirus, tanto en el hospedador (vertebrado) como en el vector de transmisión (invertebrado).**
- ▶ El papel jugado por AKT es directo y a través de la proteína NS5 viral ya que ambas proteínas co-inmunoprecipitan y co-localizan.
- ▶ AKT es un factor proviral en la infección por flavivirus. Inhibidores de esta quinasa celular disminuyen el título viral.
- ▶ El efecto observado tras la administración de los inhibidores es dependiente del modelo celular, indicando que el mecanismo por el que la quinasa modula la replicación podría ser diferente en hospedador y vector.

CONCLUSIONES

- ▶ La proteína AKT tiene un papel muy conservado en la replicación de flavivirus, tanto en el hospedador (vertebrado) como en el vector de transmisión (invertebrado).
- ▶ **El papel jugado por AKT es directo y a través de la proteína NS5 viral ya que ambas proteínas co-precipitan y co-localizan.**
- ▶ AKT es un factor proviral en la infección por flavivirus. Inhibidores de esta quinasa celular disminuyen el título viral.
- ▶ El efecto observado tras la administración de los inhibidores es dependiente del modelo celular, indicando que el mecanismo por el que la quinasa modula la replicación podría ser diferente en hospedador y vector.

CONCLUSIONES

- ▶ La proteína AKT tiene un papel muy conservado en la replicación de flavivirus, tanto en el hospedador (vertebrado) como en el vector de transmisión (invertebrado).
- ▶ El papel jugado por AKT es directo y a través de la proteína NS5 viral ya que ambas proteínas co-precipitan y co-localizan.
- ▶ **AKT es un factor proviral en la infección por flavivirus. Inhibidores de esta quinasa celular disminuyen el título viral.**
- ▶ El efecto observado tras la administración de los inhibidores es dependiente del modelo celular, indicando que el mecanismo por el que la quinasa modula la replicación podría ser diferente en hospedador y vector.

CONCLUSIONES

- ▶ La proteína AKT tiene un papel muy conservado en la replicación de flavivirus, tanto en el hospedador (vertebrado) como en el vector de transmisión (invertebrado).
- ▶ El papel jugado por AKT es directo y a través de la proteína NS5 viral ya que ambas proteínas co-inmunoprecipitan y co-localizan.
- ▶ AKT es un factor proviral en la infección por flavivirus. Inhibidores de esta quinasa celular disminuyen el título viral.
- ▶ **El efecto observado tras la administración de los inhibidores es dependiente del modelo celular, indicando que el mecanismo por el que la quinasa modula la replicación podría ser diferente en hospedador y vector.**

OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- ▶ Estudio de las interacciones entre otros factores del hospedador y la proteína NS5 viral de flavivirus de interés en salud humana y animal. Reposicionamiento de fármacos.
- ▶ Estudio de la autofagia durante la infección por diferentes flavivirus.
- ▶ Colaboraciones con grupos de la UCLM: análisis de la actividad antiviral de compuestos de nueva síntesis (Labs C. Romero y J.C. García) y caracterización de aislados salvajes (U.Hofle).
- ▶ Colaboraciones internacionales: replicación de flavivirus en células de mosquito (K. Maringer; UK), construcción de clones infecciosos de flavivirus (J. Webber; USA), análisis genómicos (J. Queirós; Portugal).

AGRADECIMIENTOS

Laboratorio de Virología Molecular (Instituto de Biomedicina, Albacete)

Antonio Mas

Rosario Sabariegos

Armando Arias

Pilar Clemente

Laura Albentosa

Imanol Rodrigo

Martín Arellano

María José Romero de Ávila

José J. Lorenzo

Belén García



Dr. Kevin Maringer (The Pirbright Institute, UK)



**El Rol de la Autofagia en las Infecciones causadas por Flavivirus
(Martín Arellano Sorlózano; VIROMOL)**



**Eeyarestatin I, an inhibitor of the valosin-containing protein,
exhibits potent virucidal activity against the flaviviruses (Imanol
Rodrigo Quintanar; VIROMOL)**

GRACIAS POR SU ATENCIÓN

