UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DE LA BIOLOGÍA CELULAR A LOS TRATAMIENTOS ANTIVIRALES: ESTUDIO DEL FLUJO DE LÍPIDOS Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL COMO DIANAS TERAPÉUTICAS FRENTE A BUNYAVIRUS

TESIS DOCTORAL

Alberto Fernández Oliva

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DE LA BIOLOGÍA CELULAR A LOS TRATAMIENTOS ANTIVIRALES: ESTUDIO DEL FLUJO DE LÍPIDOS Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL COMO DIANAS TERAPÉUTICAS FRENTE A BUNYAVIRUS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por
Alberto Fernández Oliva, graduado en Bioquímica

Directora de Tesis
Cristina Risco Ortiz

Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Laboratorio de Estructura Celular perteneciente al Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) con un Contrato Predoctoral para la Formación de Doctores (BES-2016-07817) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, asociado a los proyectos: *Factorías de replicación de virus ARN: de la biología estructural a los tratamientos antivirales* (BIO2015-68758-R), y *Búsqueda de nuevos antivirales de amplio espectro: transporte de lípidos y proteínas mitocondriales como dianas* (RTI2018-094445-B-100).

Investigadora principal:
Dra. Dª Cristina Risco Ortiz

Agradecimientos

Me gustaría dedicar las primeras páginas de este trabajo a todas aquellas personas que han colaborado en su realización, y al mismo tiempo agradecerles sinceramente la ayuda inestimable que en alguno u otro momento me han ofrecido durante esta aventura personal y profesional que ha abarcado los últimos cinco años de mi vida.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Cristina Risco por haberme acogido en su grupo de investigación y dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su laboratorio. Gracias por tu apoyo, consejo y guía. Pero también por escuchar y valorar mis ideas.

Me gustaría dar las gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Estructura Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC): a Isabel y Raquel, por toda la paciencia, enseñanzas y ayuda en el día a día; a Beatriz, que años antes había sido mi directora de TFM y que me animó a continuar en la carrera investigadora y hacer el doctorado; a mis compañeros Moisés y Paula, por toda la ayuda, consejos y conversaciones que tanto han enriquecido nuestras respectivas tesis; y a Sara, por su apoyo técnico.

El desarrollo de esta tesis no habría sido posible sin la valiosa colaboración con diferentes investigadores de otros centros. Especialmente me gustaría agradecer a la Dra. Anne-Claude Gavin por todo el material que amablemente compartió con nosotros: tanto las líneas celulares, como los plásmidos y protocolos, que nos permitieron estudiar las LTPs durante la infección; y también por recibirme en su laboratorio durante mi estancia en el EMBL-Heidelberg. De mi estancia en el EMBL, también me gustaría dar las gracias por recibirme con los brazos abiertos, darme soporte técnico y ayudarme con el análisis del cargo lipídico de las LTPs a Kevin Titeca, Denisa, Katharina y Larissa, de la Unidad de Biología Estructural y Computacional; a Prasad Phapale, del servicio de metabolómica; y a Domagoj Stritof, que tanto me ayudó en lo profesional y en lo personal durante mi estancia. También tengo que agradecer a la Dra. Fina Casas, responsable del servicio de lipidómica del IQAC-CSIC (Barcelona), por su soporte técnico para el estudio de la composición lipídica celular durante la infección. Y a las Dras. Ana Ramírez y, en especial, Marta Gómez de Cedrón del Instituto IMDEA-Alimentación (Madrid), por formarme y permitirme realizar los experimentos de bioenergética y proliferación en su laboratorio.

También me gustaría dar las gracias a todo el personal de los servicios técnicos del CNB. En particular a las Dras. Sylvia Gutiérrez y Ana Oña, del Servicio de Microscopía Óptica avanzada; Cristina Patiño y Beatriz Martín, del servicio de microscopía electrónica del CNB; y M.ª Carmen Moreno-Ortiz y Sara Escudero, del Servicio de Citometría de Flujo. También a Maite Rejas y Milagros Guerra del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular (CBM-SO, Madrid).

Muchas gracias a mi familia, a mis abuelos Alfredo y Teresa, a mi madre, a mis hermanos Eduardo y Natalia, y a mi tía Rosalía.

Muchas gracias a todos mis amigos, pero en especial a María, con la que tanto he compartido desde aquel primer día de clase hasta hoy, y que sin duda alguna forma también parte de mi familia.

Por último, y no menos importante, muchas gracias a ti, Aitor, que tanta paciencia has tenido conmigo día a día sobre todo en la última etapa de escritura de la tesis.

¡Muchas gracias a todos!

Índice

ÍNDICE iii
RESUMEN y *ABSTRACT* 1
ABREVIATURAS 4

INTRODUCCIÓN 9

1. Virus emergentes y reemergentes: un reto sanitario global 10
2. Orden Bunyavirales 13
2.1. El virus Bunyamwera 14
2.1.1. Estructura y genoma viral 15
2.1.2. Proteínas virales 16
2.1.3. Ciclo de replicación viral 18
2.1.4. Ensamblaje y morfogénesis de la factoría viral 20
3. Lípidos y virus 21
3.1. Traslocación y regulación de enzimas de la biosíntesis de lípidos 23
3.1.1. Regulación de la síntesis de glicerofosfolípidos 23
3.1.2. Regulación de 'lipid rafts' y la síntesis de colesterol 24
3.1.3. Regulación de la síntesis de esfingolípidos 25
3.2. Interferencia en la señalización mediada por lípidos 25
3.3. Interferencia en el tráfico de lípidos en los sitios de contacto entre membranas 26
4. Mitocondrias y virus 28
4.1. Dinámica mitocondrial y mitofagia 28
4.2. Maquinaria de fusión y fisión mitocondrial y su regulación 29
4.2.1. Proteínas de fusión 29
4.2.2. Proteínas de fisión 29
4.3. Dinámica mitocondrial y respuesta inmune intracelular 30
4.4. La dinámica mitocondrial durante la infección viral 31

OBJETIVOS 33

MATERIALES y MÉTODOS 35

1. Materiales 36
1.1. Células y virus 36
1.2. Anticuerpos y sondas 38
1.3. Otros reactivos 40
2. Biología celular y virología 41
2.1. Infección de cultivos celulares con virus BUNV o HCoV-229E 41
2.2. Titulación de virus BUNV mediante ensayo de placa 41

2.3. Titulación de virus HCoV-229E por determinación de TCID50 42
2.4. Purificación de virus BUNV 43
2.5. Tratamiento con drogas y determinación de IC50 por inmunofluorescencia 44
2.6. Estudio de proliferación celular por impedancia (xCELLigence®) 45
2.7. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo de MTT 46
2.8. Estudio de las fases del ciclo celular por citometría de flujo 46
2.9. Estudios de bioenergética.....47
2.10. Ensayo de especies reactivas de oxígeno mitocondriales y potencial de membrana mitocondrial 48
2.11. Transfección de células de mamífero 49
2.11.1. Método del fosfato cálcico para la transfección de plásmidos 49
2.11.2. Transfección de siRNAs con lipofectamina RNAiMAX® 50
3. Análisis Bioquímicos 51
3.1. Purificación de complejos LTP-lípido 51
3.2. Extracción de lípidos 52
3.3. Cromatografía en capa fina de alta eficacia aplicada al análisis de lípidos 53
3.4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) aplicada a la identificación de lípidos 53
3.4.1. Análisis del cargo lipídico de LTPs por LC-MS/MS 53
3.4.2. Análisis de lípidos de muestras de extractos celulares y virus purificados 55
3.5. Cuantificación de colesterol 56
3.6. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección 56
3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones Desnaturalizantes 56
3.6.2. Electrotransferencia e inmunodetección (western blot) 57
3.7. Extracción de RNA total y RT-PCR 57
4. Microscopía óptica de fluorescencia 58
4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IF) 58
4.2. Microscopía de células vivas 59
4.3. Análisis y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal 59
5. Microscopía electrónica de transmisión 60
5.1. Inclusión en resina para el estudio de la ultraestructura de monocapas celulares 60
5.2. Obtención de secciones ultrafinas orientadas 60
5.3. Tinción de secciones para microscopía electrónica 61
5.4. Tinción negativa de virus 61
5.5. Inmunomarcaje de criosecciones mediante el método de Tokuyasu 61

RESULTADOS 64

1. Descripción de las factorías virales del virus Bunyamwera en células 293T y Vero 65
1.1. Dinámica de la infección del BUNV en células 293T y Vero 65
1.2. Estudio de la infección mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica 66

2. Estudio de la composición lipídica durante la infección por BUNV 70
2.1. Preparación de muestras celulares y virales 70
2.2. Estudio de la composición lipídica de células y virus mediante cromatografía en capa fina 71
2.3. Estudio de la composición lipídica de células y virus mediante espectrometría de masas 73
2.3.1. Cambios en la composición lipídica celular durante la infección 74
2.3.2. Composición lipídica de virus extracelulares 77
2.3.2. Análisis de rutas metabólicas de lípidos alteradas mediante BioPAN® 78
2.4. El papel del colesterol en la infección por BUNV 80
2.4.1. Metabolismo del colesterol durante la infección 80
2.4.2. El flujo del colesterol durante la infección 82
2.4.3. La interferencia en el flujo del colesterol como diana antiviral 84
3. Papel de las proteínas transportadoras de lípidos en la infección por BUNV 85
3.1. Estudio del cargo lipídico de tres proteínas transportadoras de lípidos: OSBP, CERT y FAPP2 86
3.1.1. Sistema de expresión de LTPs inducible por tetraciclina 87
3.1.2. Purificación de los complejos LTP-lípido 88
3.1.3. Estudio del cargo lipídico de OSBP mediante cromatografía en capa Fina 90
3.1.4. Estudio del cargo lipídico de OSBP, CERT y FAPP2 mediante espectrometría de masas 91
3.2. Papel de la proteína OSBP durante la infección por BUNV 93
3.2.1. Efecto de la sobreexpresión de OSBP durante la infección 93
3.2.2. Localización de OSBP durante la infección 95
3.2.3. La inhibición de la actividad de OSBP como diana para el desarrollo de estrategias antivirales 97
3.2.4. Efectos de la inhibición farmacológica de OSBP 98
a. Efecto sobre la expresión de proteínas virales N y Gc 98
b. Efecto sobre la localización de colesterol intracelular 99
c. Efecto sobre el aparato de Golgi y la localización de OSBP 101
d. Efecto de la inhibición de OSBP sobre la ultraestructura (TEM) 102
3.2.5. Efecto del silenciamiento de OSBP mediante siRNAs en la infección 103
4. Papel de la dinámica del *network* mitocondrial en la infección por BUNV 105
4.1. Estudio de la alteración estructural del *network* mitocondrial durante la infección por BUNV 105
4.1.1. Efecto de la infección del virus BUNV sobre la arquitectura del *network* mitocondrial 105
4.1.2. Dinámica del *network* mitocondrial durante la infección 108
4.1.3. Estudio de las crestas mitocondriales durante la infección 110
4.1.4. Estudio del *network* mitocondrial tras la infección por el virus rBUN-delNSs 111
4.2. Estudio de la alteración funcional del *network* mitocondrial durante la Infección por el BUNV 112
4.2.1. Bioenergética 112

4.2.2. Especies reactivas de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial ..113
4.2.3. Proliferación y muerte celular ……115
4.2.4. Ciclo celular ……116
4.3. Selección y validación de compuestos que alteran el *network* mitocondrial y tienen potencial antiviral contra BUNV ……117
4.4. Efecto de la digoxina en la infección de BUNV ……121
4.5. Efecto de Mdivi-1 en la infección de BUNV ……126
4.6. Efecto del silenciamiento de mitofusina 2 en la infección ……129
5. Validación de la capacidad antiviral contra coronavirus de las moléculas estudiadas previamente en bunyavirus ……130

DISCUSIÓN 133

1. La composición lipídica celular durante la infección y el lipidoma viral ……134
2. Transporte de lípidos mediado por LTPs en los sitios de contacto entre membranas del retículo-Golgi durante la infección por el BUNV ……138
3. Estructura del *network* mitocondrial durante la infección por el BUNV ……140
4. Actividad antiviral de moléculas que inhiben OSBP o interfieren en la dinámica mitocondrial ……144
4.1. La inhibición de OSBP con itraconazol y OSW-1 como estrategia antiviral ……144
4.2. El tratamiento con glucósidos cardíacos como estrategia antiviral ……146
4.3. Antivirales contra coronavirus ……148

CONCLUSIONES 150

BIBLIOGRAFÍA ……153

ANEXO ……173

Resumen y *Abstract*

RESUMEN

De la Biología Celular a los Tratamientos Antivirales: Estudio del Flujo de Lípidos y la Dinámica Mitocondrial como Dianas Terapéuticas frente a Bunyavirus

La propagación de virus emergentes y reemergentes con capacidad de generar brotes epidémicos se ha convertido en un problema sanitario a nivel global. Por este motivo, existe un interés creciente en estudiar las interacciones entre los virus y diferentes factores de la célula huésped para identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de antivirales de amplio espectro.

Gracias a una combinación de técnicas de bioquímica, biología molecular y microscopía, hemos estudiado tres mecanismos celulares durante la infección por el virus Bunyamwera (BUNV) en cultivos celulares. El BUNV es el prototipo para el estudio del orden Bunyavirales, dentro del cual se incluyen patógenos graves considerados virus emergentes.

En primer lugar, se evaluó el impacto de la infección por el BUNV en la composición lipídica celular mediante espectrometría de masas en células infectadas. Se observaron cambios significativos en el contenido de varias especies de glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol en las células infectadas por el BUNV, lo que sugiere que estos lípidos podrían tener un papel funcional durante la infección. Además, el análisis de lipidómica de los viriones de BUNV reveló que su envuelta tiene una composición lipídica única, encontrándose enriquecida en colesterol y esfingolípidos. Esto indicaría que el BUNV se replica y ensambla en dominios de membrana enriquecidos con colesterol de tipo *lipid rafts* o balsas lipídicas.

En segundo lugar, se estudió el cargo lipídico y la ubicación de tres proteínas transportadoras de lípidos en el sitio de contacto entre las membranas del retículo endoplásmico y el Golgi: OSBP, CERT y FAPP2. Se encontró que durante la infección OSBP y CERT transportaban colesterol y colesterol sulfato, respectivamente. Además, OSBP se reclutaba a las factorías virales, llegándose a localizar en el interior de las esférulas de replicación mediante inmunomarcaje y TEM según la técnica de Tokuyasu. Además. la sobreexpresión de OSBP aumentó la expresión citoplasmática de proteínas virales, así como el título viral intra y extracelular.

Adicionalmente, se ha descubierto que la infección por el BUNV afecta la estructura del *network* mitocondrial de las células huésped desde tiempos tempranos de infección. El BUNV inducía la fragmentación y el agrupamiento yuxtanuclear de las mitocondrias, así como una alteración morfológica en la ultraestructura de las crestas mitocondriales. Los cambios estructurales se encontraban asociados con una alteración de la respiración mitocondrial, una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial.

Por último, se seleccionaron un total de siete moléculas diferentes cuya diana eran los mecanismos celulares mencionados previamente, y se testó su capacidad antiviral contra BUNV: simvastatina, MβCD, itraconazol, OSW-1, digoxina, lanatosido C y mdivi-1. Todos ellos inhibieron efectivamente la infección por el BUNV en cultivos celulares.

Estas mismas moléculas también resultaron ser inhibidores de la infección de un virus RNA no relacionado, el coronavirus humano HCoV-229E. Nuestros hallazgos demuestran que apuntar a los factores del huésped celular es una estrategia potente para desarrollar nuevos antivirales. Asimismo, las moléculas identificadas pueden abrir la puerta para ser estudiadas a futuro en modelos animales y ensayos clínicos.

ABSTRACT

From Cellular Biology to Antiviral Treatments: A Study of Lipid Flows and Mitochondrial Dynamics as Therapeutical Targets Against Bunyavirus

The spread of emerging and re-emerging viruses with the capacity to generate epidemic outbreaks has become a global health problem. For this reason, there is a growing interest in studying the interactions between viruses and different host cell factors to identify targets for developing new broad-spectrum antivirals.

Thanks to a combination of biochemistry, molecular biology, and microscopy techniques, we have studied three cellular mechanisms during Bunyamwera virus (BUNV) infection in cell cultures. BUNV is the prototype of the *Bunyavirales* order, which comprises severe pathogens, including some emerging viruses.

Firstly, we evaluated the impact of BUNV infection on cellular lipid composition by mass spectrometry in infected cells. Significant changes in the content of several glycerophospholipids species, sphingolipids, and cholesterol were noticed in BUNV-infected cells, suggesting that these lipids could have a functional role during infection. Furthermore, the lipidomics analysis of BUNV virions revealed that its envelope has a unique lipid composition. It was enriched in cholesterol and sphingolipids, indicating that BUNV replicates and assembles at cholesterol-enriched membrane domains like lipid rafts.

Secondly, we studied the lipid cargo and location of three lipid transfer proteins in the contact membrane site between ER and Golgi: OSBP, CERT and FAPP2. Cholesterol and cholesterol sulphate were found to be transported by OSBP and CERT during infection. Moreover, OSBP was recruited to the viral factories and was localized inside the replication organelles by immunogold labelling and TEM. Overexpression of OSBP also increased the cytoplasmic expression of viral proteins and the intra and extracellular viral titers.

Additionally, the BUNV was found to impact the mitochondrial network of host cells since early infection. BUNV induced fragmentation and juxtanuclear clustering of the mitochondria, and a morphological alteration in the ultrastructure of mitochondrial cristae. The structural changes were concomitant with impaired mitochondrial respiration, loss of the mitochondrial membrane potential, and increased mitochondrial reactive oxygen species production.

Seven different drugs which target the aforementioned cellular mechanisms were selected and tested against BUNV: simvastatin, MβCD, itraconazole, OSW-1, digoxin, lanatoside C, and mdivi-1. They all inhibited BUNV infection with different potency in cell cultures.

In addition, the same drugs were also able to inhibit the infection of a non-related RNA virus, the human coronavirus HCoV-229E. Our findings demonstrate that targeting cell host factors is a potent strategy for developing new antivirals, and the identified molecules may open the door for their future study in animal models and clinical trials.

Keywords:

Emerging viruses; re-emerging viruses; bunyavirus; Bunyamwera virus; lipid composition; viral lipidome; lipid flows; lipid transfer proteins; OSBP; mitochondrial dynamics; antivirals.

Abreviaturas

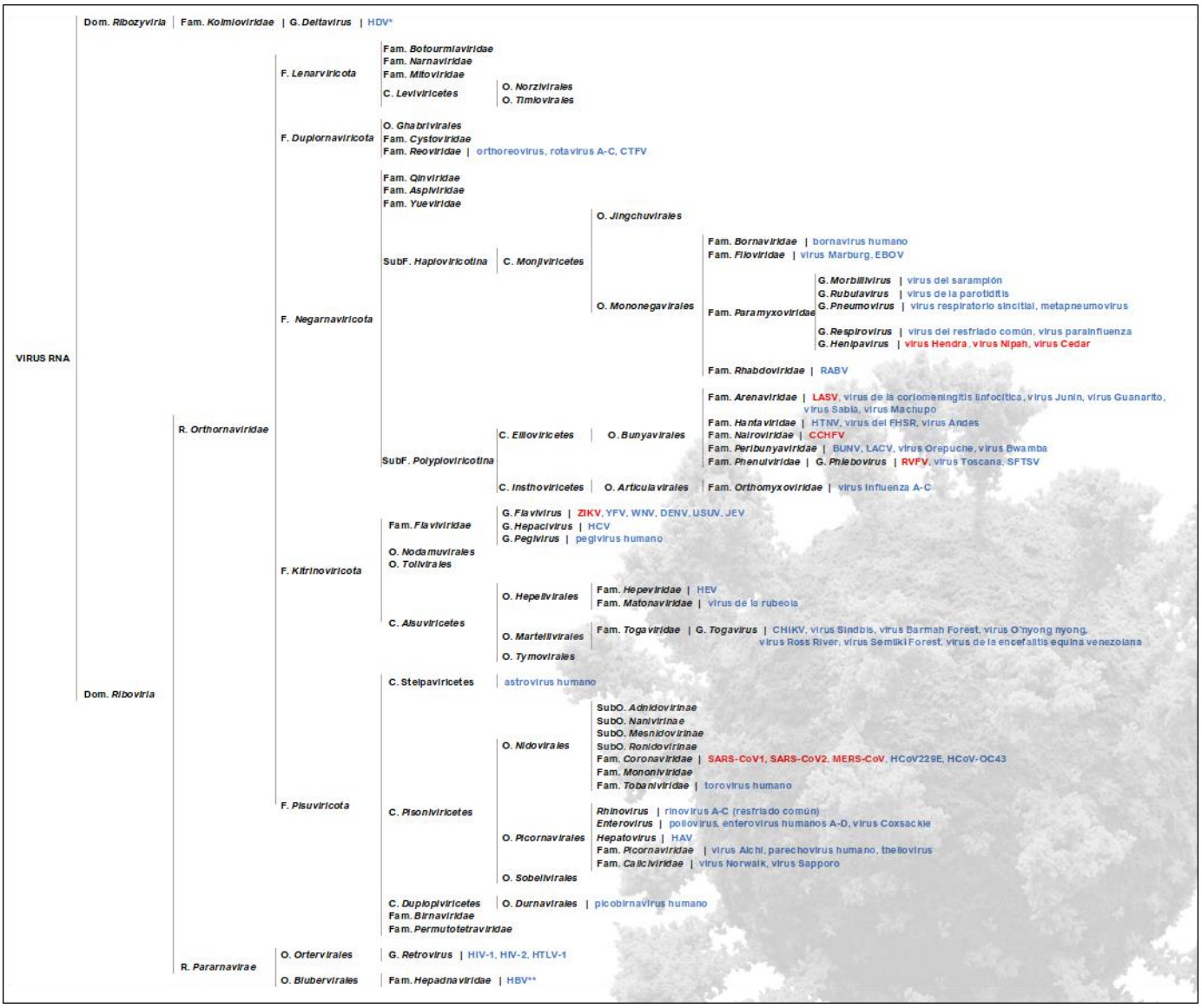
Nota: como criterio general, en el presente trabajo se han utilizado las abreviaturas correspondientes a los términos en inglés, ya que son las más extendidas en la bibliografía científica. A continuación, se recoge un listado de las abreviaturas indicando el término en inglés del que proceden en color gris.

AA	Antimicina A
AANEs	Aminoácidos No Esenciales
BUNV	Virus Bunyamwera, *Bunyamwera Virus*
CC50	Concentración citotóxica que causa la muerte del 50% de las células en cultivo
CCHFV	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, *Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus*
Cer	Ceramida, *Ceramide*
CERT	Proteína transportadora de ceramidas, *Ceramide Transfer Protein*
CHIKV	Virus Chikungunya, *Chikungunya Virus*
Chol	Colesterol, *Cholesterol*
CMV	Citomegalovirus, *Cytomegalovirus*
COVID-19	Enfermedad del coronavirus de 2019, *Corovavirus Disease 2019*
CRs	Complejos Replicativos
CTE	Cadena de Transporte de Electrones
CTFV	Virus de la fiebre del Colorado por garrapatas, *Colorado Tick Fever Virus*
DAAs	Antivirales de acción directa, *Direct Acting Antivirals*
DAG	Diacilglicerol, *Diacylglycerol*
DENV	Virus Dengue, *Dengue Virus*
dhCer	Dihidroceramida, *Dihydroceramide*
dhSM	Dihidroesfingomielina, *Dihydrosphingomyelin*
DIG	Digoxina
DNA	Ácido desoxirribonucleico, *Desoxyribonucleic Acid*
EBOV	Virus del Ébola, *Ebola virus*
EBV	Virus Ebstein-Bar, *Ebstein-Bar Virus*
EIM	Espacio Intermembrana Mitocondrial
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis, *Encephalomyocarditis Virus*
FAPP2	Proteína adaptadora de 4 fosfatos, *Four Phosphate Adaptor Protein 2*
FBS	Suero fetal bovino, *Foetal bovine serum*
FHV	Virus Flock House, *Flock House Virus*
GFP	Proteína verde fluorescente, *Green Fluorescence Protein*
GM1/3	Gangliósidos GM1 y GM3, *Gangliosides GM1/GM3*
GPLs	Glicerofosfolípidos, *Glycerophospholipids*

HAV	Virus de la hepatitis A, *Hepatitis A Virus*
HAZV	Virus de Hazara, *Hazara Virus*
HBV	Virus de la hepatitis B, *Hepatitis B Virus*
HCoV-229E	Coronavirus humano 229E, *Human coronavirus 229E*
HCV	Virus de la hepatitis C, *Hepatitis C Virus*
HexCer	Hexosilceramida, *Hexosylceramide*
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana 1, *Human Immunodeficiency Virus 1*
HMGR	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzime A reductasa
hpi	Horas post-infección
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia, *High Performance Liquid Chromatography*
HRP	Peroxidasa de rábano picante, *Horseradish peroxidase*
HTLV-1	Virus linfotrópico humano de células T tipo 1, *Human T-lymphotropic virus 1*
HTNV	Virus Hantaan, *Hantaan Virus*
IC50	Concentración que inhibe el 50% de la infección
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de Virus, *International Committee on Taxonomy of Viruses*
ITZ	Itraconazol
JEV	Virus de la encefalitis japonesa, *Japanese Encephalitis Virus*
LACV	Virus de La Crosse, *La Crosse Virus*
LASV	Virus Lassa, *Lassa Virus*
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
LTP	Proteína transportadora de lípidos, *Lipid Transfer Protein*
MCS	Sitios de contacto entre membranas, *Membrane Contact Sites*
Mdivi-1	Inhibidor de la división mitocondrial 1, *Mitochondrial Division Inhibitor*
ME	Microscopía electrónica
MF	Microscopía de fluorescencia
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MOI	Multiplicidad de infección, *Multiplicity of Infection*
mROS	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales, *Mitochondrial Reactive Oxygen Species*
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MS	Espectrometría de masas, *Mass Spectrometry*
MβCD	Metil-beta-ciclodextrina, *Methyl-beta-cyclodextrin*

NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle, *Newcastle Disease Virus*
NPC1	Proteína de Niemann-Pick C1, *Niemann-Pick Protein C1*
OCR	Índice de Consumo de Oxígeno, *Oxygen Consumption Rate*
OR	Orgánulo de replicación
ORF	Marco abierto de lectura, *Open Reading Frame*
OSBP	Proteína de unión a oxiesteroles, *Oxysterol Binding Protein*
OSW-1	Orsaponina (inhibidor de OSBP y ORP4)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa, *Oxidative Phosphorilation*
PC	Fosfatidilcolina, *Phosphatidylcholine*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*
PE	Fosfatidiletanolamina, *Phosphatidylethanolamine*
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidades formadoras de placas de lisis, *Plaque Forming Units*
PI	Fosfatidilinositol, *Phosphatidylinositol*
PI	Yoduro de propidio (ES), *Propidium Iodide (EN)*
PI4P	Fosfatidilinositol-4-fosfato, *Phosphatidylinositol 4-phosphate*
PS	Fosfatidilserina, *Phosphatidylserine*
RdRp	RNA polimerasa dpte. de RNA, *RNA dependent RNA polymerase*
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA	Ácido ribonucleico, *Ribonucleic Acid*
RNPs	Ribonucleoproteínas, *Ribonucleoproteins*
Rot	Rotenona
RT	Retrotranscriptasa, *Retrotranscriptase*
RVFV	Virus de la fiebre del valle del Rift, *Rift Valley Fever Virus*
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo, *Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus*
SBV	Virus Schmallenberg, *Schmallenberg Virus*
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño, *Size Exclusion Chromatography*
SFTSV	Virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia, *Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus*
SFV	Virus del bosque Semliki, *Semliki Forest Virus*
SIM	Simvastatina
SLs	Esfingolípidos, *Sphingolipids*
SM	Esfingomielina, *Sphingomyelin*

SREBP	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroles, *Sterol Regulatory Element Binding Protein*
SRV	Virus respiratorio sincitial, *Syncytial Respiratory Virus*
TAG	Triacilglicerol, *Triacylglycerol*
TCID50	Concentración de virus necesaria para producir efecto citopático u otro signo de infección en el 50% de las células en cultivo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, *Transmission Electron Microscopy*
TGN	Red del trans-Golgi, *Trans-Golgi Network*
TLC	Cromatografía en capa fina, *Thin Layer Chromatography*
TMRM	Tetrametilrodamina, *Tetramethylrhodamine*
USUV	Virus Usutu, *Usutu Virus*
WB	Western blot
WNV	Virus del Nilo Occidental, *West Nile Virus*
YFV	Virus de la fiebre amarilla, *Yellow Fever Virus*
ZIKV	Virus Zika, *Zika Virus*
ΔΨm	Potencial de membrana mitocondrial



Clasificación de los principales virus RNA que infectan a humanos. *En azul se muestran las especies de virus agrupadas según criterios taxonómicos. En rojo, se han marcado las especies de virus que además están incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS. HAV, HBV, HCV, HDV, HEV: virus de las hepatitis A, B, C, D y E; CTFV, virus de la fiebre del Colorado por garrapatas; EBOV, virus del Ébola; RABV, virus de la rabia; LASV, virus Lassa; HTNV, virus Hantaan; virus del FHSR, virus del; CCHFV, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; BUNV, virus Bunyamwera; LACV, virus de La Crosse; RVFV, virus de la fiebre del valle del Rift; SFTSV, virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia; YFV, virus de la fiebre amarilla; WNV, virus del Nilo Occidental; DENV, virus Dengue; USUV, virus Usutu; JEV, virus de la encefalitis japonesa; ZIKV, virus Zika; CHIKV, virus Chikungunya; HCoV, coronavirus humano; SARS-CoV1/2, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipos 1/2; MERS-CoV, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio; HIV-1/2, virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1/2; HTLV-1, virus linfotrópico de células T humano tipo I. *El HDV es en realidad una partícula subviral, RNA satélite o virusoide, que requiere la co-infección con el virus HBV para poder replicarse. **Aunque las partículas virales del HBV poseen un genoma de DNA, su replicación involucra un RNA intermedio que se transcribe de vuelta en DNA a través de una transcriptasa inversa. Términos taxonómicos: Dom, dominio; R, reino; F, filo; SubF, subfilo; C, clase; O, orden; SubO, suborden; Fam, familia; G, género.*

1

Introducción

1. Virus emergentes y reemergentes: un reto sanitario global

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes representan uno de los mayores desafíos para la salud pública en el siglo XXI, como hemos podido comprobar a raíz de la aparición del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 a finales de 2019, responsable de la actual pandemia que ha sumado más de 314 millones de casos y causado en torno a 5,5 millones de muertes en todo el mundo desde su inicio (Assefa *et al.,* 2022).

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas causadas por patógenos de nueva aparición o que previamente se conocían, pero cuya incidencia y/o distribución geográfica sufre un rápido aumento; mientras que las enfermedades infecciosas reemergentes hacen referencia a las producidas por patógenos que han reaparecido después de haber sido controlados o erradicados previamente (Nii-Trebi, 2017).

Los virus son patógenos intracelulares obligados, que necesitan la maquinaria de una célula huésped para replicarse y formar nuevos virus. Durante las dos últimas décadas, la comunidad mundial se ha enfrentado a un notable incremento en el número de brotes de enfermedades infecciosas producidas por virus emergentes y reemergentes, que han supuesto no solo una gran amenaza para la seguridad sanitaria global, sino que también han tenido importantes consecuencias a nivel económico, social y político (Smith *et al.,* 2019). La mayoría de estos virus tienen en común que poseen un genoma RNA y que son zoonóticos, es decir, se originaron en animales silvestres reservorio y han traspasado la barrera de especie para infectar a los humanos, causando enfermedades de forma y gravedad variables como el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) que se originó en China en 2002 (Drosten *et al.,* 2003), la pandemia de gripe porcina H1N1 de 2009 originada en México (Chowell *et al.,* 2011), el brote del virus del Ébola (EBV) en África Occidental a finales de 2013 (Cenciarelli *et al.,* 2015), o la emergencia sanitaria en Nigeria causada por el virus Lassa (LASV) en 2018 (Kafetzopoulou *et al.,* 2019). Los principales brotes por virus emergentes y reemergentes entre los años 2000 y 2020 se han recogido en la Figura 1.

En respuesta a la creciente preocupación internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado un listado de patógenos con potencial de generar una nueva epidemia y cuya investigación debe ser prioritaria a nivel mundial. En ella se incluyen, además de algunos de los virus mencionados anteriormente, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV) y el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), pertenecientes al orden *Bunyavirales* (lista de enfermedades y patógenos prioritarios para la I+D debido a su potencial para generar contextos de emergencia de salud pública

publicada por la OMS: https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts).

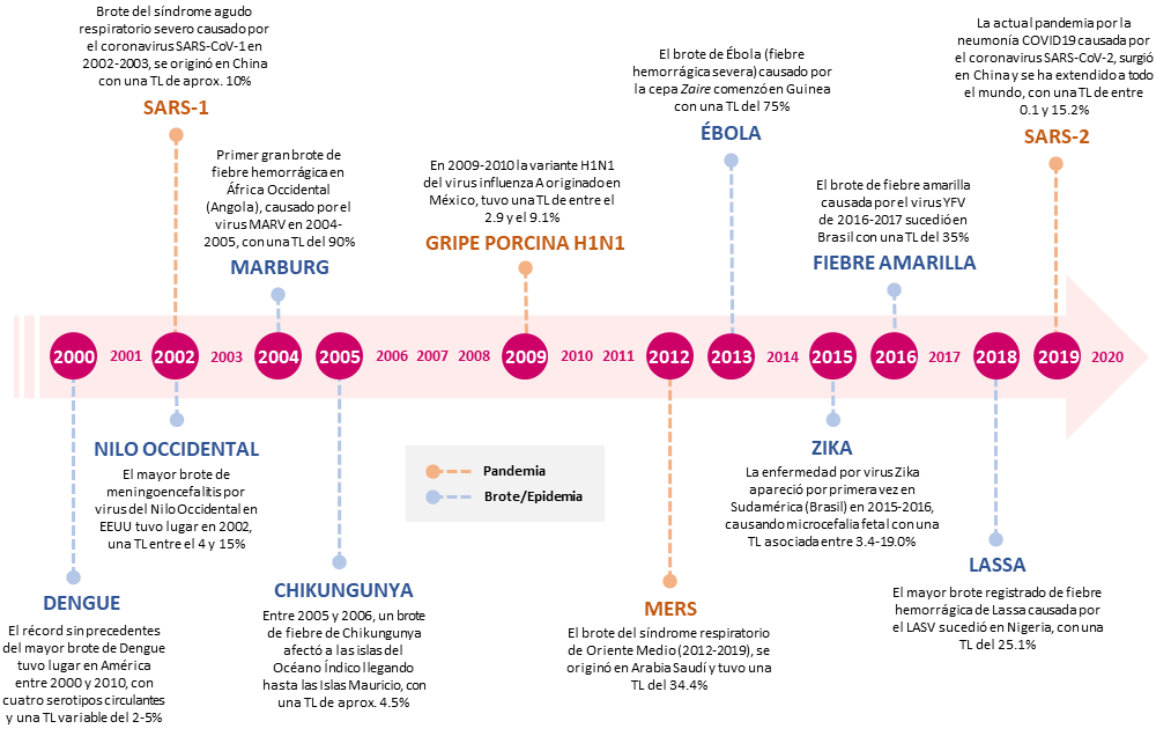


Figura 1. Brotes epidémicos y pandemias causadas por virus emergentes y re-emergentes entre los años 2000 y 2020. *Los años indicados en la línea de tiempo corresponden al momento en el que surgieron los brotes y fueron reportados dentro de un área geográfica determinada. TL, tasa de letalidad; SARS-CoV, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo; MERS-CoV, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio; MARV, virus de Marburgo; YFV, virus de la Fiebre Amarilla; LASV, virus de Lassa. Adaptado de Trovato, M. et al., 2020.*

Los factores a gran escala responsables de la aparición de nuevos virus han sido bien documentados e incluyen el crecimiento de la población humana, el envejecimiento de la población, la globalización, el comercio internacional y el aumento de la frecuencia y el alcance de los viajes, los cambios en los patrones de explotación de la tierra, la urbanización, y el cambio climático (Church, 2004; Heffernan, 2018). Estos factores aumentan las interacciones entre los seres humanos y los huéspedes reservorio, lo que facilita la exposición a los virus zoonóticos, y permiten que los virus emergentes se propaguen más fácilmente entre las poblaciones humanas.

Además, cabe destacar que muchos de los virus emergentes y reemergentes son virus transmitidos por vectores artrópodos o arbovirus (del inglés *arthropod borne virus*). El cambio climático y el calentamiento global han permitido la diseminación de numerosos vectores de arbovirus a nuevas zonas geográficas.

Para los virus del orden *Bunyavirales*, los principales vectores implicados en su propagación son las garrapatas del género *Hyalomma* y los mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Maltezou y Papa, 2010). Las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son las que más se han extendido a nivel global (Carlson *et al.,* 2016; Hafiz *et al.,* 2016; Kraemer *et al.,* 2019). El mosquito *Aedes albopictus* o mosquito tigre es el vector más importante para la transmisión de bunyavirus y otros muchos arbovirus. Se trata de una especie procedente del sudeste asiático que, desde finales de la década de 1970, se ha ido diseminando hasta estar presente en todos los continentes menos en la Antártida. En los últimos diez años, la expansión y distribución de *Aedes Albopictus* en Europa ha sido rápida y constante, desde la península itálica y algunos puntos de la costa mediterránea hacia el interior del continente (Figura 2). En zonas endémicas, este mosquito es transmisor del dengue (DENV) (Jansen y Beebe, 2010); la fiebre amarilla (YFV) (Aitken *et al.,* 1979), la encefalitis por el virus del Nilo Occidental (WNV) (Gratz, 2004), la fiebre de Chikungunya (CHIKV) (Burt *et al.,* 2012) y el virus Zika (ZIKV) (Thangamani *et al.,* 2016).

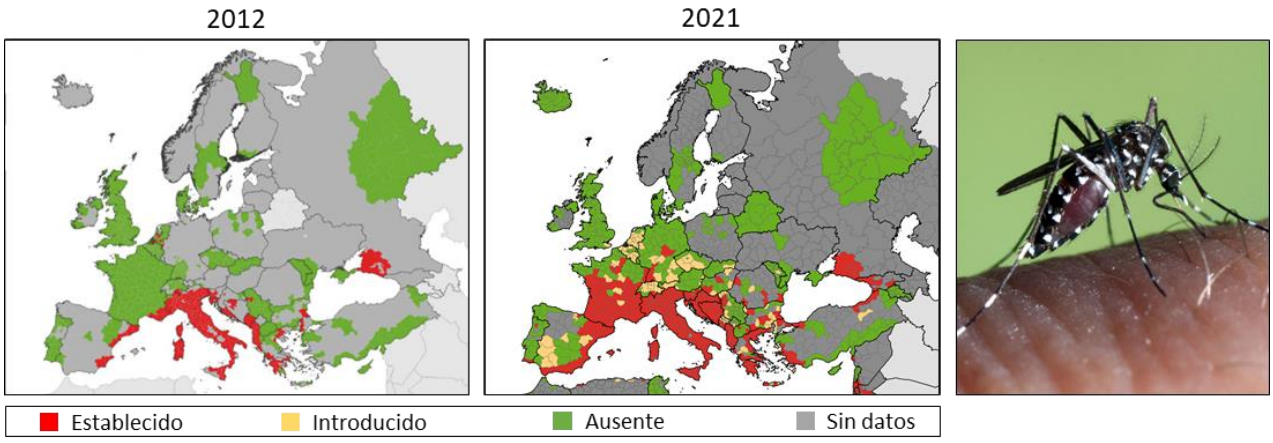


Figura 2. Distribución geográfica del mosquito Aedes albopictus en Europa entre los años 2012 y 2021. *La imagen de la derecha muestra una fotografía de una hembra del mosquito Aedes Albopictus. Las hembras de mosquito son los vectores para la transmisión de muchas enfermedades emergentes, ya que solo las hembras pican a personas y animales por su necesitad de alimentarse de sangre para producir huevos. Mapas obtenidos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades.* *http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/VBORNET_maps.aspx*

A pesar de ser una amenaza constante para humanos, animales y plantas, en la actualidad carecemos de tratamientos contra la mayoría de los virus patógenos. Además, debido a su velocidad de multiplicación y elevada tasa de mutación, los virus RNA tienen la capacidad de desarrollar nuevas variantes resistentes que pueden escapar de las vacunas y tratamientos antivirales que existen en la actualidad, como sucede con el virus de la gripe (To *et al.,* 2015). Todo ello nos lleva a la necesidad urgente de desarrollar nuevos antivirales, preferiblemente de amplio espectro (Howard y Fletcher, 2012; García-Serradilla *et al.,* 2019).

Los antivirales incluyen dos categorías: antivirales que actúan directamente sobre componentes virales o DAAs (del inglés *direct acting antivirales*), y drogas o fármacos que tienen como diana componentes celulares. El desarrollo de DAAs ha sido la estrategia tradicional para el diseño de antivirales. Normalmente los DAAs son muy potentes, pero, debido a que han sido diseñados frente a una diana viral específica, suelen ser eficaces solo frente al virus contra el que han sido diseñados y virus estrechamente relacionados con él (Geraghty *et al.,* 2021). Por otro lado, las moléculas que actúan sobre factores de la célula huésped necesarios para la replicación viral tienen las ventajas de: (1) disminuir la probabilidad de aparición de virus resistentes, y (2) ser potencialmente eficaces contra un mayor número de virus diferentes (Lin y Gallay, 2013; Zeisel *et al.,* 2013). Aunque su principal inconveniente es la posible aparición de efectos secundarios debido al bloqueo de mecanismos celulares.

Una estrategia muy interesante para el desarrollo de antivirales podría ser el reposicionamiento de fármacos, que se basa en la utilización de medicamentos que actualmente se encuentran aprobados para tratar otras patologías. Esta alternativa representa una solución más económica que el desarrollo de moléculas nuevas, y podría acelerar el proceso de obtención de antivirales de amplio espectro (Mercorelli *et al.,* 2018). En la actualidad existen miles de medicamentos que tienen aprobado su uso en humanos, y algunos de estos compuestos ya han mostrado resultados prometedores respecto a su capacidad como antivirales en estudios preclínicos (García-Serradilla, 2019).

2. El orden *Bunyavirales*

En 1975 el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*) creó la familia *Bunyaviridae*, que agrupaba un conjunto de virus relacionados serológicamente, y que presentaban un genoma tripartito formado por RNA de cadena simple y polaridad negativa, incluyéndose en el Grupo V de la Clasificación de Baltimore. Posteriormente, se descubrió que la familia *Bunyaviridae* era polifilética, por lo que en 2016 el ICTV elevó la familia al rango de orden *Bunyavirales* para incorporar el creciente número de virus relacionados y la clasificación de las nuevas familias (Blitvich *et al.,* 2018). Con la última actualización de mayo de 2019, el orden contiene más de 500 especies de virus distintos, agrupadas en 13 familias cuyos virus infectan a una amplia variedad de plantas, protozoos y animales vertebrados e invertebrados (Figura 3).

Entre ellos, cinco familias (*Nairoviridae, Phenuiviridae, Peribunyaviridae, Arenaviridae,* y *Hantaviridae*) contienen patógenos humanos importantes, como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (CCHFV), el virus de la fiebre del valle del Rift

(RVFV), el virus de la encefalitis La Crosse (LACV), el virus del síndrome de trombocitopenia con fiebre severa (SFTSV), el virus Lassa (LASV) o el virus Hantaan (HTNV). No obstante, a pesar de que muchos bunyavirus están clasificados como patógenos emergentes por su incidencia o la ampliación de su distribución geográfica (Walter y Barr, 2011), y de la creciente preocupación por su impacto actual y futuro a nivel global, todavía no hay vacunas ni terapias aprobadas para combatir las infecciones por bunyavirus (Ter Horst *et al.,* 2019).

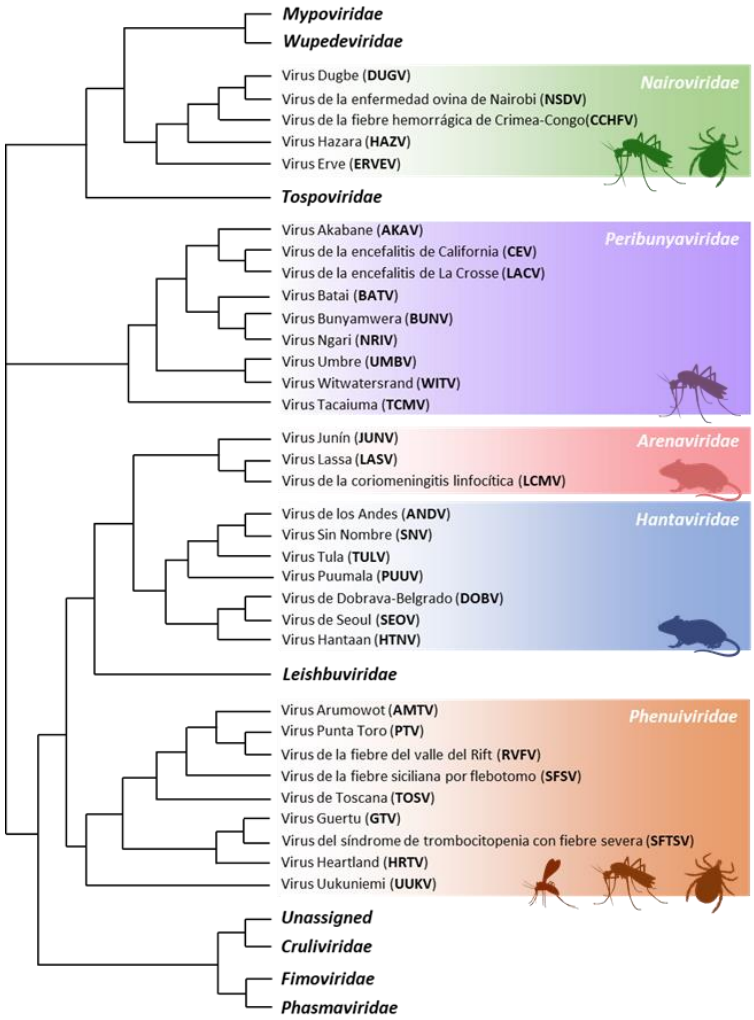


Figura 3. Árbol filogenético del orden Bunyavirales. *El árbol filogenético se construyó utilizando las secuencias de aminoácidos de la nucleoproteína N, obtenidas de la base de datos Genbank. Se muestran los vectores de transmisión específicos para las familias que contienen patógenos humanos importantes: Nairoviridae (mosquitos y garrapatas), Peribunyaviridae (mosquitos), Arenaviridae (roedores); Hantaviridae (roedores), y Phenuiviridae (flebotomos, mosquitos y garrapatas). Las distancias de las ramas del árbol no se han representado a escala. Adaptada de Leventhal, SS. et al., 2021.*

2.1. El virus Bunyamwera

El virus Bunyamwera (BUNV) ha sido el utilizado como modelo de estudio en el presente trabajo. El BUNV fue aislado por primera vez en 1943 a partir de mosquitos del género *Aedes* recolectados en una región deshabitada del bosque Semliki en Uganda (Smithburn *et al.,*

1946). Pertenece a la familia *Peribunyaviridae* dentro del género *Orthobunyavirus*. Da nombre y es el virus prototipo de estudio de esta familia y, en general, de todos los bunyavirus (Eifan y Elliot, 2009). Los *Orthobunyavirus* son arbovirus que se transmiten por la picadura de diferentes especies de mosquitos de la familia *Culicidae*, en concreto pertenecientes a los géneros *Aedes*, *Cullex* y *Anopheles*; y los hospedadores silvestres son pequeños mamíferos como ardillas u otros roedores (Beaty y Bishop, 1988). El BUNV no produce efecto citopático en el mosquito vector, donde causa una infección persistente tras la fase de infección aguda (López-Montero y Risco, 2011). Aunque otros virus de la misma familia son patógenos importantes, el BUNV no causa una enfermedad grave en humanos, sino que produce cuadros de fiebre leve (Sidwell y Smee, 2003).

2.1.1. Estructura y genoma viral

El BUNV es un virus con envuelta lipídica y morfología esférica, con diámetro heterogéneo de entre 80 y 120 nm (Figura 4A-C). En la envuelta se encuentran insertadas las glicoproteínas Gc y Gn (Shi *et al.,* 2007), que interaccionan construyendo las espículas o *spikes* y dan lugar a regiones con simetría icosahédrica (Overby *et al.,* 2008).

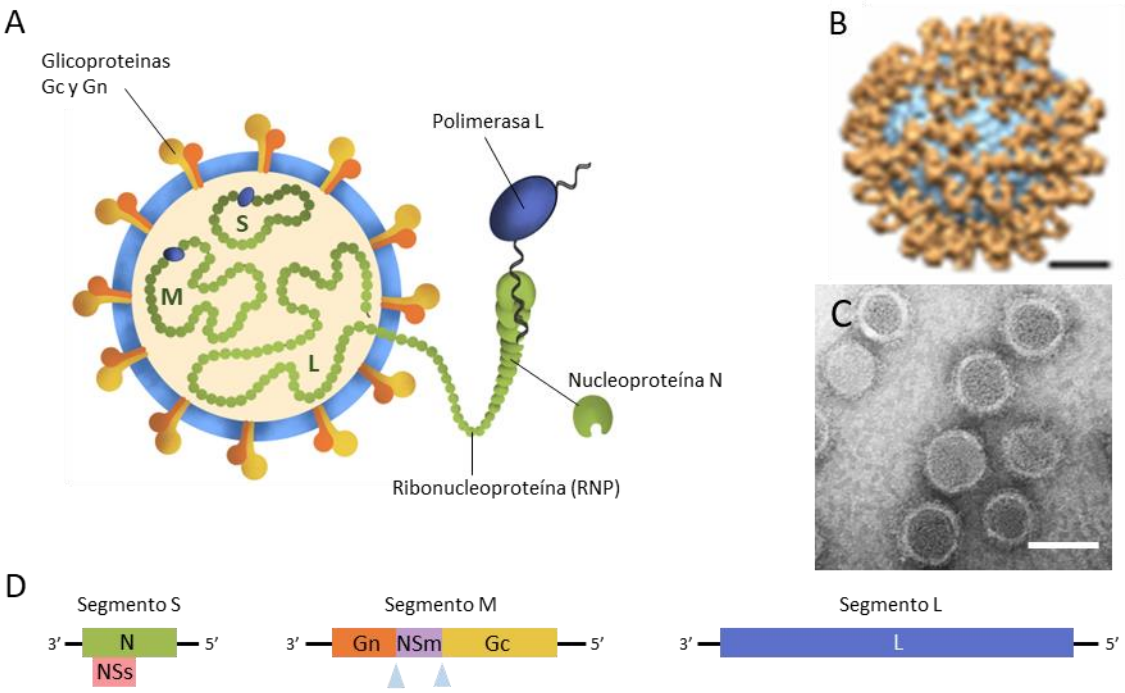


Figura 4. Estructura de las partículas virales, proteínas y genoma del virus BUNV. *(A) Esquema de la estructura de las partículas virales de BUNV, formadas por las glicoproteínas virales, Gc y Gn, insertadas en la envuelta lipídica; la polimerasa, L; las proteínas de la nucleocápsida o nucleoproteína, N, que se unen y protegen el genoma RNA viral formando ribonucleoproteínas o RNPs; y los tres segmentos genómicos S, M y L. (B) Tomografía electrónica y reconstrucción 3D del BUNV. Barra de escala: 25 nm. Obtenido de Bowden et al., 2013. (C) TEM de BUNV purificados. Barra de escala: 100 nm. (D) El genoma del BUNV está compuesto por tres segmentos de (-)ssRNA. El segmento S codifica la proteína de la nucleocápside N y la proteína no estructural NSs; el segmento M codifica las glicoproteínas Gn y Gc. y la proteína no estructural NSm; y el segmento L codifica la polimerasa viral. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html.*

El BUNV contiene un genoma trisegmentado formado por ácido ribonucleico de cadena simple y polaridad negativa o (-)ssRNA (*negative-sense single-stranded RNA*) (Figura 4D). Los tres segmentos génicos del BUNV se denominan L (*large*), M (*medium*) y S (*small*) en función de su longitud y presentan extremos 3' y 5' complementarios, lo que les permite solaparse e interaccionar de forma no covalente generando una estructura circular cerrada (Schmaljohn y Nichol, 2007). Los segmentos de RNA genómico interaccionan con la proteína viral N formando ribonucleoproteínas (RNPs), que adquieren una estructura helicoidal. El segmento L del genoma codifica la polimerasa viral; el segmento M codifica un precursor polipeptídico que posteriormente es procesado en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para dar lugar a las glicoproteínas de la envuelta Gc y Gn, y a la proteína no estructural NSm; y el segmento S codifica para dos marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés '*open reading frames'*) solapantes que dan lugar a la nucleoproteína o proteína N y a la proteína no estructural NSs, respectivamente.

2.1.2. Proteínas virales

a. Polimerasa viral (proteína L)

La polimerasa del BUNV o proteína L es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, *RNA dependent RNA polymerase*). Posee un tamaño de 250 kDa y cumple la función de sintetizar el RNA viral durante los procesos de transcripción y replicación.

En células infectadas tiene una distribución citoplásmica siguiendo un patrón punteado-reticular y se concentra en la zona perinuclear de la célula (Shi y Elliot, 2009). Mediante estudios de fraccionamiento celular y microscopía electrónica se ha comprobado su asociación a membranas intracelulares (Shi y Elliot, 2009; Fontana *et al.,* 2008). La proteína L interacciona con la nucleoproteína N y ambas proteínas colocalizan en células infectadas (Elliot y Blakqori, 2011).

b. Nucleoproteína (proteína N)

La nucleoproteína del BUNV o proteína N tiene un tamaño de 23 kDa, está codificada en el segmento S del genoma viral, es la proteína que se acumula en mayor concentración en el interior de las células infectadas y desempeña un papel multifuncional durante la infección. Su principal cometido es formar las RNPs virales, encapsulando los segmentos del RNA viral genómico y antigenómico para evitar su detección por parte del sistema inmune del huésped y la degradación por las nucleasas celulares (Eifan y Elliot, 2009). La proteína N se une al RNA viral con una estequiometría de 12 nucleótidos por monómero de N (Mohl y Barr, 2009). Puede interaccionar consigo misma para formar oligómeros, con la polimerasa

viral, con los extremos carboxilo terminal de las glicoproteínas Gc y Gn para estabilizar la estructura del virión, y también es capaz de interaccionar con algunas proteínas celulares como la proteína de unión a poli-A (Blakqori *et al.,* 2009). Además, se cree que juega un papel importante en la regulación del cambio de función de la polimerasa L para dar el paso desde la transcripción a la replicación (Eiffan y Elliot, 2009).

c. Glicoproteínas de la envuelta (proteínas Gc y Gn)

Las proteínas virales Gn (31 kDa) y Gc (128 kDa) forman parte de la envuelta viral, son proteínas integrales de membrana de tipo I y se encuentran modificadas por N-glicosilación (Salanueva *et al.,* 2003; Schmaljohn y Nichol, 2007).

En la envuelta viral, las glicoproteínas se distribuyen siguiendo una estructura característica en forma de trípode (Bowde *at al.,* 2013). La unión de Gc y Gn a los receptores de la superficie celular promueve la adhesión y entrada del virus en la célula huésped.

Las proteínas Gc y Gn se sintetizan en el RE a partir de un polipéptido precursor codificado en el segmento M del genoma viral que, por procesamiento proteolítico, da lugar a las dos proteínas de la envuelta y a la proteína no estructural NSm. Gc y Gn forman heterodímeros en el RE (Shi *et al.,* 2005) y, gracias a que Gn contiene una señal de retención en Golgi en su dominio transmembrana (Shi y Elliot, 2007), son transportados a este orgánulo, donde se acumulan y tienen un papel clave en la mediación del ensamblaje de las partículas virales (Schmaljohn y Nichol, 2007).

d. Proteínas no estructurales (proteínas NSs y NSm)

El BUNV codifica en su genoma dos proteínas que no forman parte de la estructura de las partículas virales maduras: NSs y NSm.

La proteína no estructural NSs se encuentra codificada en el segmento S al igual que la proteína N, pero en un ORF solapante distinto. Tiene un tamaño de 13 kDa y presenta una distribución tanto citosólica como nuclear en células infectadas (Weber *et al.,* 2001; Bridgen *et al.,* 2001; Thomas, 2004). NSs no es fundamental para la replicación del BUNV (Bridgen *et al.,* 2001). Su principal función durante la infección es antagonizar la respuesta inmune innata del huésped (Bridgen *et al.,* 2001; Barry *et al.,* 2014; Hong *et al.,* 2019). Se ha descrito que la expresión de NSs de BUNV *in vitro* bloquea la inducción de interferón β (IFN-β) mediada por dsRNA (Thomas *et al.,* 2004). Este proceso se produce a través de la inhibición de la RNA polimerasa II y el bloqueo del proceso de transcripción de las proteínas celulares a través de la interacción con la proteína mediadora MED8 (Léonard *et al.,* 2006). Además, se ha visto que la proteína NSs es capaz de inducir la apoptosis celular en los virus CCHFV

(Barnwal *et al.,* 2016), LACV (Pekosz *et al.,* 1996), hantavirus (Kang *et al.,* 1999; Kohl *et al.,* 2003) y en el virus Schmallenberg (SBV) (Barry *et al.,* 2014).

A diferencia de NSs, la proteína NSm es esencial durante la infección del BUNV. De hecho, no se han conseguido mutantes de deleción total de esta proteína. NSm, se encuentra codificada en el segmento M del genoma viral y tiene un peso molecular de 16-18 kDa (Elliot, 1990). NSm es una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana y dos dominios hidrofílicos (Nakitare y Elliot, 1993). Se ha visto que la proteína NSm del BUNV se acumula en el aparato de Golgi durante la infección, donde interacciona con las proteínas N, Gc y Gn (Shi *et al.,* 2006; Fontana *et al.,* 2008). Actúa como proteína de andamiaje, siendo esencial para la morfogénesis de la factoría viral del BUNV y facilitando el ensamblaje de los virus inmaduros. Posteriormente, durante el proceso de maduración, NSm es degradada de forma que no se encuentra presente en los virus maduros extracelulares (Fontana *et al.,* 2008). La ausencia de NSm en mutantes de BUNV lleva a una pérdida en la estabilidad de los orgánulos de replicación y a la acumulación de partículas virales inmaduras (Fontana *et al.,* 2008).

2.1.3. Ciclo de replicación viral

La adhesión del virus BUNV a la célula huésped y la interacción virus-receptor están mediadas por la glicoproteína Gc en células de mamífero, mientras que Gn lo hace en células de artrópodo (Ludwig *et al.,* 1989; Ludwig *et al.,* 1991; Plassmeyer *et al.,* 2005). No obstante, el receptor específico y otros factores celulares requeridos para la entrada del virus en la célula todavía no han sido identificados para el BUNV. A continuación, tiene lugar la internalización de la partícula viral mediante endocitosis (Lozach *et al.,* 2011; Cifuentes-Munoz *et al.,* 2014); y la liberación de las RNPs y polimerasas virales al citoplasma, que se produce debido a la fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma, inducida por acidificación de su pH interno (Santos *et al.,* 2008). En la Figura 5A se representa un esquema del ciclo de replicación del BUNV.

El primer evento después de la liberación de las RNPs virales al citoplasma es la transcripción primaria, que implica la síntesis de los mRNAs virales. Los cebadores necesarios para esta transcripción primaria se obtienen por acción de la polimerasa L, que presenta un dominio endonucleasa en su extremo N terminal que procesa los extremos 5' cap de los mRNAs celulares para obtener fragmentos de entre 12 y 18 nucleótidos que servirán de cebadores para la transcripción (Jin y Elliot, 1993). Los mRNAs virales no contienen colas de poliA sino que los extremos 3' poseen la capacidad de formar estructuras tallo-bucle, que permiten que la traducción posterior sea independiente de la proteína de

unión a poliA. Los mRNAs de los segmentos L y S son traducidos por los ribosomas libres del citoplasma, mientras que el segmento M es traducido por ribosomas unidos al RE.

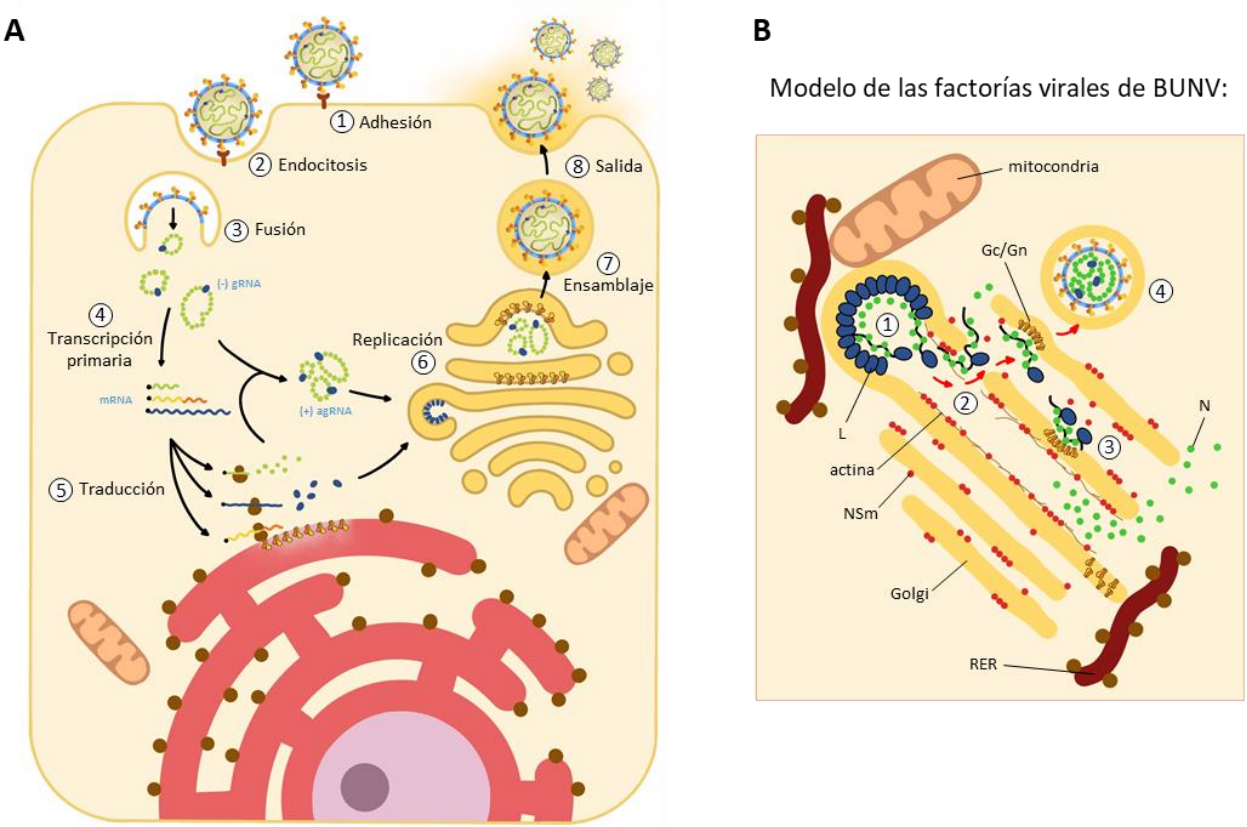


***Figura 5. [A] Modelo del ciclo de replicación viral del BUNV**. (1-2) La entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor. (3) Las vRNPs y las polimerasas virales A se liberan al citoplasma por acidificación del pH de los endosomas tardíos. (4) Las polimerasas virales catalizan la transcripción primaria de los mRNAs virales; que son traducidos (5) en ribosomas libres (segmentos L y S) o asociados al RER (segmento M). Las glicoproteínas Gn y Gc dimerizan en el RE y son transportadas al aparto de Golgi. Los orgánulos de replicación (ORs) derivan del aparato de Golgi. (6) La replicación del genoma viral tiene lugar en los dominios globulares de los ORs. (7) Las vRNPs de reciente síntesis interaccionan con los dímeros Gc-Gn en los sitios de ensamblaje. (8) Los virus son transportados en vesículas de secreción hasta la membrana plasmática para ser liberados. Modificado de Walter y Barr, 2011. **[B] Estructura y función de los complejos replicativos en la factoría del virus BUNV en células de mamífero.** (1) La síntesis del gRNA viral y la formación de las vRNPs tiene lugar en las esférulas o dominios globulares de los ORs, donde se acumula la polimerasa L; (2) las vRNPs se transportan a los sitios de ensamblaje, este transporte podría estar mediado por el complejo actina-miosina; (3) en las membranas de Golgi modificadas por la inserción de los dímeros Gc-Gn se forman los arcos de maduración, donde se ensamblan los nuevos virus; (4) las partículas virales terminan su maduración en dos etapas: en el compartimento trans-Golgi, y tras salir de la célula. L, polimerasa viral; N, nucleocápsida; Gc/Gn, glicoproteínas virales; NSm, proteína no estructural codificada por el segmento M; RER, retículo endoplasmático rugoso. gRNA, RNA genómico viral; vRNP, ribonucleoproteína viral; Modificado de Fontana et al., 2008.*

Para la replicación, en primer lugar, se necesita un molde de polaridad positiva o RNA antigenómico (agRNA), que también es sintetizado por la propia polimerasa L a partir del genoma viral de sentido negativo y de manera independiente de cebadores. Las bases moleculares del cambio de función de la polimerasa para pasar de la transcripción a la replicación todavía se desconocen, pero se ha descrito que en este proceso podrían estar implicados: (1) el cambio de localización de la polimerasa: mientras que la transcripción es citosólica, la replicación tiene lugar en las membranas del aparato de Golgi; (2) la concentración intracelular de la proteína N, que debe estar disponible en una concentración

suficientemente elevada para encapsular los RNAs genómicos y antigenómicos; y (3) se ha propuesto que pueden existir diferentes formas de la polimerasa, modificadas por asociación con distintos factores celulares, para llevar a cabo estos dos procesos diferentes.

Las glicoproteínas virales Gc y Gn, sintetizadas en el RE se dirigen al aparato de Golgi y se acumulan en él. Las RNPs virales de reciente síntesis se transportan desde los complejos replicativos hasta las regiones del Golgi donde tiene lugar el ensamblaje viral. La interacción directa entre las colas citoplasmáticas (C terminal) de las glicoproteínas y las RNPs son necesarias para el *budding* o gemación viral. Los virus recién ensamblados experimentan una primera etapa de maduración en el compartimento trans-Golgi, donde las proteínas Gc y Gn adquieren sus glicosilaciones características (Novoa *et al.,* 2005a). Finalmente, los viriones recién ensamblados se transportan a la superficie celular a través de la ruta exocítica. Después de la liberación del virus, se produce un último paso de maduración, durante el cual los trímeros de Gc/Gn se vuelven más definidos y las partículas virales se convierten en infectivas (Novoa *et al.,* 2005a; Bowden *et al.,* 2013).

2.1.4. Ensamblaje y morfogénesis de la factoría viral

En la mayoría de los virus RNA, los procesos de replicación y ensamblaje de la progenie viral se encuentran confinados en compartimentos intracelulares específicos denominados factorías o inclusiones virales. De esta forma, los virus concentran todos los elementos necesarios para replicarse en una zona concreta de la célula y consiguen una propagación más rápida y eficiente. La formación de estas estructuras especializadas en la replicación viral requiere la reorganización del citoesqueleto y los orgánulos membranosos celulares. Esto implica una interacción dinámica entre los componentes del virus y de la célula huésped. De este modo, las polimerasas y otras proteínas virales interaccionan con diferentes factores y membranas celulares donde ensamblan sus complejos replicativos o CRs (Novoa *et al.,* 2005a; Miller y Krijnse-Locker, 2008). Los CRs se forman, por tanto, a partir de orgánulos celulares que han sido modificados y pasan a denominarse orgánulos de replicación. A su vez, estos son englobados dentro de la factoría viral. Por tanto, las factorías virales pueden estar constituidas por varios orgánulos de replicación y distintos elementos celulares.

Nuestro laboratorio ha caracterizado la estructura y función de la factoría viral del BUNV en diferentes modelos celulares (Salanueva *et al.,* 2003; Novoa *et al.,* 2005b; Fontana *et al.,* 2008; López-Montero y Risco, 2011; Fernández de Castro y Risco, 2014; García-Serradilla y Risco, 2021). Durante la infección se produce un reclutamiento de orgánulos alrededor del aparato de Golgi, concretamente mitocondrias y retículo endoplásmico

rugoso (RER), para formar la factoría viral. Dentro de las factorías virales, se ensamblan los complejos replicativos del BUNV, pudiéndose observar unas estructuras características con dos partes bien diferenciadas: un dominio globular o esférula y un dominio tubular (Salanueva *et al.,* 2003). Estos complejos replicativos se forman a partir de las membranas del aparato del Golgi y frecuentemente están abiertos al citoplasma. Se ha propuesto un modelo en el que las RNPs virales son transportadas desde los sitios de replicación en los dominios globulares hasta los sitios de ensamblaje en las membranas del Golgi modificadas por la inserción y acumulación de las glicoproteínas Gc y Gn, donde tiene lugar la formación de partículas virales mediante gemación o *budding* (Fontana *et al.,* 2008). Posteriormente, las vesículas que contienen las partículas virales son transportadas hasta la membrana plasmática a través de la ruta exocítica. Además, se ha visto que los viriones de la progenie se encuentran asociados con los haces de filamentos de actina, que podrían estar involucrados en la salida del BUNV y en el transporte del virus a las células vecinas no infectadas (Sanz-Sanchez y Risco, 2013). En la Figura 5B se puede observar un esquema de este modelo.

3. Lípidos y virus

Tradicionalmente, las interacciones virus-célula huésped se han estudiado desde el punto de vista de las proteínas y ácidos nucleicos implicados en la infección. No obstante, el estudio de la composición lipídica ha ganado importancia recientemente convirtiéndose en un campo de investigación prometedor, ya que muchos virus manipulan el metabolismo y el flujo de lípidos para inducir la síntesis de nuevas membranas o reorganizar las membranas preexistentes para construir sus factorías virales (Toledo y Benach, 2015; van der Schaar *et al.,* 2016; Fernández-Oliva *et al.,* 2021).

La replicación del genoma viral asociada a membranas tiene importantes ventajas: (1) restringir el movimiento molecular a dos dimensiones, concentrando y favoreciendo la interacción de las proteínas implicadas en la replicación; (2) algunas polimerasas virales dependen de la unión a lípidos de membrana específicos para activarse; y (3) proteger la maquinaria viral de la detección por los mecanismos de inmunidad innata intracelular (Altan-Bonet, 2017).

Los virus son capaces de actuar sobre el flujo de lípidos mediante tres mecanismos diferentes: la translocación y/o regulación de las enzimas de la biosíntesis de lípidos, la interferencia en la señalización mediada por lípidos, y la regulación del transporte de lípidos

en los sitios de contacto entre membranas. En la Figura 6 se recogen algunos de estos mecanismos sobre los que pueden interferir diferentes virus durante la infección.

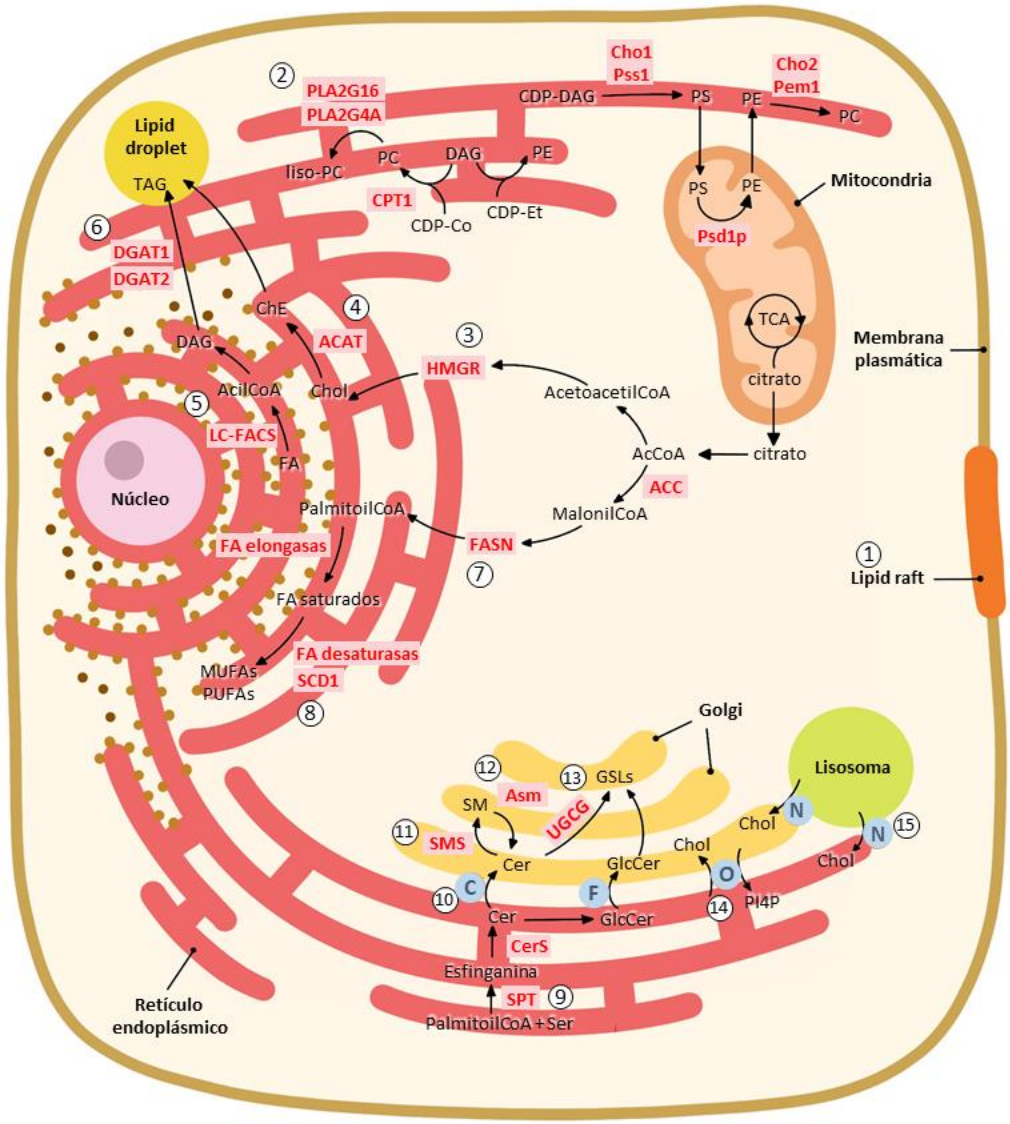


Figura 6. Esquema de las vías de transporte y síntesis de lípidos del hospedador utilizadas por virus. *(1) La alteración de los lipid rafts afecta el ciclo vital de diferentes virus como el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1), el virus de la influenza A, el virus de la parainfluenza bovina y el virus respiratorio sincitial (SRV). (2) La inhibición de la fosfolipasa PLA2G4A altera la replicación del virus de la hepatitis C (HCV). (3) La inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa por las estatinas interfiere con la infección de muchos virus como el WNV, el virus del dengue (DENV) o el virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV). (4) LA inhibición de la acil-CoA:colesterol-aciltransferasa (ACAT) bloquea la infección del HCV. (5 y 6) La inhibición de dos pasos diferentes de la síntesis de triglicéridos (TAG) altera el ensamblaje del HCV. (7) Cuando se inhibe la ácido graso-sintasa (FASN) por C75 o cerulenina, se bloquea la replicación de los virus WNV, Usutu, DENV y virus Flock House. (8) La inhibición de la estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1) disminuye la infectividad del HCV y el DENV. (9) El bloqueo de la síntesis de ceramida (Cer) afecta la replicación de virus como el WNV, el HCV y el virus de la hepatitis B. (10) La inhibición de la proteína transportadora de ceramidas (CERT) altera la liberación de partículas del HCV. (11) La inhibición de la esfingomielina (SM) sintasa altera el ciclo vital del HCV. (13) La replicación del HCV disminuye cuando se trata con inhibidores sintéticos de uridina difosfato-glucosa ceramida sintasa (UGCG). (14) La inhibición de la proteína de unión a oxiesterol (OSBP, O) altera la replicación del enterovirus, el virus de la encefalomiocarditis y el HCV. (15) La inhibición de la proteína Niemann-Pick tipo C1 (NPC1, N) impide la entrada del virus del Ébola y otros filovirus debido a que NPC1 es el receptor celular específico para estos virus; además, la inhibición del transporte de colesterol mediado por NPC1 altera la replicación de los virus DENV, HEV, HCV e impide la correcta salida de reovirus de los endosomas tardíos durante las primeras etapas de infección. Modificado de Fernández-Oliva, A. et al. 2018.*

3.1. Traslocación y regulación de enzimas de la biosíntesis de lípidos

Los avances técnicos en el campo de la espectrometría de masas han hecho posible el desarrollo de la lipidómica, que permite la identificación y cuantificación de los cambios en la composición lipídica celular y del propio lipidoma de los virus con envuelta, revelando alteraciones complejas del metabolismo lipídico durante las infecciones virales.

3.1.1. Regulación de la síntesis de glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos o GPLs son los componentes principales de las membranas biológicas. Su estructura consiste en una cabeza polar, que les confiere sus propiedades químicas y se emplea para agruparlos en las distintas categorías: PC, fosfatidil colina; PS, fosfatidil serina; PE, fosfatidil etanolamina; PI, fosfatidil inositol; y dos cadenas acílicas hidrofóbicas o cadenas de ácidos grasos (FA, *fatty acids*). El paso limitante en la biosíntesis de GPLs es la síntesis de FAs por la enzima ácido graso-sintasa (FASN).

El nivel de empaquetamiento y la fluidez de las membranas dependen en gran medida del grado de saturación y de la longitud de las cadenas acílicas de los GPLs. Las cadenas acílicas con mayor número de insaturaciones (dobles enlaces) hacen que la membrana sea más fluida. La estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1) es la enzima limitante en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de sus precursores saturados. Los inhibidores sintéticos que bloquean específicamente la SCD1, como el A939572, han demostrado inhibir eficazmente la infección del virus de la hepatitis C (HCV) y del virus Dengue (DENV) en cultivos celulares (Gullberg *et al.,* 2018; Nguyen *et al.,* 2014).

Dentro de los GPLs, la PC es el más abundante en la célula. Se ha observado que la síntesis global de PC se incrementa significativamente durante la infección de muchos virus (+)ssRNA como el DENV, el virus Flock House (FHV), el poliovirus y el HCV (Castorena *et al.,* 2010; Vance *et al.,* 1980; Zhang *et al.,* 2016).

Además, se ha visto que muchos virus RNA con envuelta incluyendo el virus del Nilo Occidental (WNV), el DENV, el virus de Chikungunya (CHIKV), el virus Ébola (EBV), el virus de la fiebre de Lassa (LASV), y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y algunos virus DNA como el virus vaccinia, presentan PS en su envuelta lipídica. La PS generalmente se orienta hacia el lado citosólico de la membrana plasmática, pero en situaciones de estrés celular (como sucede durante la apoptosis, el cáncer y en células infectadas) se expone en la superficie externa, sirviendo como un marcador de alerta para que el sistema inmunológico las detecte (Birge *et al.,* 2016). Las envueltas virales enriquecidas en PS son reconocidas por los receptores de PS de la superficie celular, que median la captación del

virus a través de un proceso conocido como mimetismo de apoptosis viral (Amara y Mercer, 2015).

3.1.2. Regulación de los lipid rafts *y la síntesis de colesterol*

El contenido en colesterol (Chol) y esfingolípidos (SLs) en las membranas define importantes propiedades físicas y biológicas. Estos lípidos no se distribuyen homogéneamente dentro de las membranas biológicas, sino que forman dominios resistentes a detergentes, balsas lipídicas o *lipid rafts*, que participan en el tráfico de membranas y la señalización celular.

El colesterol es un componente con un papel crítico que determina la fluidez de membrana debido a que estabiliza la curvatura y los defectos de empaquetamiento, y regula la formación y función de los complejos lípido-proteína unidos a las membranas. Los virus aprovechan estas propiedades para crear plataformas especializadas en la replicación del RNA viral y el ensamblaje de nuevos virus.

Se ha observado la acumulación de colesterol en los complejos replicativos de poliovirus, rinovirus y Coxsackievirus B3 (Hsu *et al.,* 2010; Ilnytska *et al.,* 2013; Roulin *et al.,* 2014). Además, para facilitar la replicación del genoma viral, el WNV modula la homeostasis del colesterol del hospedador redistribuyendo las enzimas que sintetizan el colesterol a los sitios de replicación (Mackenzie *et al.,* 2007). También se cree que las membranas cúbicas nanoperiódicas altamente curvadas, observadas por microscopía electrónica en células infectadas por varios virus (+)ssRNA pertenecientes a las familias *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae* y *Flaviviridae*, están relacionadas con cambios en el metabolismo celular del colesterol a través de la activación de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa o HMGR (Deng *et al.,* 2010), principal enzima implicada en la biosíntesis del colesterol.

Por todo ello, muchos virus son sensibles a las estatinas, inhibidores específicos de la HMGCR. Por ejemplo, el WNV y el DENV son inhibidos por lovastatina (Mackenzie *et al.,* 2007; Rothwell *et al.,* 2009; Sharma *et al.,* 2010; Soto-Acosta *et al.,* 2017), y el DENV y el HIV-1 por la simvastatina (Bryan-Marrugo *et al.,* 2016; DeLucia *et al.,* 2018). El HCV también es sensible a diferentes estatinas (Amemiya *et al.,* 2008; Kim *et al.,* 2007; Rao y Pandya, 2011).

Además, la depleción del colesterol de la membrana plasmática mediante el tratamiento con metil-β-ciclodextrina (MβCD) en cultivos celulares, disminuye la infectividad del virus de la enfermedad de Newcastle, el WNV, y el HCV, principalmente

mediante el bloqueo de la entrada del virus en las células (Kapadia *et al.,* 2007; Li *et al.,* 2017; Mackenzie *et al.,* 2007; Martin *et al.,* 2012).

3.1.3. Regulación de la síntesis de esfingolípidos

Estudios de lipidómica han demostrado un aumento en el contenido de ceramida (Cer) y esfingomielina (SM) en células infectadas con flavivirus. En concreto, se ha visto que el incremento en los niveles de Cer celular y el enriquecimiento en SM en los complejos replicativos son específicos de la infección por el virus WNV y otros virus relacionados filogenéticamente con él, como el DENV y el HCV (Martin-Acebes *et al.,* 2016).

La RdRp del virus HCV se activa mediante unión a SM, siendo necesaria la interacción de 20 moléculas de SM con un dominio de unión específico en la estructura de la polimerasa para que cambie la conformación de su bolsillo catalítico y se inicie la replicación del RNA viral (Weng *et al.,* 2010).

La inhibición de diferentes enzimas que median la biosíntesis de SLs disminuye la infectividad de diferentes virus. Se han descrito tres inhibidores de la serina palmitoil-transferasa: el ISP-1, la miriocina y el NA255, que presentan actividad antiviral contra el HCV, el HBV y el WNV (Aizaki *et al.,* 2008; Aktepe *et al.,* 2015; Amemiya *et al.,* 2008; Sakamoto *et al.,* 2005; Tatematsu *et al.,* 2011; Weng *et al.,* 2010). La inhibición farmacológica de la SM sintasa y la inhibición de la uridina difosfato-glucosa ceramida sintasa reducen la infectividad del HCV y el WNV, respectivamente (Khan *et al.,* 2014; Martin-Acebes *et al.,* 2016). Además, la inhibición de la ceramida sintasa también altera la replicación del WNV (Aktepe *et al.,* 2015). Como puede observarse, los virus de la familia *Flaviviridae* son los más sensibles al bloqueo de la biosíntesis de SLs.

3.2. Interferencia en la señalización mediada por lípidos.

El fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) desempeña un papel regulador clave para una amplia variedad de actividades celulares, incluyendo el tráfico y la biogénesis de membranas, a través del reclutamiento de proteínas efectoras relacionadas con la biosíntesis y el transporte de lípidos. El principal *pool* celular de PI4P se sintetiza en las membranas del aparato de Golgi por las PI4-quinasas tipo 3 (PI4KIII), de las que pueden distinguirse dos isoformas distintas: PI4PIIIα y PI4PIIIβ.

Muchos virus aprovechan las quinasas PI4KIII de la célula huésped. El HCV, algunos enterovirus y los picornavirus estimulan las PI4KIIIs para incrementar los niveles de PI4P en los sitios de replicación. Este aumento local de PI4P tiene un impacto significativo en la remodelación de la membrana, el ensamblaje de los complejos replicativos y la replicación

del genoma viral. La proteína no estructural NS5A del HCV y la proteína no estructural 3A del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) reclutan y activan la PI4KIIIα (Dorobantu *et al.,* 2015), mientras que los enterovirus reclutan la isoforma PI4KIIIβ a los complejos replicativos a través de la proteína no estructural 3A (Hsu *et al.,* 2010).

La molécula pequeña PIK93 inhibe las dos isoformas PI4KIIIβ y PI4PIIIα, y se ha comprobado su eficacia contra los enterovirus, incluidos los poliovirus y Coxsackievirus B3, los rinovirus humanos (Arita, 2014; Arita *et al.,* 2011; Roulin *et al.,* 2014) y el HCV (Hsu *et al.,* 2010). Además, la PI4KIIIβ es una diana específica de algunos inhibidores de proteínas quinasas, como la enviroxima y sus derivados, que tienen actividad antiviral frente a poliovirus y enterovirus (Arita *et al.,* 2011; Roulin *et al.,* 2014). Por otro lado, la inhibición farmacológica de PI4KIIIα disminuye la infectividad del virus Saffold 3, el EMCV y el HCV (Dorobantu *et al.,* 2015).

3.3. Interferencia en el tráfico de lípidos en los sitios de contacto entre membranas

Aunque las proteínas de membrana se distribuyen desde el RE hasta su localización final a través del transporte vesicular de la vía secretora, para muchos lípidos existe un modo de transporte no vesicular alternativo que está mediado por las proteínas transportadoras de lípidos o LTPs (*lipid transfer proteins*). Las LTPs permiten generar un enriquecimiento local de ciertos lípidos en la composición de las membranas de una forma más rápida. Además, aseguran el suministro de lípidos a los orgánulos celulares fuera de la vía secretora, como las mitocondrias.

Debido a que los lípidos son insolubles en agua, las LTPs poseen un bolsillo hidrofóbico que recoge el cargo lipídico y lo mantiene separado del medio acuoso citoplasmático. Las LTPs se localizan en los denominados sitios de contacto entre membranas o MCS (*membrane contact sites*), que son zonas en las que dos membranas se encuentran separadas alrededor de 30 nm (Wong *et al.,* 2017). Algunos virus animales secuestran determinadas LTPs que transportan colesterol y SLs durante la infección, entre las que destacan las siguientes:

1. La **proteína de unión a oxiesterol** (**OSBP**): intercambia PI4P y colesterol en los MCS entre el aparato de Golgi y el RE. El transporte de colesterol por OSBP depende en gran medida de la actividad de la quinasa PI4KIII y los niveles de PI4P en las membranas de Golgi. El PI4P sirven como un ancla para OSBP, que impulsa el transporte y la acumulación de colesterol en el aparato de Golgi. Diferentes virus pertenecientes a la familia Picornaviridae como los enterovirus, los poliovirus y el EMCV, así como el HCV, otro virus (+)ssRNA no relacionado, utilizan la vía denominada PI4KIII-PI4P-OSBP

(Arita, 2014; van der Schaar *et al.,* 2016). Los fármacos itraconazol, OSW-1 y TTP-8307 son inhibidores específicos de OSBP y su actividad antiviral se ha probado con éxito contra enterovirus, EMCV y HCV (Albulescu *et al.,* 2015; Albulescu *et al.,* 2017; Strating *et al.,* 2015; Wang *et al.,* 2014).

2. La **proteína de transferencia de ceramidas** (**CERT**) y la **proteína adaptadora de cuatro fosfatos 2** (**FAPP2**): median el tráfico de precursores de SLs. Debido a que estas LTPs acumulan potencialmente SLs en los sitios de replicación, son buenos objetivos para interferir con los flavivirus. CERT es responsable de transferir ceramidas desde el ER al Golgi, donde tiene lugar la síntesis de SL complejos (Hanada *et al.,* 2003). CERT es necesaria para la salida del HCV (Bishe *et al.,* 2012), y su inhibición farmacológica con el compuesto sintético HPA-12 afecta drásticamente la liberación del HCV (Aizaki *et al.,* 2008; Yasuda *et al.,* 2001).

   FAPP2 se une al Golgi a través de PI4P y transporta glucosilceramida a este orgánulo (Godi *et al.,* 2004). FAPP2 se ha localizado en los sitios de replicación del HCV y media la acumulación de lactosilceramida en sus complejos replicativos. El agotamiento de FAPP2 altera los complejos de replicación del HCV y altera la replicación de este virus (Khan *et al.,* 2014).

3. La **proteína Niemann-Pick tipo C1** (**NPC1**): se localiza en endosomas tardíos y, de forma transitoria, en lisosomas y Golgi. Actúa en conjunto con NPC2 para transportar colesterol de origen extracelular o de reciclaje desde el sistema endo-lisosomal hasta el trans-Golgi y el RE (Ioannou, 2000). NPC1 es el receptor celular del virus del Ébola, el virus de Marburg y otros filovirus (Carette *et al.,* 2011). El compuesto U18666A se ha desarrollado como un inhibidor específico de NPC1 (Lu *et al.,* 2015). La administración de U18666A induce la acumulación de colesterol en endosomas y lisosomas e inhibe la entrada y la infección del virus del Ébola (Shoemaker *et al.,* 2013). Pero este compuesto también afecta la replicación de otros virus RNA cuyo receptor no es NPC1, como el DENV (Poh *et al.,* 2012) y el virus de la hepatitis E (Yin *et al.,* 2016), por lo que en estos casos el efecto de U19666A deber ser en un paso posterior a la entrada. En el caso del HCV, que utiliza la vía secretora para salir de la célula huésped, el U18666A bloquea la liberación de partículas virales, inhibiendo el transporte y la funcionalidad de los cuerpos multivesiculares, y produce una acumulación de partículas virales maduras en los exosomas (Elgner *et al.,* 2016). Además, recientemente se ha visto que el transporte de colesterol mediado por NPC1 es imprescindible para que los *cores* de reovirus se puedan liberar de los endosomas tardíos al citoplasma durante las primeras etapas de la infección (Ortega-González *et al.,* 2022).

4. Mitocondrias y virus

Las mitocondrias, además de ser los orgánulos encargados de producir la mayor parte de la energía química celular en forma de ATP, están implicadas en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la inmunidad innata, la autofagia, la señalización redox, la homeostasis del calcio y la respuesta ante estímulos de estrés (Kluge *et al.,* 2013). Sus funciones integrales en la bioenergética celular, así como su papel en los procesos de señalización, metabolismo y respuesta inmune intracelular convierten a las mitocondrias en orgánulos claves en la patogénesis viral.

Las mitocondrias se encuentran estructural y funcionalmente compartimentadas mediante dos membranas. La membrana mitocondrial externa (MME) controla la importación de proteínas al interior de las mitocondrias, así como varias rutas de señalización, incluyendo la activación de la respuesta inmune intracelular (Giacomello *et al.,* 2020; Tiku *et al.,* 2020). Por otro lado, en las invaginaciones de la membrana mitocondrial interna (MMI) o crestas mitocondriales se ubican las enzimas de la cadena de transporte de electrones (CTE), que generan el gradiente electroquímico y el potencial de membrana necesarios para la producción del ATP en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (*Gilkerson et al., 2003*; Zorova *et al.,* 2018). Además de su rol funcional, la MME y la MMI definen dos compartimentos solubles: el especio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial. El EIM contiene proteínas implicadas en la apoptosis celular y el metabolismo de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS) (Herrmann y Riemer, 2010). La matriz contiene el DNA mitocondrial (mtDNA) y en ella suceden importantes reacciones metabólicas, como el ciclo de Krebs y la β-oxidación de ácidos grasos (Spinelli y Haigis, 2018; Yan *et al.,* 2019).

4.1. Dinámica mitocondrial y mitofagia

A pesar de que tradicionalmente se describían como orgánulos estáticos y aislados, las mitocondrias constituyen una población muy dinámica. Las mitocondrias de células sanas tienen una morfología en forma de red o *network*, que se encuentra en constante reorganización en respuesta a cambios metabólicos o situaciones de estrés, como pueden ser las infecciones virales (Khan *et al.,* 2015).

La homeostasis mitocondrial se mantiene mediante dos mecanismos estrechamente interrelacionados: la dinámica mitocondrial, que comprende los procesos de fusión y fisión mitocondrial, y la mitofagia (Twig y Shirihai, 2011). La fisión mitocondrial está implicada en la clasificación y segregación de las mitocondrias con copias de mtDNA defectuoso, con mutaciones (Suen *et al.,* 2010); mientras que la fusión es una ruta por la cual las

mitocondrias intercambian y equilibran rápidamente los metabolitos de la matriz, las copias intactas del mtDNA y los componentes de la membrana mitocondrial. Al fusionarse una mitocondria parcialmente deteriorada con una red mitocondrial tubular sana, se puede aliviar el daño mitocondrial mediante el intercambio de proteínas de la matriz. El potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) juega un papel importante en el proceso de clasificación y segregación de mitocondrias defectuosas (Mattenberger *et al.,* 2003). Las mitocondrias que están altamente despolarizadas y cuyo ΔΨm es irreparable se destinan a formar un grupo pre-mitofágico y, posteriormente, son eliminadas por mitofagia. Si el ΔΨm es reversible, las mitocondrias segregadas pueden repararse por fusión con otras mitocondrias y rescatarse de los complejos pre-mitofágicos.

4.2. Maquinaria de fusión y fisión mitocondrial

La dinámica mitocondrial está coordinada por GTPasas de la familia de las dinaminas, enzimas capaces de polimerizar y remodelar mecánicamente las membranas utilizando la energía procedente de la hidrólisis de GTP.

4.2.1. Proteínas de fusión

La fusión mitocondrial implica la fusión de las membranas mitocondriales externa e interna y la consiguiente mezcla del contenido de la matriz mitocondrial. En mamíferos, es un proceso secuencial de varios pasos (Song *et al.,* 2009). En primer lugar, las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1, Mfn2) coordinan la fusión de la MME (Santel y Fuller, 2001). Las mitofusinas en la superficie de las dos mitocondrias adyacentes dimerizan, acercando las membranas opuestas y promoviendo su fusión (Chen *et al.,* 2003). A continuación, se produce la fusión de la MMI dirigida por la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) (Misaka *et al.,* 2002). Además de su implicación en la fusión mitocondrial, OPA1 cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la morfología de las crestas mitocondriales, la bioenergética mitocondrial y la regulación de la apoptosis (Chen y Chan, 2009; Chan, 2012).

4.2.2. Proteínas de fisión

La principal molécula implicada en la fisión mitocondrial es la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1), que se localiza mayoritariamente en el citosol en su forma fosforilada. En células de mamífero, las proteínas accesorias Mid49, Mid51 y el factor de fisión 1 (Fis1) actúan como ligandos de Drp1 y median su desfosforilación y reclutamiento a la superficie de las mitocondrias (Loson *et al.,* 2013). Una vez reclutada, Drp1 oligomeriza en forma de anillos alrededor de los túbulos mitocondriales y produce la escisión tanto de la MME como de la MMI (Palmer *et al.,* 2011). El conocimiento actual del mecanismo de fisión

mitocondrial es incompleto, pero algunos estudios sugieren que los túbulos del RE envuelven y contraen las mitocondrias marcándolas para su posterior escisión por Drp1 (Giacomello *et al.,* 2020). Curiosamente, la constricción de las mitocondrias en los sitios de contacto con el RE también se ha observado en células con las proteínas Drp1 y Fis1 deplecionadas, lo que sugiere que la señalización para la división mitocondrial mediada por el RE ocurre como un paso previo e independiente del reclutamiento de Drp1 (Friedman *et al.,* 2011).

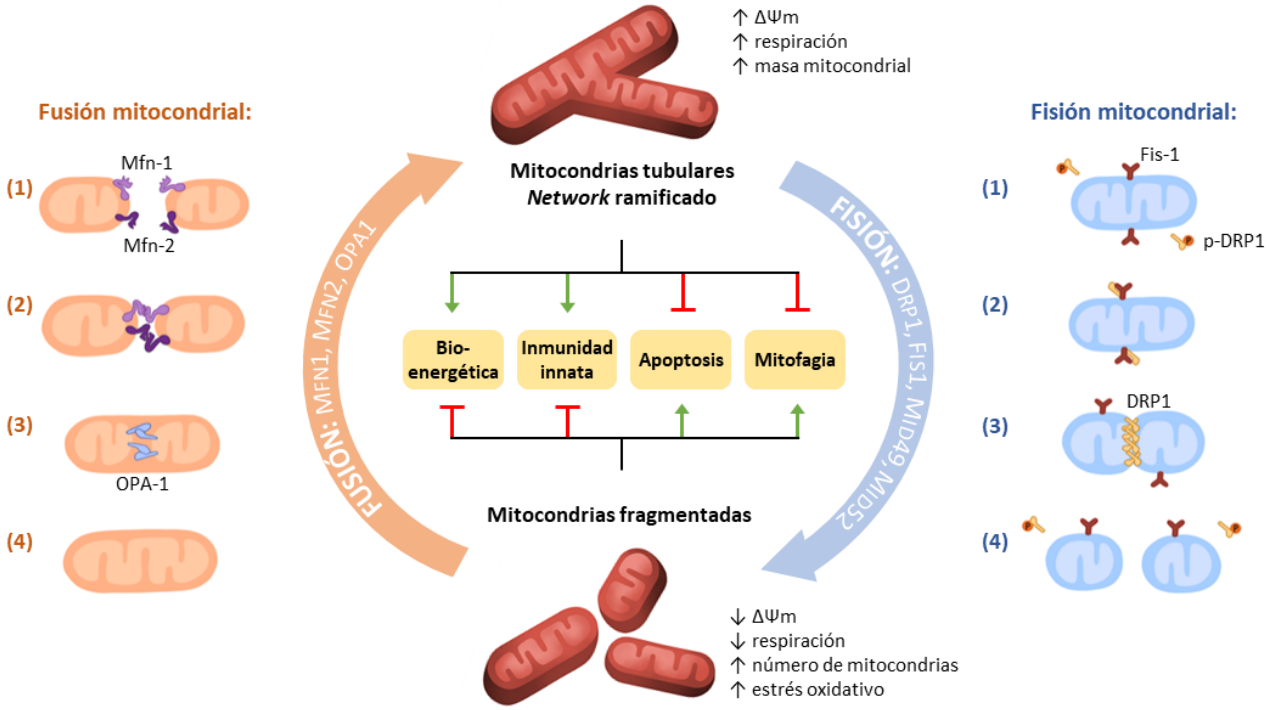


Figura 7. Modelo de la dinámica mitocondrial. *Representación esquemática de los procesos de fusión (en color naranja) y fisión mitocondrial (en color azul), indicando las proteínas implicadas en ambos procesos, así como las diferencias funcionales entre un network mitocondrial formado por mitocondrias tubulares alargadas y ramificadas, y un network fragmentado. Modificado de Khan, M. et al. 2015.*

4.3. Dinámica mitocondrial y respuesta inmune intracelular

La dinámica mitocondrial está implicada en la respuesta inmune innata mediada por la proteína MAVS, que se localiza principalmente en la MME (Castanier *et al.,* 2010). Cuando se produce una infección viral, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de la célula huésped reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y activan una cascada de señalización compleja para eliminar la infección. Muchos PAMPs virales son reconocidos por el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) y los receptores similares a RIG-I (RLRs), que activan a su vez la proteína de señalización antiviral asociada a las mitocondrias (MAVS) (Seth *et al.,* 2005). Una vez activada, MAVS forma grandes agregados tipo prion en la MME e inicia una cascada de señalización que conduce a la expresión de citoquinas inflamatorias, interferón (IFN), e incluso la apoptosis de las células infectadas

(Akira *et al.,* 2006). A través de la fusión mitocondrial se incrementan las interacciones de MAVS con las siguientes moléculas en la cascada de señalización. Por el contrario, la fisión mitocondrial bloquea la señalización posterior de MAVS, reduciendo la respuesta por interferón (Castanier *et al.,* 2010).

4.4. La dinámica mitocondrial durante la infección viral

La dinámica mitocondrial se ha estudiado en profundidad en el contexto de los trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer o Huntington (Burté *et al.,* 2015). Sin embargo, su papel en las infecciones virales todavía no se encuentra bien caracterizado y representa un campo emergente de investigación en virología.

Los virus han desarrollado diferentes estrategias para interferir sobre el equilibrio dinámico de las mitocondrias a lo largo de la evolución y facilitar su proliferación. Por ejemplo, el HCV promueve la fisión mitocondrial mediada por DRP1 como estrategia para inducir mitofagia e inhibir la apoptosis (Kim *et al.,* 2014); la infección por el HIV-1 remodela el *network* mitocondrial a través de la depleción de Fis1 y Drp1, favoreciendo la fragmentación mitocondrial (Avdoshina *et al.,* 2016), lo que se ha asociado a daño neuronal y apoptosis en modelos animales (Rozzi *et al.,* 2018); y el virus respiratorio sincitial (RSV) también fragmenta el *network* mitocondrial y recluta las mitocondrias en la zona perinuclear de forma dependiente de los microtúbulos y la dineína de la célula huésped (Hu *et al.,* 2019). Sin embargo, los virus DENV, ZIKV y SARS-CoV inducen el efecto contrario: favorecen la fusión y la elongación mitocondriales. Este hecho parece estar asociado con la formación de las denominadas *convoluted membranes*, membranas derivadas del RE necesarias para la replicación viral (Shi *et al.,* 2014; Chatel-Chaix *et al.,* 2016; Barbier *et al.,* 2017). En el caso del DENV, la elongación mitocondrial es dependiente de la proteína viral NS4B, un componente de los complejos replicativos que inhibe selectivamente la fosforilación de proteína de fisión Drp1 (Chatel-Chaix *et al.,* 2016; Barbier *et al.,* 2017). De forma similar, la proteína PRF-9b del SARS-CoV induce la elongación mitocondrial a través de la degradación vía proteasomal de Drp1 (Shi *et al.,* 2014). El virus de la influenza H1N1 también favorece la fusión mitocondrial dando lugar a mitocondrias elongadas durante la infección (Pila-Castellanos *et al.,* 2020). En el caso de la infección por bunyavirus, nuestro grupo de investigación ha descrito que durante la infección por el BUNV se produce un reclutamiento de las mitocondrias alrededor de las factorías virales, y se ha observado que las mitocondrias llegan a interaccionar y estar conectadas con los túbulos virales (Fontana *et al.,* 2008; García-Serradilla y Risco, 2021; Salanueva *et al.,* 2003). No obstante, no se han estudiado en profundidad los cambios estructurales y funcionales que llevan a este reclutamiento, ni la implicación que podría su bloqueo sobre el ciclo vital del BUNV.

Todos los factores involucrados en la replicación viral y en el control de los mecanismos celulares del huésped durante la infección serían potenciales dianas farmacológicas para la búsqueda de nuevas estrategias antivirales. Un conocimiento profundo del ciclo vital de los virus y de los mecanismos celulares que usurpan durante la infección, nos permitiría la selección y validación de nuevos antivirales de amplio espectro. Y estos podrían ser empleados de forma rápida en la clínica para combatir la presente y futuras pandemias producidas por virus emergentes y reemergentes.

El propósito final de la presente tesis doctoral ha sido identificar nuevas dianas relacionadas con dos mecanismos celulares: el flujo de lípidos y la dinámica mitocondrial, para la selección de moléculas que puedan ser empleadas como antivirales frente a virus emergentes, utilizando como modelo el virus Bunyamwera.

En primer lugar, se han estudiado los cambios en la composición lipídica durante la infección por el BUNV, hipotetizando que: (1) la síntesis de nuevas membranas y la reorganización de los orgánulos celulares que tienen lugar durante la infección implica un cambio en la composición lipídica de estas membranas; (2) los virus con envuelta tienen una composición lipídica específica, enriquecida en determinadas especies de lípidos en particular; y (3) los virus son capaces de usurpar determinadas LTPs celulares para facilitar el reclutamiento de lípidos a la factoría viral.

A su vez, se ha caracterizado el papel de la dinámica mitocondrial en la infección del BUNV con las premisas de que: (1) el reclutamiento de mitocondrias a las factorías virales del BUNV observado en estudios previos, se debe a una alteración en los procesos de fisión y fusión mitocondriales inducidos desde un tiempo temprano de infección; y (2) el cambio morfológico en la estructura del *network* mitocondrial implica un cambio en su función durante la infección.

Finalmente, se ha evaluado la actividad antiviral de un grupo de moléculas seleccionadas en base a su capacidad para bloquear, a través de distintos mecanismos, el flujo de colesterol o la dinámica mitocondrial, bajo las hipótesis de que: (1) la interferencia sobre estos dos procesos celulares bloquea la infección por el BUNV; y (2) al interferir sobre dianas celulares, estas moléculas son candidatas para desarrollar antivirales de amplio espectro frente a diferentes virus emergentes.

2

Objetivos

1. **Estudiar los cambios en la composición lipídica durante la infección por bunyavirus.**
   1.1. *Comparar la composición lipídica celular en ausencia de virus y tras la infección por bunyavirus.*
   1.2. *Determinar el lipidoma viral del virus Bunyamwera.*
   1.3. *Estudiar el flujo del colesterol intracelular durante la infección por bunyavirus.*
   1.4. *Evaluar la interferencia en el flujo de colesterol con simvastatina y metil-β-ciclodextrina como posible tratamiento antiviral.*

2. **Caracterizar el papel de las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) localizadas en los sitios de contacto entre membranas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi: OSBP, CERT y FAPP2, durante la infección por bunyavirus.**
   2.1. *Estudiar la localización y el cargo lipídico de las diferentes LTPs durante la infección.*
   2.2. *Evaluar el bloqueo de OSBP con itraconazol y OSW-1 como posible estrategia antiviral.*

3. **Caracterizar el papel de las mitocondrias en la infección por bunyavirus.**
   3.1. *Estudiar a nivel morfológico y estructural el* network *mitocondrial en ausencia de virus y tras la infección por bunyavirus.*
   3.2. *Estudiar a nivel funcional el* network *mitocondrial durante la infección por bunyavirus.*
   3.3. *Evaluar la interferencia sobre la estructura/función del* network *mitocondrial con digoxina, lanatósido C y Mdivi-1como posible estrategia antiviral.*

4. **Estudiar en otros virus RNA las drogas que han tenido efecto sobre la infección de bunyavirus: antivirales contra coronavirus humanos.**

3

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Células y virus

Líneas celulares estables

Células Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*). Se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC, *American Type Culture Collection*, Cat# CCL-81).

Células BHK21: fibroblastos de riñón de hámster de 1 día de vida (*Mesocricetus auratus*). Se obtuvieron de la ATCC (Cat# CCL-10).

Células MRC5: fibroblastos de pulmón humano embrionario. Se obtuvieron de la ATCC (Cat# CCL-171).

Células HEK293T (o 293T): células de riñón humano embrionario que contienen el antígeno T del virus SV40. Se obtuvieron de la ATCC (Cat# CCL-3216).

Células 293T-OSBP, 293T-CERT y 293T-FAPP2: células derivadas de la línea HEK293T, modificadas genéticamente para sobreexpresar de forma inducible por tratamiento con tetraciclina las proteínas transportadoras de lípidos OSBP, CERT o FAPP2 fusionadas a tres tags (tag de hemaglutinina, tag de seis histidinas y Strep-tag II®). Estas células fueron generadas en el laboratorio de la Dra. Anne-Claude Gavin, perteneciente a la Unidad de Biología Estructural del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL-Heidelberg), y se denominaron en función del transgén LTP-tags que contenían.

Para conseguir el sistema de expresión inducible por adición de tetraciclina, además de la integración estable del transgén LTP-tags bajo el control de un promotor TetO2, a las células 293T también se les introdujo de forma estable y expresión constitutiva el gen TetR de proteobacterias. Este gen expresa una proteína reguladora transcripcional que, en ausencia de tetraciclina, dimeriza y se une al promotor TetO2 reprimiendo la expresión de los genes que controla, en este caso de los transgenes LTP-tags. En presencia de tetraciclina, esta se une a TetR provocando un cambio conformacional en la proteína que impide su actividad represora, iniciándose la transcripción de las LTPs (Figura 8).

Para asegurar que con los pases sucesivos no perdían ni el transgén LTP-tags ni el sistema de expresión inducible por tetraciclina, estas líneas celulares se cultivaron en presencia de los antibióticos de selección Blasticidina e Higromicina B.

Todas las líneas celulares mencionadas previamente se crecieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen),

suplementado con aminoácidos no esenciales (AANEs), glutamina 200 mM, gentamicina 50 µg/ml, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Merck), y un 10% de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*, Reactiva). Las células se mantuvieron en cultivo en un incubador a 37ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa.

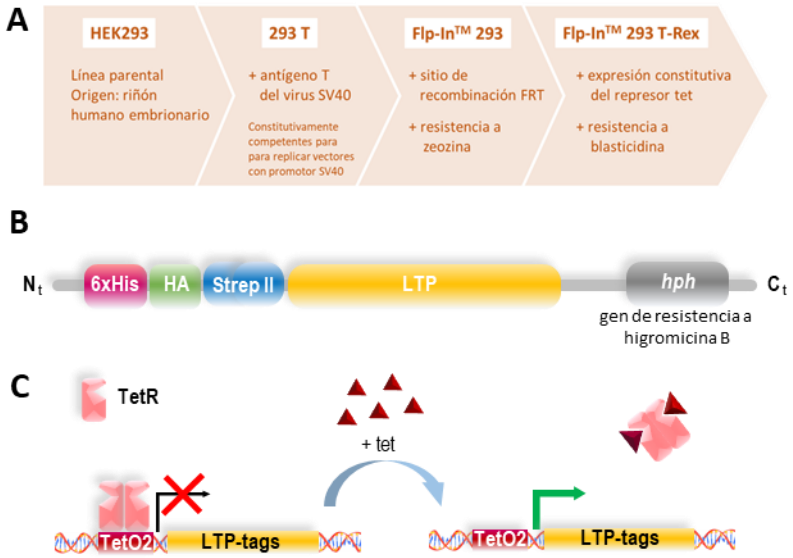


Figura 8. Construcción de las células derivadas de HEK293T que permiten la expresión de proteínas transportadoras de lípidos de un modo inducible por adición de tetraciclina. *(A) Denominación y características de las sucesivas líneas celulares estables hasta obtener las células Flp-InTM 293 T-Rex, sobre las que finalmente se introdujeron los transgenes LTP-tags. (B) Esquema genérico de las construcciones de las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) fusionadas a los tags en el extremo N terminal para facilitar su localización y purificación: tag de 6 histidinas (6xHis), tag de hemaglutinina (HA) y Step-Tag II®. El inserto también contenía el gen de resistencia a higromicina B, para la selección de las células que contenían el transgen. (C) Esquema del funcionamiento del sistema de expresión Tet-on.*

Virus

Virus Bunyamwera (BUNV): virus salvaje aislado a partir de un mosquito del género *Aedes spp.* capturado en Buyamwera, Uganda. Se obtuvo de la ATCC (Cat# VR-87).

Virus rBUNGc-eGFP: virus BUNV recombinante que expresa la proteína fluorescente eGFP (‘*Green Fluorescence Protein*’) fusionada en el segmento M de la glicoproteína Gc. Fue generado por genética reversa (Shi *et al.,* 2010) y cedido por el Dr. RM. Elliot (*University of Glasgow*, Reino Unido).

Virus rBUNL4-V5: virus BUNV recombinante que contiene el tag V5 insertado en el extremo carboxilo terminal de la polimerasa viral. Fue generado mediante genética reversa (Shi y Elliot, 2009) y cedido por el Dr. RM. Elliot (*University of Glasgow*, Reino Unido).

Virus rBUN-delNSs: virus BUNV recombinante que tiene delecionada la proteína no estructural NSs. Fue generado mediante genética reversa (Bridgen *et al.,* 2001) y cedido por el Dr. RM. Elliot (*University of Glasgow*, Reino Unido).

Virus HCoV229E: coronavirus humano de la cepa 229E aislado a partir de una muestra nasofaríngea de un varón con enfermedad leve de las vías respiratorias superiores. Se obtuvo de la ATCC (Cat# VR-740).

1.2. Anticuerpos y sondas

Anticuerpos contra proteínas virales

Anticuerpo anti-BUNV: antisuero generado en conejo contra la forma extracelular del virus BUNV. Potencialmente reconoce todas las proteínas estructurales del virus maduro: N, Gc, Gn y L. Fue cedido por el Dr. RM. Elliot (*University of St. Andrews*, Escocia) (Watret *et al.*, 1985).

Anticuerpo anti-Gc: anticuerpo monoclonal MAb742 generado en ratón, dirigido contra la glicoproteína Gc del virus BUNV, cedido por el Dr. RM. Elliot (*University of Glasgow*, Reino Unido) (Lappin *et al.*, 1994).

Anticuerpo anti-N_{BUNV}: anticuerpo policlonal contra la proteína de la nucleocápsida del virus BUNV obtenido mediante inmunización de un conejo con un péptido sintético de secuencia MIELEFHDVAANTSST, correspondiente con la región amino terminal de la proteína (Fontana *et al*., 2008).

Anticuerpo anti-N_{229E}: anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido contra la proteína de la nucleocápsida del coronavirus HCoV-229E (Ingenasa, Cat# M.30.HCo.I1E7).

Anticuerpos contra proteínas celulares

Anticuerpo anti-Gigantina: anticuerpo policlonal producido en conejo y empleado para para marcar mediante microscopía de fluorescencia (MF) las regiones cis y media del aparato de Golgi (Biolegend, Cat# PRB-1140).

Anticuerpo anti-TGN46: anticuerpo policlonal producido en conejo utilizado para marcar el *network* trans-Golgi (TGN*, Trans-Golgi Network*) mediante MF (Novus Biologicals, Cat# NBP1-4964SS).

Anticuerpo anti-TOMM22: anticuerpo policlonal generado en conejo dirigido contra la proteína TOMM22 localizada en la membrana mitocondrial externa, utilizado para comúnmente en MF para marcar el *network* mitocondrial en células de mamífero (Merck, Cat# HPA003037).

Anticuerpo anti-PDI: anticuerpo monoclonal producido en conejo que reconoce la proteína disulfuro isomerasa o PDI del lumen del retículo endoplásmico, utilizado habitualmente en MF para marcar el retículo endoplásmico (Bionova, Cat# ADI-SPA891-F).

Anticuerpo anti-hOSBP: anticuerpo policlonal producido en conejo dirigido contra la proteína humana de unión a oxiesterol u OSBP (Proteintech, Cat# 11096-1-AP).

Anticuerpo anti-MFN2: anticuerpo policlonal producido en conejo dirigido contra la proteína humana mitofusina 2 (Abcam, Cat# ab50838).

Anticuerpo anti-β-actina: anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido contra la proteína actina, componente del citoesqueleto (Merck, Cat# A2668).

Anticuerpo anti-tubulina-HRP: anticuerpo monoclonal producido en ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*), utilizado para *western blot* a una dilución 1:1,000 (BioRad, Cat# MCA77P).

Anticuerpos contra tags

Anticuerpo anti-HA (*mouse*): anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido conta el tag-HA, un epítopo de 8 aminoácidos derivado de proteína hemaglutinina del virus de la influenza, dil. 1:200 (IF) y dil. 1:2.000 (WB) (Roche, Cat# 11583816001).

Anticuerpo anti-HA (*rabbit*): anticuerpo policlonal producido en conejo contra el tag-HA, dil. 1:200 (IF) y dil. 1:2.000 (WB) (Abcam, Cat# ab137838).

Anticuerpo anti-V5: anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido contra el tag-V5, derivado de un epítopo pequeño (Pk) de 14 aminoácidos presente en las proteínas P y V del paramixovirus de simios SV5, dil. 1:200 (BioRad, Cat# MCA1360GA).

Anticuerpos secundarios

Para microscopía de fluorescencia: anticuerpos secundarios producidos en cabra frente a IgG de ratón y conjugados a los fluoróforos Alexa 488 (Cat# A11029) o Alexa 594 (Cat# A11032); anticuerpos secundarios producidos en cabra frente a IgG de conejo y conjugados a los fluoróforos Alexa 488 (Cat# A11034), Alexa 546 (Cat# A11035) o Alexa 594 (Cat# A11037), todos ellos fueron utilizados a una dilución 1:500 y obtenidos de ThermoFischer Scientific.

Para *westernblot*: anticuerpo secundario producido en oveja frente a IgG de ratón y conjugado con HRP dil. 1:10.000 (Amersham, Cat# NA931) y anticuerpo secundario producido en cabra frente a IgG de conejo y conjugado con HRP, dil. 1:50.000 (Jackson, Cat# AB_2307391).

Para microscopía electrónica/Tokuyasu: anticuerpo secundario producido en cabra frente a IgG de conejo y conjugado con nanopartículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro, dil. 1:50 (*British Biocell International Ltd*., Cat# EM-GFAR10).

Sondas

DAPI, (4'-6-diamidino-2-fenilindol): marcador del DNA nuclear utilizado para microscopía óptica de fluorescencia (Merck, Cat# 32670).

Hoechst 33342: marcador del DNA nuclear para microscopía de células vivas (ThermoFischer Scientific, Cat# H1399).

Mitotracker: marcadores de mitocondria fueron: Mitotracker Deep-Red 633 en DMSO (Cat# M-22426) y Mitotracker Green en DMSO (Cat# M-7514) de Molecular Probes.

MitoSOX™: indicador rojo de especies reactivas de oxígeno mitocondriales para el estudio de células vivas (Invitrogen, Cat# M36008).

Image-iT™ TMRM: éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM), indicador rojo de potencial de membrana mitocondrial para el estudio de células vivas (Invitrogen, Cat# I34361).

Filipina III: producida *Streptomyces filipensis*, utilizada en microscopía de fluorescencia para marcar el colesterol de las membranas y depósitos celulares (Merck, Cat# F4767).

Yoduro de propidio: solución de teñido para el marcaje de los núcleos de RNasa (BD Pharmingen, Cat# 550825).

1.3. Otros reactivos

Lipofectamina RNAiMAX®, utilizado para la transfección de células de mamífero mediante la formación de liposomas, y el medio de transfección Opti-MEM son de Gibco®/Invitrogen™.

Kit QUIAGEN® Plasmid *Plus* Midi, (Cat# 12943) para la amplificación y purificación de plásmidos.

Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce® (ThermoFischer Scientific, Cat# 23227), para determinar la concentración total de proteínas procedentes de muestras de lisados celulares.

Marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Dual Color (BioRad, Cat# 1610374).

Kit para el revelado Enhanced Chemiluminiscence (ECL) Plus Western Blotting Detection, es de Amersham-GE Healthcare.

ProLong®, medio de montaje para MF (ThermoFisher Scientific, Cat# P36930).

OptiPrep®, solución de iodixanol al 60% (p/v) utilizada para generar los gradientes de densidad se obtuvieron en (Cat# 07820, StemCell Technologies).

Los compuestos testados como antivirales frente a los virus BUNV y HCoV-229E fueron adquiridos a Merck: digoxina (Cat# D6003), lanatósido C (Cat# L2261), Mdivi-1 (Cat# M0199), itraconazol (Cat# I6657), simvastatina (Cat# S6196) y metil-β-ciclodextrina (Cat# C4555); y a Cambridge Bioscience: OSW-1 (Cat# CAY30310).

Soluciones de trabajo

- **PBS 1X** (tampón fosfato salino, *phosphate buffered saline*): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7,2-7,4.
- **HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 0,4 M; y pH 7,2-7,4.
- **Tris-HCl 0,01M**: NaCl 0,01 M; Tris-Base 0,01 M; EDTA 1 mM; y pH 7,4.
- **TEN**: Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,1 M y EDTA 1 mM; pH 7,4.
- **TAE**: Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 2 mM.
- **Tampón de bloqueo para WB:** Leche en polvo al 3%; Tween-20 al 0,05 % en PBS.
- **TBG**: Tris-HCl 30 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; BSA al 0,1% y gelatina al 1%.

2. Biología celular y virología

2.1. Infección de cultivos celulares con los virus BUNV o HCoV-229E

Para realizar los distintos experimentos, la cantidad de inóculo viral empleado para infectar las monocapas celulares dependió del título del stock de virus utilizado, del número de células sembradas en la placa de cultivo y de la multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*) a la que se decidió infectar en cada experimento concreto. La MOI se midió en unidades formadoras de placa (PFU, *plaque forming units*) por célula en el caso del virus BUNV, o en TCID50/célula en el caso del virus HCoV229E. De forma estándar, se infectaron las monocapas celulares a una MOI de 1 PFU/célula.

En el momento de infectar las células en cultivo, en primer lugar, se realizó un lavado con DMEM fresco. A continuación, se añadió el inóculo viral diluido en medio DMEM con 2% de FBS en un volumen mínimo que permitiera cubrir toda la monocapa celular, y se incubaron las células durante 1 h, a 37ºC y agitando cada 15 min. Esta incubación se realizó para asegurar la adsorción viral, es decir, la unión del virus a los receptores de la membrana celular correspondientes. Pasada la hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y se añadió medio DMEM fresco con 2% de FBS, y se incubaron las células a 37ºC las horas post infección (hpi) necesarias según los requerimientos de cada experimento.

2.2. Titulación del virus BUNV mediante ensayo de placa

La cuantificación de virus BUNV presente en los stocks virales, las alícuotas de virus purificados o las muestras procedentes del medio de cultivo de células infectadas, se llevó a cabo mediante un ensayo de titulación por formación de placas de lisis.

Para ello, se sembraron células Vero en una placa de 24 pocillos y, cuando alcanzaron una confluencia del 100%, se infectaron con diluciones seriadas 1:10 de la

muestra a titular en medio de dilución (DMEM, glutamina 200 mM, FBS 2%, gentamicina 50 µg/ml, AANEs y DEAE-dextrano 1%), y se incubaron 1 h a 37ºC agitando cada 15 min. Pasado el tiempo de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió medio de cultivo semisólido (DMEM, glutamina 200 mM, gentamicina 50 µg/ml, AANEs, DEAE-dextrano 1%, FBS 2% y agar 0.6%) y se incubaron las células a 37ºC durante 4 días. El medio semisólido impide la difusión de los virus y favorece la formación localizada de los focos o placas de infección.

A los 4 días post-infección, se fijaron las células con PFA al 10% en PBS durante 1 h. Posteriormente, se retiraron el fijador y el medio sólido, se tiñeron las células con cristal violeta al 0,1% en metanol:agua (20:80), y se realizó el conteo del número de focos de infección o placas de lisis. El título viral se expresó en PFU/ml, y se calculó multiplicando el número de placas de lisis que aparecieron en el último pocillo por el volumen del inóculo que se añadió a cada pocillo (50 µl) y dividiendo entre el factor de dilución.

2.3. Titulación del virus HCoV-229E por determinación de TCID50

En el caso del virus HCoV-229E, no se pudo llevar a cabo el protocolo de titulación por formación de placas de lisis debido a que la infección en las células MRC5 la infección no era lítica. Por este motivo se decidió utilizar un protocolo de titulación por microscopía de fluorescencia adaptado de Lambert, F. *et al*. (2008) para la determinación de la dosis de infección del 50% del cultivo o TCID50 (*50% Tissue Culture Infectious Dose*).

Se sembraron células MRC5 en una placa de 96 pocillos a una concentración de 15,000 células/pocillo en medio DMEM suplementado con FBS al 10%. Cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 70-80%, se retiró el medio de cultivo y se inocularon las células con diluciones seriadas 1:10 de la muestra que se quería titular (cuatro réplicas por dilución) en medio DMEM suplementado con FBS al 1% y se incubaron a 33ºC durante 5 días. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo por completo y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min, y se procedió al inmunomarcaje con un anticuerpo primario anti-N_{229E} monoclonal producido en ratón que reconocía la proteína de la nucleocápsida del virus HCoV229E, y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa-488 (verde). Se leyó la placa utilizando un microscopio de fluorescencia y se cuantificaron los pocillos que presentaban células con fluorescencia verde.

El título de virus infectivos se calculó mediante la ecuación del método de Karber (Karber, 1931) para el cálculo de la TCID50:

$$TCID_{50} = D - [d \cdot (S - 0.5)]$$

donde D = $-\log_{10}$ de la última dilución que mostraba el 100% de pocillos positivos para la infección; d = $-\log_{10}$ del factor de dilución; S = número total de pocillos que presentaban señal positiva de infección. La TCID50 calculada de esta forma es una medida de la cantidad de virus necesaria para infectar el 50% de las células en cultivo. El valor de TCID50 es diferente del valor obtenido por ensayo de placas. Estadísticamente, una unidad de TCID50 equivale a 0,69 PFU.

2.4. Purificación de virus BUNV

Para el estudio de la composición lipídica de la envuelta del virus BUNV, fue necesaria la obtención de alícuotas de virus muy concentradas y de un alto grado de pureza. Se decidió seguir una estrategia de purificación basada en centrifugación en un gradiente de densidad de iodixanol (Optiprep®) (Novoa *et al.*, 2005b).

Se sembraron las células 293T en placas p150 y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 80 %. A continuación, se infectaron a una MOI de 0,001 PFU/célula durante 1 h a 37ºC, agitando cada 15 min. Pasada la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM con 2% de FBS y se incubaron a 33ºC durante 50-60 h. Posteriormente, se recogió el sobrenadante que contenía los virus producidos, y se centrifugó a 3.700 g durante 20 min a 4ºC en una centrífuga Sorvall con rotor GSA para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de la centrifugación se colocó sobre un colchón de sacarosa al 30% (p/v) en medio TEN con inhibidores de proteasas (Roche), y se centrifugó a 67.000 g durante 2,5 h a 4ºC en una centrífuga Beckman con rotor SW28. Para obtener distintas fracciones con las partículas virales, el sedimento obtenido se resuspendió en medio TEN y se aplicó sobre un gradiente continuo de densidad de Optiprep® (del 13 al 22 %) preparado también en medio TEN. El gradiente de densidad se preparó congelando sucesivamente capas de concentraciones decrecientes de Optiprep®, desde la parte inferior del tubo de centrifugación (22% de Optiprep®) hasta la parte superior (13% de Optiprep®). Para la obtención del gradiente de densidad continuo, se descongeló el tubo a temperatura ambiente, durante 14 horas sobre una superficie plana. El sedimento se pasó por el gradiente mediante centrifugación durante 14 h a 250.000 g y 4ºC en una centrífuga Beckman con rotor SW41Ti.

Posteriormente se recogieron las distintas fracciones del gradiente en alícuotas desde la parte superior del tubo. Se determinó la abundancia de las partículas virales mediante electroforesis/*western blot* detectando la proteína viral N con un anticuerpo policlonal producido en conejo que reconocía específicamente la nucleoproteína del BUNV,

y también mediante tinción negativa y microscopía electrónica. Las fracciones que contenían partículas virales se almacenaron a -80ºC hasta su utilización.

También se cuantificó la cantidad de proteína total de cada alícuota mediante ensayo BCA (ensayo de ácido bicinconínico o ensayo Smith). La cantidad de proteína/muestra se utilizaría posteriormente para la normalización de los valores obtenidos en el análisis de lipidómica por espectrometría de masas.

2.5. Tratamiento con drogas y determinación de IC50 por inmunofluorescencia

Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo (en el caso de células Vero o BHK21) o de 10.000 células/pocillo (células 293T) en medio DMEM con 10% de FBS en placas de 96 pocillos, y se cultivaron 14 horas hasta que alcanzaron la confluencia. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se infectaron las células a una MOI de 0,1 PFU/célula (para el virus BUNV) o 0,1 TCID50/célula (para el virus HCoV-229E) durante 1 h, a 37ºC y en medio DMEM sin FBS. Transcurrida la hora de adsorción viral, se descartó el inóculo viral y se añadió medio DMEM con 2% de FBS y concentraciones crecientes de las drogas a testar. Se incubaron las células a 37ºC durante 16 hpi o 24 hpi en función de haber infectado con el virus BUNV o HCoV-229E, respectivamente. Pasado el tiempo de infección, las células se fijaron con PFA al 4% y se realizó el inmunomarcaje con un anticuerpo primario dirigido contra la proteína de la nucleocápsida de cada uno de los virus, anticuerpos anti-N_{BUNV} o anti-N_{229E}, y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa488 (verde). Las placas se leyeron de modo automático en un microscopio de epifluorescencia Leica DMi8 S, con un objetivo 10X, tomando 9 imágenes por pocillo.

Las imágenes se procesaron de forma semiautomática, midiendo el área celular con señal verde fluorescente y el área celular total con el software ImageJ/Fiji. El porcentaje de infección se calculó como la relación entre el área celular con señal fluorescente y el área celular total. Las curvas de inhibición se calcularon utilizando el software GraphPad®, y los valores de la concentración media inhibitoria o IC50 (la concentración de cada droga que inhibe el 50% de la infección viral) se determinaron utilizando el software IC50 Calculator® de AAT Bioquest (https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator).

Para el estudio del efecto de las drogas en las distintas etapas de la infección, las drogas se añadieron al medio de cultivo antes, durante o después que el inóculo viral. Para estudiar el efecto de las drogas en el proceso de entrada, las drogas se añadieron 3 h antes del inóculo viral (punto nombrado como -3 h), y después se retiraron del medio de cultivo. Para comprobar el efecto de las drogas en la replicación del virus u otros eventos post-

entrada, las drogas se añadieron a diferentes tiempos (0, 3 y 6 hpi) y se mantuvieron en el medio de cultivo hasta que las células se fijaron con PFA. Posteriormente, las células se procesaron para inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal anti-N para visualizar por microscopía de fluorescencia las células infectadas y cuantificar el porcentaje de infección.

2.6. Estudio de proliferación celular por impedancia (xCELLigence®)

El sistema xCELLigence® RTCA (Agilent) permite monitorizar de forma dinámica las células vivas gracias a un sensor microelectrónico de oro integrado en el fondo de los pocillos de las propias placas de cultivo. Este equipo mide la impedancia u oposición al flujo de corriente eléctrica cuando las células se depositan y crecen sobre los pocillos de la placa de cultivo (Figura 9A). Las células actúan como aislantes eléctricos de modo que, a mayor confluencia de la monocapa celular, aumenta el valor de impedancia. Esto permite analizar en tiempo real el crecimiento y proliferación de las células en cultivo sin utilizar ningún reactivo químico o sonda.

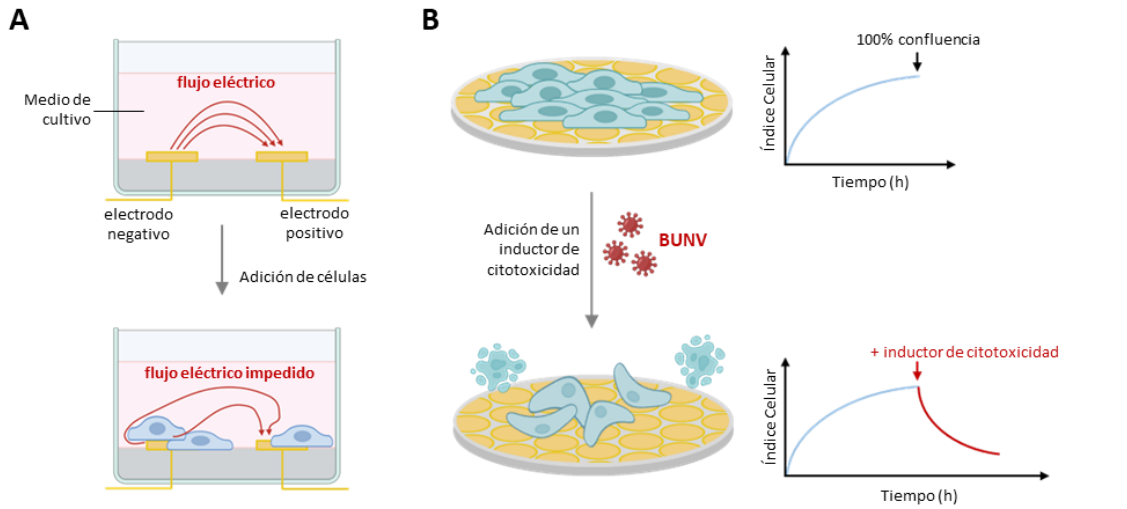


Figura 9. Representación esquemática de la medida de supervivencia celular mediante el analizador xCELLigence® de Agilent. *(A) El sistema mide el flujo de electrones entre los biosensores a través del medio de cultivo, que se ve impedido cuando las células crecen sobre los microelectrodos de oro. (B) Cuando se añade un estímulo citotóxico (p.ej. un virus lítico como el BUNV), la respuesta conduce a una morfología celular alterada acompañada de desprendimiento de células del fondo del pocillo. Las células que pierden el contacto con los biosensores de oro dejan de detectarse como aislantes eléctricos y disminuye el valor del índice celular (IC). Adaptado de: https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence.*

El estudio de proliferación mediante el sistema xCELLigence® se realizó en el Instituto IMDEA-Alimentación, gracias a la colaboración con la Dra. Ana Ramírez y al soporte técnico y la formación recibida por la Dra. Marta Gómez de Cedrón.

Las placas se montaron sobre un dispositivo ubicado en el propio incubador y que estaba conectado a un analizador electrónico externo para evaluar automáticamente y

transferir a un ordenador los valores de impedancia electrónica. Para cada pocillo, se determinó el índice celular (IC) relativo cada 30 min, normalizando el valor de impedancia en cada punto con respecto al valor de impedancia basal a tiempo cero.

De este modo se estudió a tiempo real la proliferación celular de monocapas control e infectadas con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. Gracias a que el efecto citopático durante la infección produce la muerte de las células en cultivo, las células pierden su adhesión al fondo de la placa de cultivo y, en consecuencia, se produce una caída en la impedancia e IC (Figura 9B).

2.7. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo de MTT

La citotoxicidad celular inducida por el tratamiento con diferentes drogas se analizó mediante un ensayo de viabilidad basado en MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio), que mide la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de células vivas (Tolosa, 2015).

Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo (en el caso de células Vero o BHK21) o de 10.000 células/pocillo (células 293T), y se incubaron durante 16 h para asegurar la adhesión a la placa de cultivo. Posteriormente, las células se incubaron con concentraciones crecientes de las diferentes drogas a testar diluidas en medio DMEM con 2% de FBS durante 18 h. Pasado ese tiempo, se añadió al medio de cultivo una solución de MTT (Merck, Cat# M5655) a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubaron las células durante 4 h siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de MTT-formazano formado se determinó mediante medida espectroscópica en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm después de disolver los cristales de formazano con un buffer de solubilización (10% de SDS y HCl 0,01M en 85% de isopropanol).

2.8. Estudio de las fases del ciclo celular por citometría de flujo

El uso de la citometría de flujo para el seguimiento del ciclo celular es un método rápido y ampliamente utilizado. Se basa en el análisis del contenido del DNA celular tras el marcaje con una sonda fluorescente, el yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*), que se une de forma cuantitativa y proporcional al DNA celular por lo que, la medición de su intensidad de fluorescencia permite la resolución de las 3 fases principales del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M, que difieren entre sí por su contenido de DNA.

Para el estudio del ciclo celular durante la infección, se sembraron células 293T o Vero y, cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 60%, se infectaron con

el virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. A las 8hpi, se recogieron las células en PBS con EDTA 5 mM, se fijaron y permeabilizaron con metanol 100% en hielo durante 2 h. Después se lavaron las células con PBS y se marcó el DNA nuclear con un buffer de tinción comercial que contenía PI y RNasa (BD Pharmingen, Ref. 550825) durante 30 min. La fluorescencia del PI se analizó con un citómetro Beckman Coulter CYTOMICS FC 500, con un software CXP y doble discriminación. La fluorescencia del PI se recogió en una escala lineal y las fases del ciclo celular se calcularon con la herramienta de análisis de ciclo celular del software FlowJo®.

2.9. Estudios de bioenergética

La capacidad de respiración mitocondrial celular a tiempo real en células vivas se estudió utilizando un analizador SeaHorse® XFe96 y el protocolo estándar XF Cell Mito Stress Test (Seahorse Biosciences, Agilent Technologies), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los experimentos de bioenergética incluidos en la presente tesis doctoral se llevaron a cabo gracias a la colaboración con la Dra. Ana Ramírez en el Instituto IMDEA-Alimentación, y al soporte técnico y la formación recibida por la Dra. Marta Gómez de Cedrón.

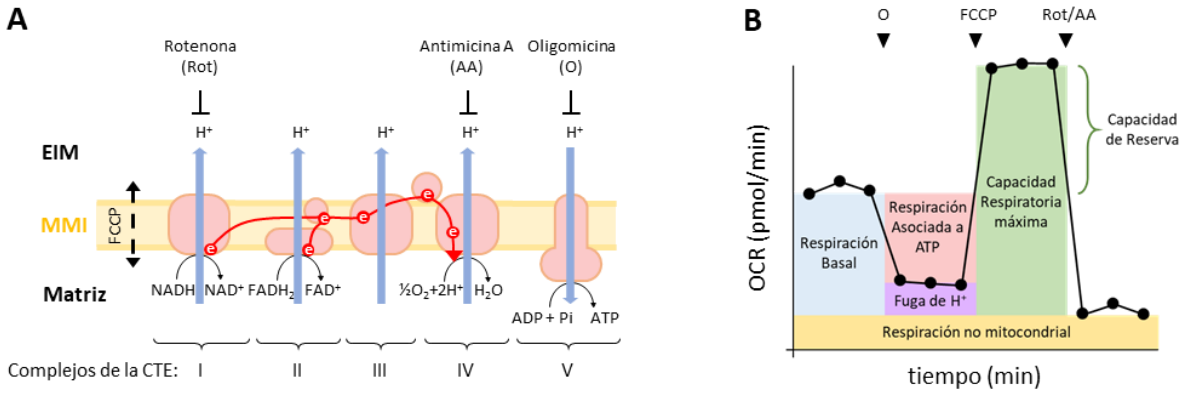


Figura 10. Esquema del ensayo MitoStress® llevado a cabo en el analizador SeaHorse® de Agilent. *(A) Diagrama que representa el sitio de acción de los diferentes inhibidores sobre la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (MMI). La rotenona (Rot) inhibe el complejo I; la antimicina A (AA) inhibe el complejo IV; la oligomicina inhibe el complejo (V), y el FCCP es un ionóforo que permeabiliza la MMI permitiendo el paso libre de protones (H+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (EIM). (B) Representación de una curva del ensayo celular MitoStress® de Agilent en la que se muestran los parámetros calculables a partir de los valores de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, oxygen consumption rate) tras la adición de los diferentes inhibidores.*

Para este experimento, la actividad del complejo IV de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial se inhibió con antimicina A (AA) y se utilizó rotenona (Rot) para bloquear la actividad del complejo I. El uso combinado de ambos compuestos se utiliza para inactivar completamente toda la actividad de la CTE. Por otra parte, la actividad del complejo V se bloqueó utilizando oligomicina (O), que a su vez detiene la generación de todo el ATP generado por fosforilación oxidativa. La capacidad máxima de la función de la CTE

mitocondrial se analizó utilizando FCCP, un inductor de la formación de poros en la membrana interna mitocondrial que disipa el gradiente químico entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 10A). El analizador SeaHorse® XFe96 utiliza una sonda sensible a oxígeno para medir el OCR en respuesta a los tratamientos descritos anteriormente. El uso del kit Mito Stress® permitió calcular seis parámetros relativos a la actividad mitocondrial (Figura 10B):

- Tasa basal de respiración mitocondrial: tasa de consumo de oxígeno inicial menos la tasa de respiración no mitocondrial.
- Producción de ATP: tasa de consumo de oxígeno inicial menos la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de O.
- Fuga de protones: tasa de consumo de oxígeno tras la adición de O menos la tasa de respiración no mitocondrial.
- Tasa máxima de respiración mitocondrial: tasa de consumo de oxígeno tras la adición de FCCP menos la tasa de respiración no mitocondrial
- Capacidad respiratoria de reserva: tasa de consumo de oxígeno tras la adición de FCCP menos la tasa de consumo de oxígeno inicial.
- Tasa de respiración no mitocondrial: tasa de consumo de oxígeno tras la adición de Rot/AA.

Se sembraron 5.000 células Vero por pocillo en medio DMEM completo con FBS al 10% y se incubaron 14 h. El día del experimento, se añadió el virus BUNV según las condiciones estándar de infección (1 PFU/célula, 8 hpi); se preparó el medio de ensayo (*SeaHorse XF Base Medium* suplementado con glucosa 25 mM, L-glutamina 4 mM y piruvato 1 mM); y se hidrató el cartucho de los inyectores. A las 7.5 hpi, se cambió el medio de cultivo y se sustituyó por el *Seahorse XF Base Medium* y se incubaron las células en una estufa sin suministro de CO_2 a 37ºC durante 45 min. Durante este tiempo, se resuspendieron los viales con los compuestos a inyectar (oligomicina, FCCP, Rot/AA) en el medio de ensayo y se cargaron en sus respectivos puertos del cartucho de los inyectores. A continuación, se introdujo el cartucho en el analizador SeaHorse® y se calibró. Por último, se introdujo la placa con las células y se inició la medida de OCR. Se realizaron seis replicas por condición, correspondientes a tres experimentos independientes.

2.10. Ensayo de especies reactivas de oxígeno mitocondriales y potencial de membrana mitocondrial

Los niveles de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial (mROS) se midieron con la sonda MitoSOX (Invitrogen), mientras que el potencial de membrana mitocondrial (Ψm) se estudió mediante marcaje con la sonda Image-iT TMRM (Invitrogen).

Se sembraron 10^6 células Vero en placas µ-Dish de 35 mm de diámetro y fondo de cristal (ibidi, Cat# 81158), y se cultivaron durante 16 h. Pasado ese tiempo se infectaron con virus rBUNGc-eGFP a una MOI de 5 PFU/célula. Transcurridas 8 horas de infección, se retiró el medio de cultivo, se añadió medio fresco con las sondas MitoSOX o TMRM diluidas en medio DMEM sin rojo fenol (según especificaciones del fabricante), y se incubaron las células a 37ºC durante 30 min y en oscuridad. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado con PBS, se añadió medio fresco a las células, y se llevaron a un microscopio confocal configurado para el estudio de muestras *in vivo* (37ºC, 5% CO2 y humedad). Se estudió la fluorescencia emitida normalizada en función de la superficie celular en 50 células aleatorias por condición. En el caso de células infectadas, solo se consideraron las que presentaban señal verde correspondiente con la proteína viral Gc.

2.11. Transfección de células de mamífero

2.11.1. Método del fosfato cálcico para la transfección de plásmidos

El método del fosfato cálcico para la transfección está basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos que favorece la unión del DNA a la membrana celular y su interiorización mediante endocitosis. Además, se ha hipotetizado que el agregado con calcio protege el DNA de la degradación por las nucleasas celulares.

Se sembraron las células en placas de 35 mm de diámetro 24 horas antes de la transfección, adecuando el número de células con el fin de obtener una confluencia del 80% en el momento de la transfección. Dos horas antes de la transfección, se cambió el medio a las células dejándolas en 2 ml de Opti-MEM® sin antibióticos y suplementado con un 2% de FBS. La mezcla de transfección se preparó añadiendo gota a gota 150 µl de una solución de 10 µg del DNA plasmídico y cloruro cálcico 60 mM en agua, sobre otros 150 µl de buffer HBS 2X a pH 7,05 (HBS, *HEPES buffered saline*: NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, dextrosa 12 mM, y HEPES 50 mM). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente 30 min y, a continuación, se añadieron gota a gota 150 µl (5 µg de DNA) de la mezcla sobre el medio de cultivo de cada placa de células a transfectar. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 h en presencia de la mezcla de transfección. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X y se añadió medio fresco DMEM con FBS al 10%. Las células se incubaron 24-48 horas adicionales.

Plásmidos utilizados:

pcDNA-OSBP-GFP: vector pcDNA 5 con promotor de citomegalovirus (CMV) para la expresión constitutiva de las proteínas clonadas en células de mamífero. Este

plásmido contenía la secuencia de la proteína humana OSBP fusionada en su extremo N-terminal a la proteína verde fluorescente, GFP. Este plásmido fue cedido por la Dra. Anne-Claude Gavin (EMBL-Heidelberg), y se empleó para el estudio de la localización de OSBP durante la infección.

pcDNA-mCherry-ER-3: vector pcDNA 3.1 con promotor del CMV, diseñado para la expresión constitutiva en células de mamífero. Contenía un transgén formado por la secuencia de la proteína roja fluorescente mCherry fusionada a la secuencia KDEL de la proteína humana calreticulina, correspondiente a un péptido de retención en retículo endoplásmico (ER). Este plásmido se utilizó para marcar la estructura del retículo. Este plásmido fue cedido por Michael Davidson (Addgene plasmid # 55041; http://n2t.net/addgene:55041; RRID: Addgene_55041).

2.11.2. Transfección de siRNAs con Lipofectamina RNAiMAX®

Para conseguir el silenciamiento de la expresión de las proteínas OSBP y mitofusina 2 (mfn2), se transfectaron las células con una mezcla de tres dupletes siRNA de 27 mer específicos para cada una de estas proteínas adquiridos en Origene® (Tabla 1). Y se utilizó como agente de transfección una variante de lipofectamina denominada RNAiMAX® (ThermoFisher Scientific) para garantizar la estabilidad y eficacia de la transfección de los siRNAs.

Tabla 1. *Secuencias de los siRNAs utilizados en diferentes experimentos (adquiridos en OriGene®).*

Dupletes de siRNA para el silenciamiento de OSBP	
siOSBP-SR303309A	rArUrGrCrUrUrArGrCrUrArUrCrArArGrUrCrArUrUrGrCrArCrGrU
siOSBP-SR303309B	rUrGrUrUrUrUrCrArUrGrUrGrArCrUrUrUrArUrUrCrCrArCrCrUrG
siOSBP-SR303309C	rUrCrUrUrGrUrGrArUrUrCrArCrArArUrArUrCrArArUrUrUrCrGrC
Dupletes de siRNA para el silenciamiento de MFN2	
siMFN2-SR306670A	rArGrGrArUrGrUrArGrUrArGrArArGrGrArUrGrGrArUrGrGrT
siMFN2-SR306670B	rGrCrArUrGrGrUrArCrCrArArGrGrArGrUrUrArArGrUrUrGrA
siMFN2-SR306670C	rGrGrUrUrUrArCrUrGrCrGrArGrGrArArArUrGrCrGrUrGrArA

El día previo a la transfección se sembraron las células 293T o Vero en placas de 35 mm de diámetro, adecuando el número de células con el fin de obtener una confluencia del 80% en el momento de la transfección, y se incubaron a 37ºC y 5% de CO2. Dos horas antes de transfectar, se cambió el medio de cultivo y se sustituyó por 2 ml de medio Opti-MEM® sin antibióticos y suplementado con FBS al 2%. Se preparó la mezcla de transfección que contenía por pocillo a transfectar: 25 pmol de los siRNAs específicos y 7,5 µl de lipofectamina en 250 µl de medio Opti-MEM sin antibióticos; y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos liposoma-RNA. Posteriormente se añadió gota a gota la mezcla de transfección sobre el medio de cultivo y se incubaron las

células a 37ºC durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de transfección, se añadió medio fresco DMEM con FBS al 10% y se incubaron las células hasta las 48 o 72 horas post-transfección (hpt) en función de querer asegurar el silenciamiento a nivel de mRNA o de proteína.

3. Análisis Bioquímicos

3.1. Purificación de complejos LTP-lípido

Las células 293T transfectadas establemente para sobreexpresar las LTPs marcadas de forma inducible por adición de tetraciclina, se sembraron y crecieron en medio de cultivo DMEM con 10% de FBS y en presencia de 1 μg/ml de tetraciclina durante 72 h hasta alcanzar una confluencia del 95%. Se utilizaron 40 placas de 15 cm de diámetro por muestra. En el caso de las muestras de células infectadas, a las 64 h se retiró el medio de cultivo y se infectaron con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula en medio DMEM con 2% de FBS y se incubaron 1 hora a 37ºC. Después de la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM con 2% de FBS y 1 μg/ml de tetraciclina y se incubaron las placas durante 7 horas (tiempo de infección final: 8 hpi.). Tras el tiempo de incubación, se recogieron las células en PBS y se centrifugaron 10 min a 4ºC y 700 g, se descartó el sobrenadante y los pellets celulares se congelaron por inmersión directa en nitrógeno líquido favoreciendo la paralización rápida del metabolismo celular y asegurando la correcta preservación de la muestra. Las muestras se almacenaron a -80ºC hasta su procesamiento. Para una mejor comprensión, las distintas etapas del desarrollo experimental completo de estudio del cargo lipídico de las LTPs se han recogido esquemáticamente en la Figura 11.

Los pellets celulares se descongelaron en hielo en 3 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 500 mM NaF, 200 mM $NaVO_3$, 1 M $MgCl_2$, 1 M DTT, 2 mM avidina, 10 mg/ml DNAsa (Roche) y cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), pH 7,4). Una vez descongeladas las muestras, se llevó a cabo la lisis aplicando fuerza mecánica pasando la suspensión celular 15 veces a través de una aguja de grosor 21G. Después se realizó una primera centrifugación de 20 min a 4ºC y 21.130 g y se recogieron los sobrenadantes (fracción soluble citoplasmática). El extracto final se obtuvo centrifugando nuevamente 45 min a 4ºC y 130.000 g en un rotor TLA 100.4, recogiendo los sobrenadantes y filtrándolos a través de un filtro de PVDF con tamaño de poro de 0,22 μm.

A continuación, se realizó un primer paso de purificación a través cromatografía de afinidad haciendo uso del sistema Strep-Tag® (las construcciones de las LTPs incluían dos tags Strep-tag II consecutivos en la región amino terminal). Para ello se pasó el sobrenadante a través de una columna *Mobicol* (MoBiTec) previamente cargada con 100 μl

de resina *Superflow Streptactin Sepharose*® (IBA Lifesciences) dejando fluir la muestra por acción de la gravedad a temperatura ambiente. Después de lavó la columna con 15 ml de buffer de lavado (50 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 0,5 mM DTT y 2 µM de avidina) y finalmente se eluyó la proteína unida a la columna utilizando 100 µl de buffer de elución (50 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 0,5 mM DTT y 5 mM biotina).

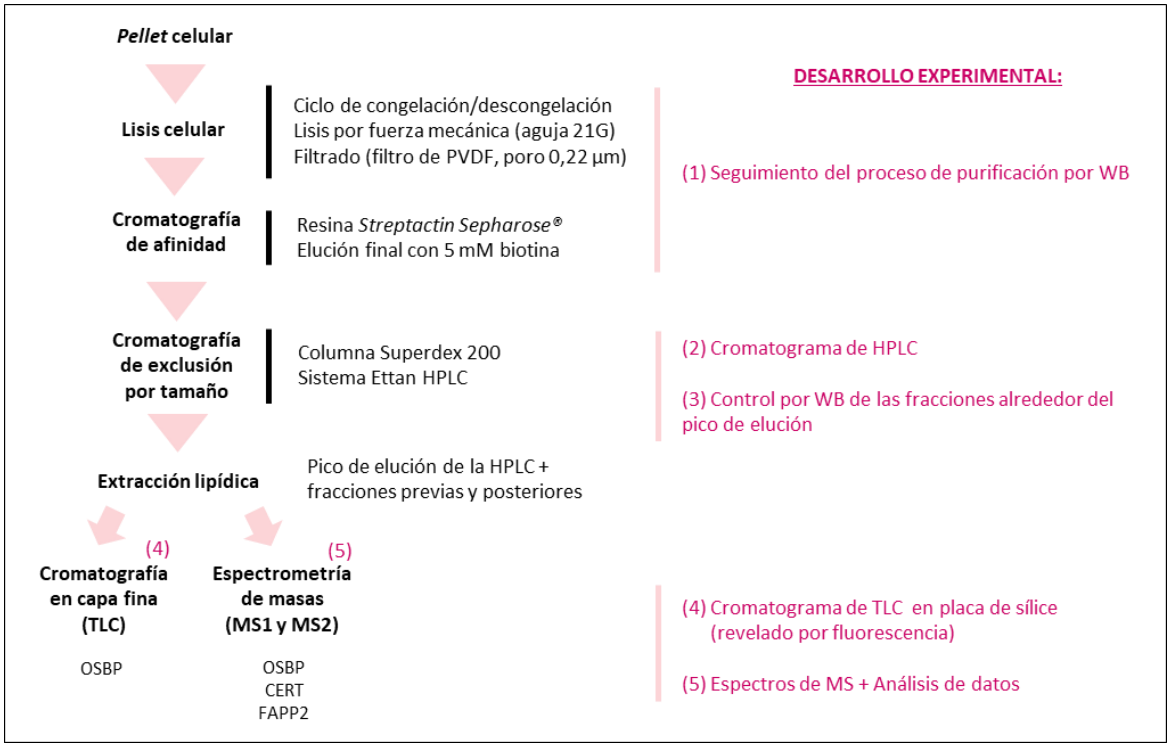


Figura 11. Esquema de los pasos del protocolo completo llevado a cabo para el estudio del cargo lipídico de las LTPs. *En la parte derecha se indican los diferentes experimentos realizados para el seguimiento de las diferentes etapas del protocolo. WB, western blot; HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia; TLC, cromatografía en capa fina; MS, espectrometría de masas.*

A continuación, se realizó un segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, *size exclussion chromatography*). Se utilizó una columna Superdex 200 3.2/300 (Invitrogen) acoplada a un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia Ettan HPLC (HPLC, *high performance liquid chromatography*) previamente lavada y equilibrada a 4ºC con buffer de filtración (500 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; pH 7,6). Utilizando un *loop* de 100 µl, se cargó la muestra en la columna de HPLC y se programó el software para eluir la muestra a una velocidad de flujo de 0.05 ml/min, recogiendo fracciones de 150 µl. La fracción correspondiente al pico de elución de la proteína de interés, así como las dos fracciones anteriores y posteriores se transfirieron a tubos limpios de cristal para su posterior análisis.

3.2. Extracción de lípidos

Para extraer los lípidos de distintos tipos de muestras, se utilizó un protocolo modificado del método Folch (Folch *et al.,* 1957). Sobre 100 µl de muestra (procedentes de la

purificación de complejos LTP-lípido, virus purificados u homogenizados celulares) se añadieron 375 µl de una solución metanol-cloroformo (2:1) utilizando una jeringuilla de cristal tipo Hamilton y se mezcló vigorosamente la muestra con un agitador tipo vórtex durante 30 s. A continuación, se añadieron 125 µl de cloroformo y se volvió a agitar durante 30 s. Finalmente, se añadieron 125 µl de una solución de NaCl 500 mM y 0,5% de ácido acético en agua, se agitó la mezcla 30 s y se centrifugó 10 min a 4ºC y 500 g para facilitar la separación de fases.

Después de la centrifugación, se transfirió la fase orgánica (fase inferior) a un vial de cristal opaco. La fase orgánica se secó en una cámara de vacío durante 2 horas a temperatura ambiente, quedando el extracto lipídico en el fondo del vial. Los lípidos secos se cubrieron con gas argón para garantizar una atmósfera inerte y evitar la oxidación de los lípidos, y se almacenaron a -20ºC hasta su utilización.

3.3. Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HP-TLC) aplicada al análisis de lípidos

Se utilizaron placas de HP-TLC Silica gel 60 de 10x10 cm (Merck) previamente lavadas con metanol:cloroformo (1:1) y activadas a 110ºC durante 30 min antes de cargar las muestras. Los extractos lipídicos secos fueron resuspendidos en 25 µl de una solución de cloroformo:metanol (2:1) y se aplicaron en forma de spray sobre las placas de HPTLC en bandas de 3 mm utilizando un aplicador automático TLC Sampler 4 (Camag) en atmósfera de N_2. A continuación, las placas se desarrollaron secuencialmente en dos mezclas de disolventes, primero en diclorometano:etilacetato:acetona (80:16:4) y a continuación en cloroformo:acetona:isopropanol: etilacetato:etanol:metanol:agua:ácido acético (30:6:6:6: 16:28:6:2) para la separación y análisis de lípidos polares y neutros (Weerheim *et al.,* 2002). A continuación, se secaron las placas en una cámara de vacío a temperatura ambiente. Para revelar las placas, se cubrieron con una solución de $CuSO_4$ al 10% (p/v) y ácido orto-fosfórico al 8% (v/v) en agua durante dos minutos y se quemaron en un horno a 145ºC durante 4,5 min. Las placas se escanearon para la detección de fluorescencia (Churchward *et al.,* 2008) utilizando un equipo Pharon FX Plus (BioRad). La lectura se hizo utilizando longitudes de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 530 nm.

3.4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) aplicada a la identificación de lípidos

3.4.1. Análisis del cargo lipídico de LTPs por LC-MS/MS

El análisis del cargo lipídico de las LTPs mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) se realizó en el Laboratorio Europeo de Biología

Molecular (EMBL-Heidelberg), siguiendo un protocolo de análisis desarrollado por el Laboratorio de Anne-Claude Gavin y bajo la supervisión del Dr. Prasad Phapale, responsable del Servicio de Metabolómica.

Después de la extracción y secado de los lípidos que transportaba cada LTP siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2., los extractos lipídicos secos se resuspendieron en 65 µl de metanol puro en el propio vial antes de llevar a cabo el análisis por espectrometría de masas (MS, '*mass spectrometry*'). También se prepararó una mezcla y diluciones seriadas de estándares lipídicos disueltos en cloroformo:metanol (2:1), estos estándares se utilizaron para comprobar la linealidad, el límite de detección y la eficiencia de extracción. Los estándares lipídicos contenían DOPC, DOPS, DOPE, DOPG, DOPA, DAG, TAG, esfingosina-1-fosfato, esfingosina, ceramida-1-fosfato, ceramida (Avanti Polar Lipids), SM, colesterol, DAG, y TAG (Merck).

Los lípidos fueron separados en un sistema Agilent 1260 HPLC formado por un degasificador, una bomba binaria y un inyector automático directamente acoplados un equipo Q-Exactive Plus. La columna utilizada fue una Kinetex 30x2,1 mm; 2,6 µm, C18 100 Å (Phenomenex). Se utilizó un sistema binario de solventes para separar los lípidos, una fase móvil A formada por una solución de acetonitrilo:agua (40:60), 10 mM formiato amónico y 0,1 % ácido fórmico; y una fase móvil B formada por isopropanol:acetonitrilo (90:10), 10 mM formiato amónico y 0,1% ácido fórmico.

La separación se inició con un 80 % del buffer A (hidrofílico) y 20 % del buffer B (hidrofóbico) y se fue incrementando la concentración del buffer B en gradiente, terminando la carrera con un porcentaje del buffer B del 97 % después de 24 min.

El eluido se introdujo directamente en la fuente de ionización por *electrospray* del espectrómetro de masas. El voltaje de ionizador se estableció en 1,7 kV. El espectrómetro de masas se operó en modo de polaridad positivo, en un rango de masas de 250 a 1.600 m/z. Los diez picos (TOP 10) más abundantes se seleccionaron y fragmentaron en MS2 a tiempo real por un disociador HCD (del inglés, '*higher-energy C-trap dissociation*'). La energía de colisión normalizada fue 30. La resolución de MS1 fue establecida en 70.000 a 200 m/z, mientras que para MS2 fue de 17.500 a 200 m/z. Se utilizaron los mismos parámetros cuando se operó en modo de polaridad negativo.

Para la identificación de lípidos, los datos crudos del espectrómetro de masas se convirtieron a formato .mzML con el software ProteoWizard (versión 3.0.679) y se extrajeron los valores correspondientes a los perfiles de espectrometría de masas (MS) con el software Peaks Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). Los picos seleccionados como

positivos se buscaron manualmente en la base de datos SwissLipids y se interpretaron manualmente los espectros MS2 cotejándolos con espectros existentes de cada especie de lípido para validar la búsqueda en la base de datos. El análisis del cargo lipídico de las LTPs a partir de los resultados de espectrometría de masas se llevaron a cabo gracias en colaboración con el Dr. Kevin Titeca, perteneciente a la Unidad de Biología estructural del EMBL-Heidelberg.

3.4.2. Análisis de lípidos de muestras de extractos celulares y virus purificados

En el caso de las muestras procedentes de virus purificados y extractos celulares, el análisis de lípidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS, *liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*) se realizó en colaboración con la Dra. Josefina Casas, responsable científica del Servicio de Lipidómica del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, IQAC-CSIC.

El análisis LC-HRMS se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento Acquity (Waters, EEUU.) Conectado a un detector de tiempo de vuelo (LCT Premier XE). Se adquirió espectro completo de 50 a 1.800 Da y se sumaron los espectros individuales para producir paquetes de datos cada 0,2 s. Los extractos de lípidos se inyectaron en la columna Acquity UHPLC BEH C8 (100 mm x 2,1 mm, y tamaño de partícula de 1,7 µm, Waters, Irlanda) a un caudal de 0,3 ml/min y una temperatura de columna de 30ºC. Las fases móviles fueron (A) metanol con formiato de amonio 2 mM y 0,2% de ácido fórmico, y (B) agua con formiato de amonio 2 mM y 0,2% de ácido fórmico.

Se programó y aplicó el siguiente gradiente lineal: en el punto de partida (0 min): 20% de B; 3 min: 10% de B; 6 min: 10% de B; 15 min: 1% de B; 18 min: 1% de B; 20 min: 20% de B; y en el punto final (22 min): 20% de B.

La identificación positiva de los compuestos se basó en la medida precisa de la masa con un error <5 ppm y su tiempo de retención en la LC, en comparación con el de un estándar. Y la cuantificación se llevó a cabo utilizando el cromatograma iónico extraído de cada compuesto, usando una ventana de 50 mDa. El rango dinámico lineal se determinó inyectando mezclas de estándares internos y naturales como se indicó previamente. Dado que los estándares para todos los lípidos identificados no estaban disponibles, las cantidades de lípidos se dan como equivalentes de pmol en relación con cada estándar específico.

Los valores obtenidos en el análisis de lipidómica por espectrometría de masas se normalizaron en función de la cantidad de proteína/muestra, cuantificada previamente mediante el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce® (ThermoFisher Scientific).

3.5. Cuantificación de colesterol

El colesterol total de células HEK293T control e infectadas se determinó a partir de los extractos lipídicos obtenidos siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.2. y utilizando el kit comercial *Amplex Red Cholesterol Assay Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en una secuencia de reacciones enzimáticas que permiten detectar tanto el colesterol libre como los ésteres de colesterol de una muestra. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa en colesterol, que después es oxidado por la enzima colesterol oxidasa para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el correspondiente producto cetónico. El H_2O_2 es detectado a continuación utilizando 10-acetil-3,7-dihydroxifenoxazina (reactivo Amplex® Red), una sonda muy estable y sensible al H_2O_2. En presencia de peroxidasa de rábano (HRP), el reactivo Amplex® Red reacciona con el H_2O_2 con una estequiometría 1:1 para producir el compuesto fluorescente resorufina, con una longitud de onda de excitación de 545 nm y de detección de 590 nm.

3.6. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección

3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS) es una técnica de rutina ampliamente utilizada para la separación de las proteínas existentes en una muestra biológica dependiendo de su masa molecular. En presencia de SDS las proteínas se desnaturalizan y adquieren una carga negativa proporcional a su masa, que posibilita la migración diferencial de las mismas en función de su masa cuando son sometidas a un campo eléctrico.

Las electroforesis se realizaron siguiendo un protocolo estándar. En primer lugar, se lisaron las células y se extrajo el contenido proteico utilizando buffer de lisis RIPA Pierce® (ThermoFisher, Cat# 89900) con inhibidores de proteasas (Roche), y se cuantificó la cantidad de proteínas totales en cada muestra el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce® (ThermoFisher). A continuación, las muestras se mezclaron con buffer de aplicación Laemmli 4X (BioRad, Cat# 1610747) y se incubaron 10 min a 95ºC para asegurar la desnaturalización completa de las proteínas. Las muestras se cargaron y corrieron en geles de poliacrilamida discontinuos (con una fase concentrante al 4% y una fase separadora al 10% de acrilamida), aplicando un amperaje constante de 25 mA/gel en un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). Las bandas de proteínas resultantes se revelaron mediante tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 (BioRad, Cat# 1610803), y se calcularon las masas moleculares de las proteínas separadas mediante comparación

con el marcador estándar de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color® (BioRad, Cat# 1610374).

*3.6.2. Electrotransferencia e inmunodetección (*western blot*)*

Para identificar y cuantificar mediante inmunoensayo proteínas específicas presentes en las muestras biológicas previamente separadas por electroforesis en geles de PAGE-SDS, se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDV empleando un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (BioRad).

A continuación, se llevó a cabo un protocolo de inmunomarcaje estándar con un anticuerpo primario para la detección de la proteína de interés y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*), y visualizando las membranas por ECL en un sistema ChemiDoc (BioRad). Se utilizó como control de carga un anticuerpo anti-tubulina conjugado con HRP (BioRad, MCA77P). La cantidad relativa de las proteínas se cuantificó utilizando el software ImageLab (BioRad, RRID:SCR_014210).

3.7. Extracción de RNA total y RT-PCR

Para el estudio de la expresión de diferentes genes a nivel de tránscrito primario se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Se levantaron las células a estudiar con EDTA 5mM en PBS y se lavaron una vez con PBS. Se purificó el RNA total utilizando el kit comercial RNeasy mini Kit (Qiagen), y se determinó la pureza y concentración del RNA midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFischer Scientific).

Para el estudio por RT-PCR semicuantitativa, primero se generaron los cDNAs empleando 1 µg de RNA total por muestra, dNTPs 0,4 µM y 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Cat# M1701) en un único ciclo de 1 h a 42ºC. Para el paso de amplificación por PCR se tomaron 2 µl del cDNA obtenido en el paso anterior, los cebadores correspondientes a una concentración 0,25 µM, dNTPs 0,4 µM y 1U de la DNA polimerasa Herculasa II (Agilent) diluidos en el buffer de la propia DNA polimerasa recomendado por el fabricante. Las condiciones de los ciclos fueron: un primer ciclo de 1 min a 95ºC, seguido de 30 ciclos de 20 s a 95ºC (desnaturalización), 20 s a 54ºC (hibridación) y 1 min a 68ºC (extensión), y un último ciclo de extensión final de 4 min a 68ºC. A continuación, las muestras se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE, y se visualizaron con la sonda SYBR Safe® (ThermoFisher Scientific) en un sistema de revelado GelDoc XR (BioRad). Los productos de PCR se cuantificaron utilizando el software ImageLab® (BioRad).

Para realizar las PCRs cuantitativas a tiempo real (RT-qPCR), el cDNA se sintetizó utilizando los reactivos para la RT Taqman (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante, y las RT-qPCRs se realizaron por triplicado para cada muestra utilizando la mezcla comercial de reactivos iQ SYBR green Supermix (BioRad) y los cebadores indicados en la Tabla 2, utilizando un sistema de detección a tiempo real iCycler (BioRad). Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen GAPDH como control interno.

Tabla 2. *Secuencias de los cebadores directos y reversos (forward/reverse primers) utilizados como iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, durante el desarrollo experimental del trabajo.*

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO
SREBP1a	3'-GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT-5'	3'-CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC-5'
SREBP1c	3'-TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG-5'	3'-CATGTCTTCGATGTCGGTCAG-5'
SREBP2	3'-AACGGTCATTCACCCAGGTC-5'	3'-GGCTGAAGAATAGGAGTTGCC-5'
FASN	3'-ACAGGGACAACCTGGAGTTCT-5'	3'-CTGTGGTCCCACTTGATGAGT-5'
SCD	3'-AACTTGATACGTCCGTGTGTCCCA-5'	3'-CTGTATGTTTCCGTGGCAATGCGT-5'
MFN2	3'-ATGTCCCTGCTCTTCTCTCGATGC-5'	3'-CTTAGAGTTGGGCCACATCACACTC-5'
GAPDH	3'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-5'	3'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-5'
ACTB	3'- CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-5'	3'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-5'

4. Microscopía óptica de fluorescencia

4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IF)

La inmunofluorescencia es una técnica que utiliza anticuerpos acoplados a fluoróforos para detectar y localizar antígenos específicos en células y tejidos.

Para el estudio por microscopía óptica de fluorescencia de las distintas condiciones experimentales, se crecieron las células sobre cubreobjetos de cristal y se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X.

Para el marcaje con anticuerpos, las células se permeabilizaron durante 10 min con saponina al 0,25% en PBS. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos incubando las células durante 30 min en buffer PBS-saponina 0,25% y FBS 2%. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h o a 4ºC durante 16 h con los anticuerpos primarios a la dilución adecuada en buffer PBS-saponina al 0,25% y FBS 2%. Después se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X, y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a un fluoróforo y diluidos en PBS-saponina 0,25% y FBS 2%, durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X en oscuridad. Para marcar los núcleos, se realizó una incubación con DAPI a una dilución 1:500 en PBS 1X durante 15 min

a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, se lavó 3 veces con PBS y se procedió al montaje de los cubreobjetos con Prolong Gold® sobre portaobjetos.

Los análisis de las muestras se llevaron a cabo utilizando los microscopios ópticos de fluorescencia Leica DMi8 S (microscopio de campo amplio), Leica TCS SP5, Leica TCS SP8 y Leica STELLARIS 5 (microscopios confocales) del Servicio de Microscopía Óptica Avanzada del Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC.

4.2. Video-microscopía de células vivas

La dinámica del *network* mitocondrial durante la infección del virus BUNV se visualizó en células vivas a tiempo real con un microscopio Leica DMi8 S de epifluorescencia de campo amplio con sistema de incubación acoplado (37ºC, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa).

Para ello, se sembraron células Vero a baja confluencia en placas µ-Dish de 35 mm de diámetro y fondo de cristal (ibidi®), y se infectaron con el virus rBUNGc-eGFP a una MOI de 5 PFU/célula. Se decidió aumentar la MOI debido a que este virus recombinante, al contener una proteína Gc truncada y fusionada a GFP presentaba una dinámica de infección más lenta. Pasada la hora de adsorción viral, las células se cargaron durante 45 min con MitoTracker® Red FM (ThermoFisher Scientific) a una concentración final de 250 nM en medio DMEM sin rojo fenol y suplementado con 2% de FBS. Pasado ese tiempo se retiró el medio con MitoTracker, se añadió medio DMEM sin rojo fenol fresco y las placas se llevaron al microscopio. Se adquirieron imágenes automáticamente cada 30 minutos durante 24 hpi. A partir de las imágenes obtenidas se procesaron los vídeos *time-lapse* utilizando el software LASX (Leica).

4.3. Análisis y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de campo amplio, planos confocales y video-microscopía se analizaron y cuantificaron con los programas informáticos Leica Application Suite X (LASX, Leica Microsystems, RRID:SCR_013673) e ImageJ/Fiji (Schindelin *et al.,* 2012).

Para la reconstrucción 3D a partir de secciones ópticas obtenidas con el microscopio confocal Leica TCS SP5, se tomaron secciones secuenciales de todo el volumen de la célula, obteniendo entre 40 y 50 planos confocales solapantes a intervalos de 0,15 µm en el eje z. Los planos fueron procesados posteriormente con el software Imaris® 8.0 (RRID: SCR_007370, Bitplane, EEUU.). Permitiendo segmentar los volúmenes y las superficies 3D del *network* mitocondrial, el núcleo celular y las factorías virales de BUNV, y observar la relación tridimensional del network mitocondrial con las factorías de BUNV.

5. Microscopía electrónica de transmisión

5.1. Inclusión en resina para el estudio de la ultraestructura de monocapas celulares

La ultraestructura celular hace referencia a todas aquellas estructuras celulares que se encuentran por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, como las membranas de los diferentes orgánulos, ciertas estructuras citosólicas, complejos moleculares, y los virus, siendo necesario recurrir al microscopio electrónico de transmisión o TEM para visualizarlas a alta resolución.

Para el estudio de la ultraestructura celular en diferentes condiciones experimentales, se crecieron las células sobre cubreobjetos circulares de cristal y se fijaron con una mezcla de PFA al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer HEPES durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados con HEPES y las muestras se incubaron con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% y ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) al 0.8% durante 1 h a 4ºC en oscuridad. A continuación, las células se lavaron 4 veces con HEPES y se procedió a la deshidratación para sustituir el agua celular por un disolvente miscible con la resina. Para la inclusión en resina epoxi, se utilizó un gradiente de deshidratación con concentraciones crecientes de acetona (50%, 70%, 90% y 2x 100%), incubando las muestras durante 5 min a 4ºC en cada paso de deshidratación.

Después de la deshidratación, las muestras se infiltraron con una mezcla de acetona y resina epoxi-EML-812 (TAAB Laboratories Ltd.) en proporción 1:1 incubándose 8 h a temperatura ambiente. A continuación, se colocaron los cubreobjetos sobre portas, se cubrieron las muestras con unas gotas de resina epoxi-EML-812 100% y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se colocaron dos cápsulas BEEM (Ted Pella Inc.) rellenas de resina 100% sobre cada cubreobjetos, se incubaron las muestras durante 8 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se incubaron las muestras en un horno a 60ºC durante 72 h para polimerizar la resina.

5.2. Obtención de secciones ultrafinas orientadas

Debido a que las células habían sido crecidas y procesadas sobre cubreobjetos, en primer lugar, se procedió a desprender la cápsula BEEM calentando ligeramente la base del cubre. De esta forma, las células incluidas en resina epoxi pasaron a estar en la superficie lisa de la cápsula. Posteriormente, el frente de corte fue tallado manualmente con una cuchilla de acero para que tuviera forma de trapecio. Finalmente, estos frentes se procesaron en un ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica Microsystems GmbH) con una cuchilla de diamante de 45º de inclinación (Diatome Ltd., Beil, Suiza), cortando la muestra de forma orientada

paralelamente a la base celular, y obteniendo secciones ultrafinas de aproximadamente 50-70 nm de grosor.

Las secciones ultrafinas obtenidas se recogieron de la superficie utilizando un asa de hilo fino *Perfect Loop* (Diatome Ltd.), y se depositaron en rejillas circulares de cobre de 3 mm de diámetro y 200-300 *mesh* (rejillas de 200-300 aberturas cuadradas por pulgada) (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido).

5.3. Tinción de secciones para microscopía electrónica

Para estudios de ultraestructura, las rejillas de ME con las secciones ultrafinas de las células a estudiar, se incubaron en una gota de acetato de uranilo saturado durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, se lavaron con 4 gotas de agua Mili-Q y se incubaron con citrato de plomo durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, las rejillas se lavaron con 4 gotas de agua Mili-Q y se dejaron secar completamente antes de llevarlas al microscopio electrónico para su estudio.

5.4. Tinción negativa de virus

La tinción negativa es una técnica de microscopía que permite contrastar las muestras de partículas aisladas pequeñas, como complejos moleculares, vesículas o virus, mediante una sustancia opaca al haz de electrones transmitidos (como el acetato de uranilo) permitiendo distinguir su ultraestructura con detalle.

Para realizar la tinción negativa de virus BUNV purificados, se ionizaron rejillas de cobre cubiertas con plástico *formvar* (TAAB Laboratories) al 0,5 % y sombreadas con carbón en una unidad de descarga iónica Leica EM MED 020. A continuación, las rejillas ionizadas se depositaron sobre una gota de la suspensión de los virus purificados a analizar durante 2 min. Después se lavaron con agua Mili-Q y se incubaron con acetato de uranilo al 2% durante 30 s a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de líquido con papel de filtro y se dejaron secar.

El estudio de las rejillas por TEM se realizó con un microscopio Jeol JEM 1011 a un voltaje de 100 kV. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara CCD *ES1000W Erlangshen* (modelo 785, Gatan Inc., EEUU.) acoplada al microscopio.

5.5. Inmunomarcaje de criosecciones mediante el método de Tokuyasu

La técnica de Tokuyasu (Tokuyasu, 1973; Sachse *et al.,* 2018) permite el marcaje de antígenos con anticuerpos específicos en criosecciones para la identificación y localización de proteínas a nivel molecular dentro del entorno celular mediante microscopía electrónica.

Este método evita la deshidratación de la muestra y su inclusión en resina, permitiendo una preservación óptima de proteínas.

Para determinar la localización de OSBP mediante la técnica de Tokuyasu durante la infección, se sembraron células 293T-OSBP y se indujo la sobreexpresión de esta LTP añadiendo tetraciclina 2 μg/ml durante 36 h. Para las muestras en condiciones de infección, 8 horas antes de recoger las células se añadió virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula según el protocolo estándar. Se realizó una prefijación con 2% PFA sin retirar el medio de cultivo durante 10 min y, a continuación, las células se fijaron con 4% PFA en buffer HEPES 0.1 M durante 2 h. Tras la fijación se realizan 3 lavados con PBS y se incubaron 5 min con cloruro de amonio (NH_4Cl) 50 mM para bloquear los grupos aldehído libres. Se recogieron las células en 1,5 ml de gelatina al 1% en PBS, se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de gelatina al 12% en PBS y se incubó 10 min a 37ºC. Después se centrifugaron las células, se descartó el sobrenadante, y los pellets incluidos en la gelatina se solidificaron incubando en hielo durante 15 min. Los bloques resultantes se cortaron en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm^3 y se incubaron 15 h en sacarosa 2,2 M a 4ºC. Estos bloques de células incluidas en gelatina se montaron sobre soportes especiales y fueron congelados en nitrógeno líquido.

Posteriormente, los bloques se tallaron a -90ºC y se obtuvieron las secciones ultrafinas (50-70 nm) a -120ºC utilizando una cámara que permitía trabajar en estas condiciones de temperatura acoplada a un ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica). Las criosecciones se recogieron en una gota de una mezcla de sacarosa:metilcelulosa 1:1 utilizando un *loop*, y se depositaron sobre rejillas de cobre de 200 mesh con una capa de plástico *formvar* al 0,5% y carbón.

Para el inmunomarcaje, las rejillas se incubaron secuencialmente en PBS 1X a 37ºC durante 25 min (para eliminar los restos de sacarosa:metilcelulosa), en PBS-NH_4Cl 50 mM a temperatura ambiente durante 2 min (para bloquear los grupos aldehído libres), y en PBS-BSA 1% a temperatura ambiente durante 5 min (para bloquear las uniones inespecíficas). A continuación, se incubaron con un anticuerpo primario anti-HA para localizar la proteína OSBP (dilución 1:50 en PBS-BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Después se realizaron 5 lavados con PBS-BSA 0,1% y 5 lavados adicionales con PBS-BSA 1%, y se incubaron las rejillas con un anticuerpo secundario producido en cabra contra la IgG de conejo y conjugado con nanopartículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (dilución 1:50 en PBS-BSA 1%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las rejillas fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1% y 3 veces con PBS 1X. Finalmente, las rejillas se incubaron 5 min en glutaraldehído 1%, se lavaron 9 veces con agua Mili-Q y se incubaron 5

min con acetato de uranilo:metilcelulosa (1:9) en hielo. Las rejillas se estudiaron mediante TEM con un microscopio Jeol JEM 1011 a un voltaje de 100 kV, obteniendo imágenes con una cámara CCD ES1000W Erlangshen (modelo 785, Gatan Inc., EEUU.) acoplada al microscopio.

4

Resultados

1. Descripción de las factorías virales del virus Bunyamwera en células 293T y Vero

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se había caracterizado en detalle la estructura y función de la factoría viral que ensambla el virus Bunyamwera (BUNV) en células BHK21 de hámster (Fontana *et al.,* 2008). En la naturaleza, el huésped final del virus BUNV es el ser humano. Por este motivo, para el presente trabajo se decidieron utilizar la línea celular la línea celular HEK293T o 293T de origen humano; y la línea celular Vero procedente de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*), más cercana evolutivamente al ser humano en comparación con las células BHK21. Las células Vero se utilizan frecuentemente para el estudio de antivirales, y en nuestro laboratorio ya contábamos con datos previos de la dinámica de la infección y la biogénesis de las factorías virales del BUNV en esta línea celular (García-Serradilla y Risco, 2021; Salanueva *et al.,* 2003).

1.1. Dinámica de la infección del BUNV en células 293T y Vero

Para caracterizar las diferencias en la infección del BUNV entre las dos líneas celulares, en primer lugar, se realizó una dinámica tanto de la progresión del porcentaje de células infectadas como de la producción de virus extracelulares infectivos. Se sembraron las células 293T y Vero y, cuando alcanzaron una confluencia cercana al 90%, se infectaron a una MOI de 1 PFU/célula. Se tomaron muestras a tiempos post infección crecientes, procesando por separado los sobrenadantes o medios de cultivo y las monocapas celulares. Las células se fijaron y procesaron para su estudio por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína viral Gc como marcador de la infección y la sonda DAPI para marcar los núcleos celulares. Se calculó el porcentaje de infección a partir del número de células que presentaban señal positiva de Gc respecto a las células totales (Figura 12A). A partir del medio de cultivo, mediante ensayo de placas de lisis se determinó el título viral expresado en PFU/ml (Figura 12B).

En las dos líneas celulares, se observó señal de Gc a partir de las 4 horas post-infección (hpi), coincidiendo con el tiempo que tarda el virus en realizar un ciclo de replicación (Salanueva *et al.,* 2003). La dinámica de infección resultó ser más rápida en células Vero, en las que a partir de las 12 hpi se alcanzaba aproximadamente el 100% de infección de la monocapa, mientras que en las células 293T no se lograba este porcentaje hasta las 20 hpi. En cuanto a la producción de virus extracelulares, en ambas líneas se obtuvo un título viral máximo en el medio extracelular del orden de 10^8 PFU/ml. Si bien es cierto que en las células 293T la producción de virus también fue más lenta, de forma paralela a lo que sucedía con el porcentaje de células infectadas. Además, cabe mencionar

que se observó un fuerte efecto citopático y muerte celular a partir de las 36 hpi tanto en células Vero como en 293T.

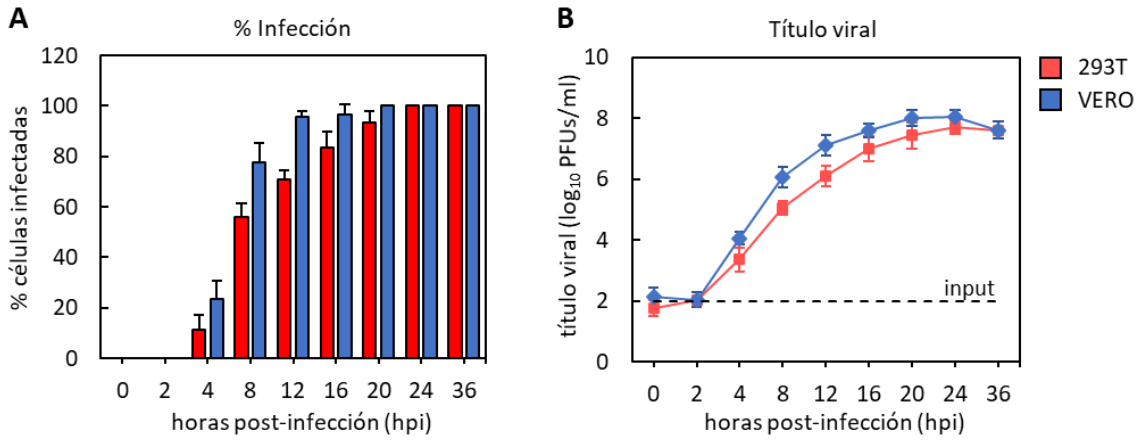


Figura 12. Dinámica de infección y curvas de crecimiento del BUNV en células 293T y Vero. *Se infectaron células 293T y Vero con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y se recogieron muestras a tiempos crecientes post-infección (2-36 hpi). Se calculó el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando como marcador de infección un anticuerpo primario contra la proteína de la nucleocápside N del BUNV (A), y se determinó el título viral en el medio extracelular mediante ensayo de placas de lisis a esos mismo tiempos post-infección (B). Se muestra el resultado de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.*

A las 8 hpi se consiguió entre un 60 y un 80% de células infectadas, y un título viral en el medio extracelular del orden de 10^5 y 10^6 PFU/ml en células 293T y Vero, respectivamente. A este tiempo post-infección, la curva de crecimiento del BUNV indicaba que ya había liberación de nuevos virus antes de que las células hayan sufrido un daño importante. Por lo que consideramos que el estudio de la infección a este tiempo de infección tendría ventajas para estudiar los efectos y estructuras producidas por el virus antes de que se observe efecto citopático.

1.2. Estudio de la infección mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica

Continuando con el estudio de la infección del BUNV en células 293T y Vero, se llevó a cabo la caracterización de las células infectadas mediante microscopía de fluorescencia (MF) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello, las células se infectaron con el virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Las células se estudiaron mediante MF utilizando un anticuerpo frente a la glicoproteína Gc de la envuelta del BUNV, que proporciona un marcaje que se corresponde con las factorías virales y virus en vesículas de secreción; y marcadores de distintos orgánulos membranosos: anti-gigantina para la región *cis*-media del aparato de Golgi, anti-TGN46 para el *network trans*-Golgi, anti-PDI para el retículo endoplásmico (RE), y anti-TOMM22 para marcar las mitocondrias. Las factorías virales también se estudiaron mediante ME. Para ello se obtuvieron secciones ultrafinas

orientadas paralelas a la base celular, lo que permitió correlacionar las estructuras observadas por TEM con las imágenes obtenidas por MF.

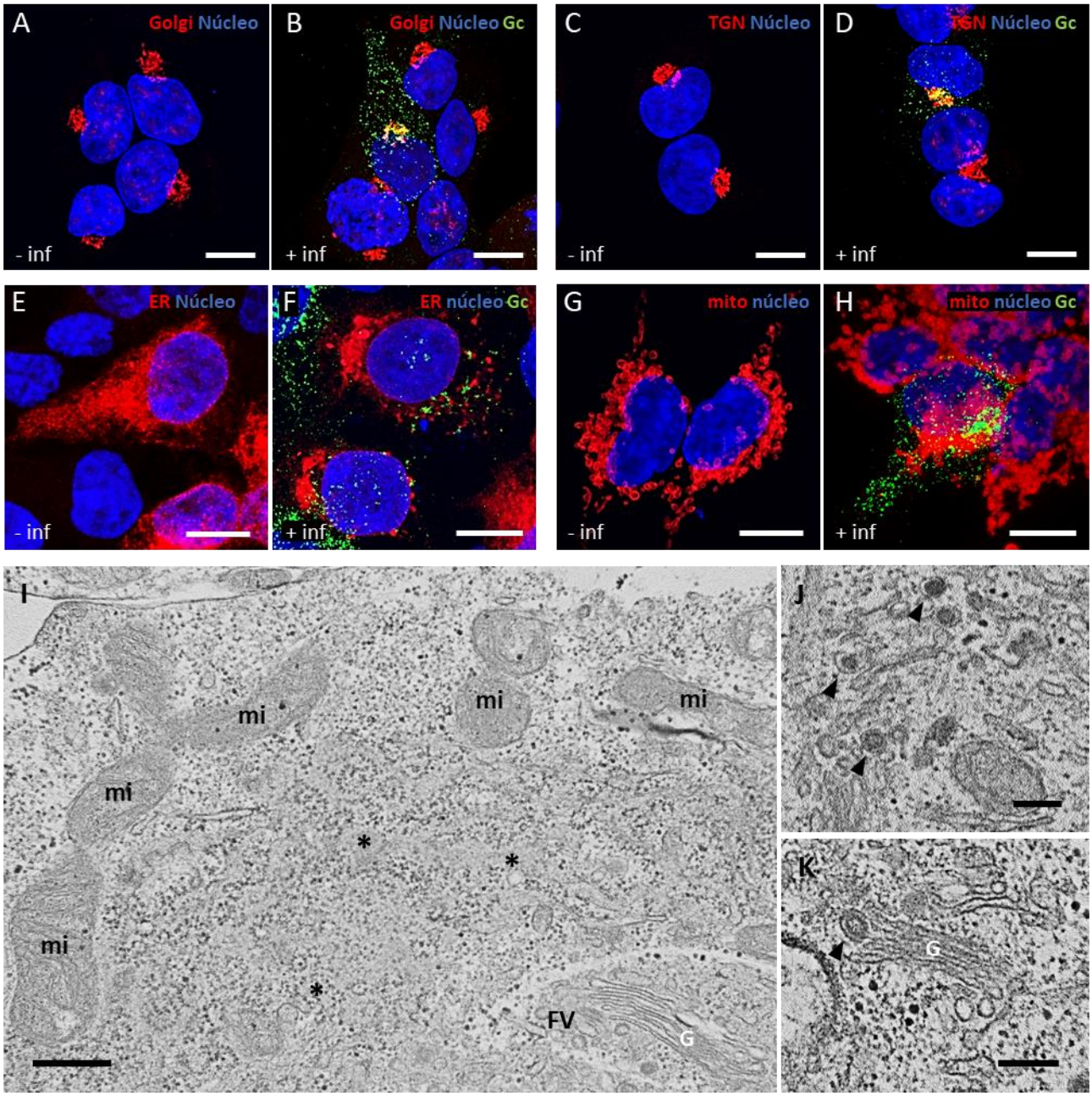


Figura 13. Estudio mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de células 293T infectadas con BUNV. *(A-H) Proyecciones de secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal de células 293T control (A, C, E y G) o infectadas con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (B, D, F y H). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul), las factorías virales con un anticuerpo primario anti-Gc (verde), y se utilizaron diferentes marcadores de compartimentos celulares: (A-B) marcaje de cis-medial Golgi con anticuerpo primario anti-gigantina (rojo); (C-D) marcaje del network trans-Golgi con anticuerpo primario anti-TGN46 (rojo); (E-F) marcaje de retículo endoplásmico con anticuerpo primario anti-PDI (rojo); (G-H) marcaje de mitocondrias con anticuerpo primario anti-TOMM22 (rojo). (I-K) Imágenes de secciones ultrafinas de células 293T infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi, incluidas en resina epoxi EML-812 y estudiadas por TEM. (I) Corte orientado de una célula en la que se puede observar un plano de la factoría viral (FV), una masa de retículo endoplásmico rugoso modificado que recuerda a la estructura de las convoluted membranes (*) descrita durante la infección de otros virus RNA, y un reclutamiento de mitocondrias (mi) alrededor. (J-K) Orgánulos de replicación (ORs) en los que pueden identificarse los característicos dominios globulares o esférulas, en las que tiene lugar la replicación viral (señalados con puntas de flecha negras), ensamblados en las membranas del Golgi (G). Barras de escala: 10 µm en A-H, 400 nm en I, y 200 nm en J-K.*

En las células 293T, el estudio mediante MF mostró que la glicoproteína Gc del BUNV coincidía con la señal de los anticuerpos anti-gigantina y anti-TGN46 (Figura 13A-D), indicando que la factoría viral en esta línea celular también se establece a partir de las membranas del aparato de Golgi, que permanece compacto y no se disgrega durante la infección al igual que sucedía en otras líneas celulares como BHK21. Además, durante la infección se apreció un reclutamiento de las mitocondrias a zonas yuxtanucleares, y una condensación y pérdida de la estructura reticular característica del RE (Figura 13E-H). Estos datos se correspondieron con los resultados obtenidos por MET, el virus BUNV establecía una factoría viral muy estructurada en células 293T: el aparato de Golgi permanecía compacto con numerosas esférulas en las que tiene lugar la replicación viral (Figura 13J-K), en torno a este orgánulo de replicación se localizaron grandes agregados de membranas procedentes del retículo endoplásmico rugoso, que se encontraba modificado en forma de ovillos con una estructura que se asemejaba a las *convoluted membranes* descritas durante la infección de otros virus RNA. También se observó un reclutamiento de mitocondrias alrededor de la factoría viral (Figura 13I).

En el caso del estudio por MF utilizando células Vero, el marcaje con anticuerpos anti-gigantina y anti-TGN46 mostraron que el Golgi se fragmentaba durante la infección. La señal de Gc coincidía con las señales de gigantina y de TGN46, observándose un patrón punteado totalmente diferente al Golgi compacto en posición yuxtanuclear de las células control (Figura 14A-D). Durante la infección de células Vero también se observó un RE modificado que perdía su estructura reticular, agregándose en estructuras más compactas y globulares posiblemente relacionadas con lo que se conoce como estrés de retículo (Figura 14F). Adicionalmente, las mitocondrias también fueron reclutadas a las factorías virales al igual que sucedía en las células 293T. En el estudio de células infectadas por TEM se encontró un gran número de estructuras de origen viral como las esférulas en las que se establecen los complejos de replicación (Figura 14J). Además, el citoplasma de células infectadas era poco denso a los electrones y varios orgánulos membranos presentaban diferentes modificaciones: (1) el aparato de Golgi se encontraba fragmentado formando factorías virales pequeñas dispersas por el citoplasma o "*mini factorías*", tal y como se había descrito previamente para esta línea celular (Salanueva *et al.*, 2003; García Serradilla y Risco, 2021); (2) se encontraron estructuras formadas por agregados de RE compatibles con los acúmulos observados mediante MF (Figura 14L); y (3) las mitocondrias alteradas eran más densas a los electrones, se encontraban hinchadas y poseían alteraciones morfológicas en las crestas mitocondriales (Figura 14K).

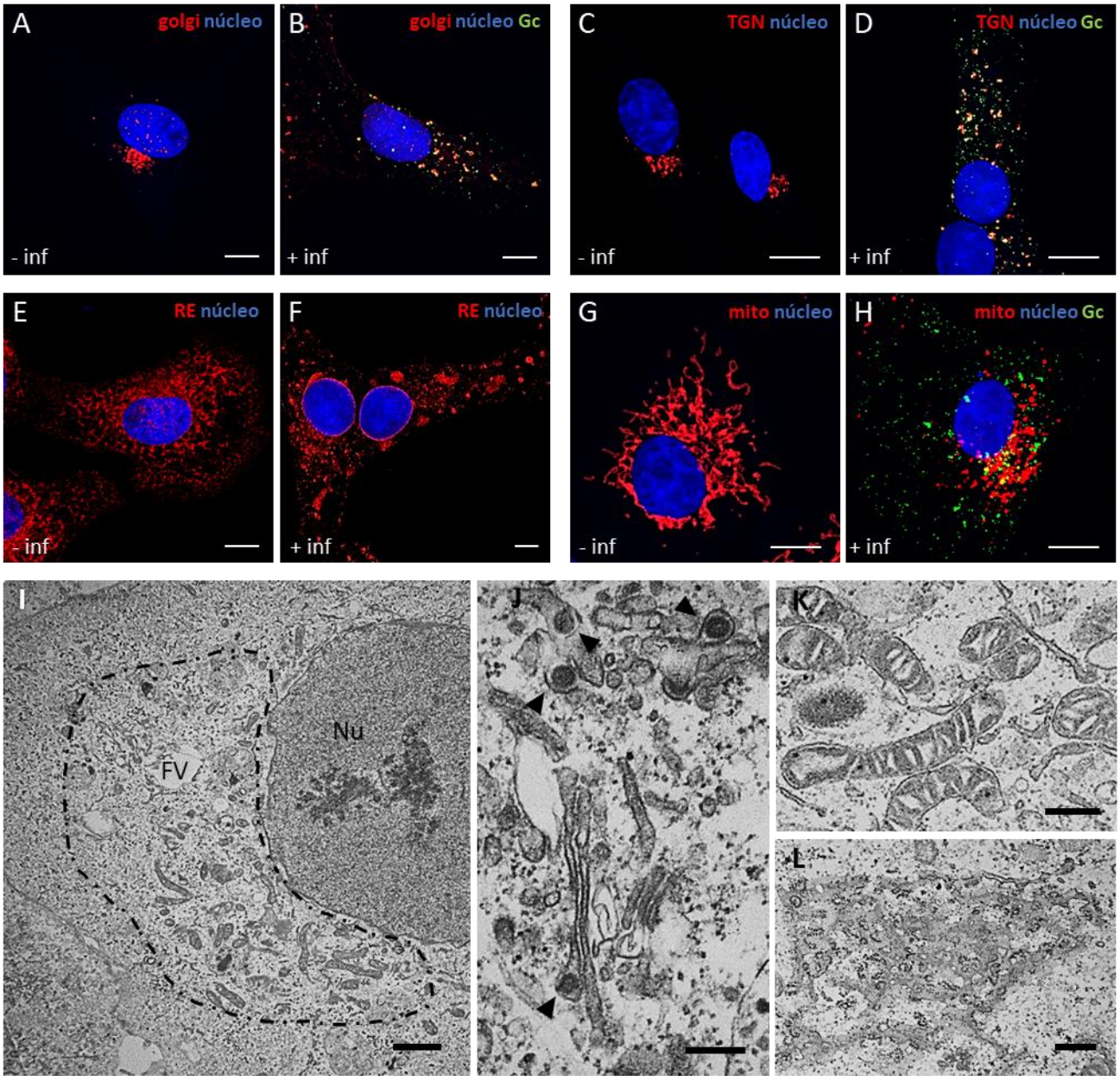


Figura 14. Estudio mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de células Vero infectadas con BUNV. *(A-H) Proyecciones de secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal de células Vero control (A, C, E y G) o infectadas con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (B, D, F y H). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul), las factorías virales con un anticuerpo primario anti-Gc (verde), y se utilizaron diferentes marcadores de compartimentos celulares: (A-B) marcaje de cis-medial Golgi con anticuerpo primario anti-gigantina (rojo); (C-D) marcaje del network trans-Golgi con anticuerpo primario anti-TGN46 (rojo); (E-F) marcaje de retículo endoplásmico con anticuerpo primario anti-PDI (rojo); (G-H) marcaje de mitocondrias con anticuerpo primario anti-TOMM22 (rojo). (I-L) Imágenes de secciones ultrafinas de células Vero infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi, incluidas en resina epoxi EML-812, y estudiadas por TEM. (I) Corte orientado de una célula en la que se puede observar un plano de la factoría viral (FV). (J) Detalle de una factoría viral en donde pueden observarse varios complejos replicativos (puntas de flecha negras) ensamblados en Golgi. (K) Detalle de un grupo de mitocondrias con alteraciones en sus crestas a consecuencia de la infección. (L) Estructura derivada del retículo endoplásmico característica de la infección por BUNV en células Vero. Barras de escala: 10 µm en A-H; 2 µm en I; 400 nm en J-L.*

Al igual que sucede durante la infección de la mayor parte de virus RNA, el BUNV se replica en compartimentos membranosos de la célula. En este trabajo se ha descrito por primera vez que las células 293T, de origen humano, son permisivas a la infección por el BUNV. En esta línea celular las factorías virales se desarrollan a partir del aparato de Golgi, sin que

este se disgregue como sucedía en células Vero, presentando una ultraestructura semejante a las factorías descritas previamente en células BHK21 de hámster.

2. Estudio de la composición lipídica durante la infección

La revolución de los últimos años en las técnicas y protocolos de análisis mediante espectrometría de masas ha permitido el estudio de moléculas pequeñas y metabolitos más allá de proteínas y péptidos, entre ellos la identificación y cuantificación de lípidos o lipidómica.

Se llevó a cabo un estudio comparativo de la composición lipídica global de células 293T infectadas por el virus BUNV frente a células 293T control. Asimismo, se estudió el lipidoma viral, es decir, la identificación y cuantificación de los lípidos que forman parte de la propia envuelta del virus.

2.1. Preparación de virus purificados y muestras celulares

Para obtener una muestra enriquecida en partículas virales y con una concentración suficientemente elevada para el estudio de lipidómica mediante espectrometría de masas, se realizó una amplificación y purificación del virus BUNV. Para cada muestra, se infectaron 20 placas P150 de células 293T a una MOI de 0,001 PFU/célula y se incubaron en medio DMEM con 2% de FBS durante 55 h a 33ºC. A partir del medio de cultivo, se purificó el virus extracelular producido. Primero, se pasó el sobrenadante a través de un colchón de sacarosa al 30% (p/v) para limpiar y concentrar la muestra y, a continuación, se cargó en un gradiente de densidad de Optiprep® (13-22%). Desde la parte superior del tubo de centrifugación se recogieron fracciones hasta alcanzar la banda del virus purificado (Figura 15A).

El proceso de purificación se siguió mediante electroforesis y *western blot* detectando la proteína viral N (Figura 15B). Se obtuvieron virus BUNV en las fracciones F26, F27, F28 y F29, siendo especialmente abundante en las tres primeras; y se analizaron mediante tinción negativa y ME como muestra la Figura 15C. La abundancia de las partículas virales se correspondía con la intensidad de la banda de N en el *western blot*. Los virus presentaban una morfología sin alteraciones: se obtuvieron partículas virales esféricas con un diámetro de alrededor de 100 nm, pudiendo distinguir a alta magnificación las *spikes* formadas por las glicoproteínas Gc y Gn. Además, después del proceso de purificación mantenían su integridad y tenían una pureza elevada, no se observaron vesículas o restos de membranas celulares contaminantes que pudieran interferir en el análisis de lipidómica.

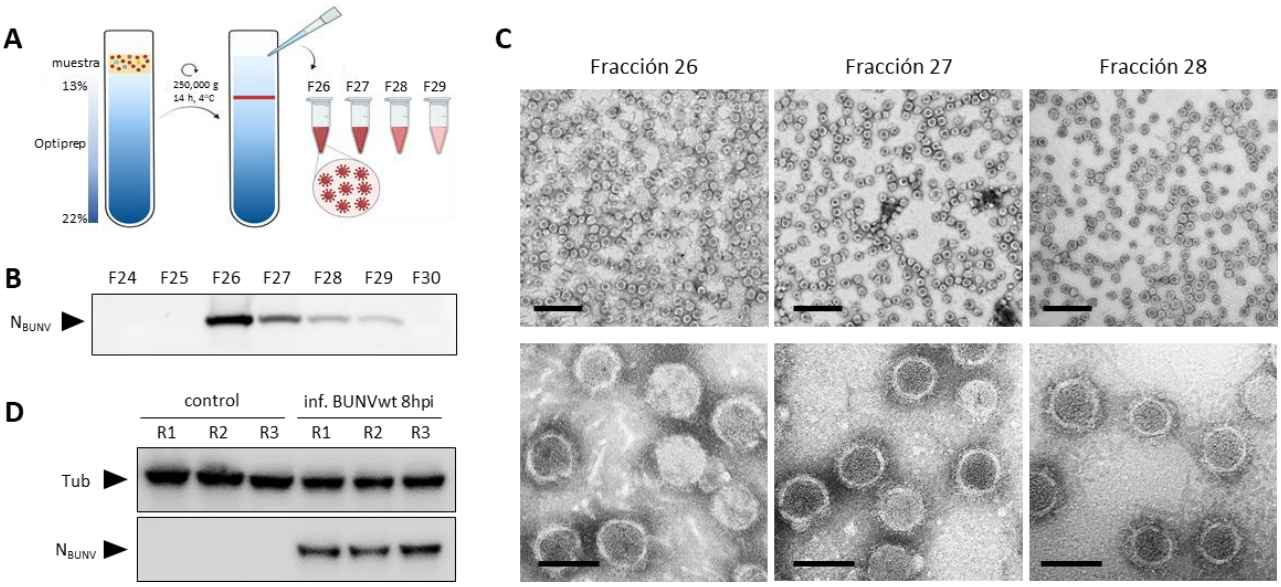


Figura 15. Preparación de muestras para lipidómica: virus purificados y pellets celulares. *(A) Esquema del proceso de purificación del BUNV mediante gradiente de densidad con Optiprep® (iodixanol 13-22%). (B) Inmunodetección de la proteína viral N mediante electroforesis y western blot para las fracciones 24 a 30 de la purificación. Se puede observar la presencia de virus en las fracciones 26-29. (C) Tinciones negativas de las fracciones 26, 27 y 28 estudiadas por MET. Los paneles inferiores muestran una imagen a mayor magnificación de cada fracción. Estas tres fracciones se mezclaron para tener una mayor cantidad de virus en las muestras que se iban a procesar para espectrometría de masas. (D) Detección de la proteína viral N y la proteína celular tubulina (control de carga) mediante electroforesis y western blot de células 293T control e infectadas (MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi). Estas muestras se analizarían posteriormente mediante espectrometría de masas para la determinación de la composición lipídica. Barras de escala: 500 nm en los paneles superiores y 100 nm en paneles inferiores de C.*

Estas tres fracciones se unificaron para continuar con el estudio de lipidómica, y se realizaron un total de tres réplicas biológicas.

Para las muestras celulares, se sembraron $3x10^6$ células 293T por triplicado y se infectaron con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. A las 8 hpi, se recogieron las células y se analizó si la infección había sido positiva mediante *western blot*. Se utilizó la inmuno-detección de la proteína viral N como marcaje de infección y la proteína celular tubulina como control de carga (Figura 15D).

2.2. Estudio de la composición lipídica de células y virus mediante cromatografía en capa fina

Como primera aproximación al estudio de la composición lipídica de las muestras celulares y virus purificados, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*). La TLC es una técnica muy popular utilizada para el análisis de lípidos de mezclas sencillas basada en las diferencias de polaridad de los mismos, aunque ha ido dejándose de lado en favor de las técnicas de lipidómica basadas en espectrometría de masas (Fuchs *et al.,* 2011).

Se llevó a cabo un estudio por TLC de los extractos lipídicos de virus BUNV purificados y de células 293T control o infectadas a una MOI de 1PFU/célula y recogidas a distintos tiempos (2, 4 y 8 hpi). Se utilizó un sistema de solventes orgánicos que permitía la separación cromatográfica de las distintas clases de fosfolípidos (Figura 16A), u otro sistema de solventes que adicionalmente permitía la separación de colesterol y ceramidas (Figura 16B). No se observaron diferencias aparentes en el cambio del patrón o de la abundancia relativa de las diferentes clases de fosfolípidos y colesterol entre células control e infectadas. Si bien es cierto que esta técnica presenta algunas limitaciones: (1) no utiliza patrones internos por lo que no se pueden corregir el rendimiento y la posible pérdida de muestra en el proceso de extracción y manipulación de lípidos, por lo que el resultado no es cuantitativo; y (2) aunque permite la separación eficiente de las diferentes categorías de lípidos (colesterol, ceramidas, esfingomielina, y las distintas clases de glicerofosfolípidos), la TLC no es eficaz para separar e identificar lípidos individuales dentro de estas categorías ni para estudiar la longitud y el grado de saturación de las cadenas alifáticas.

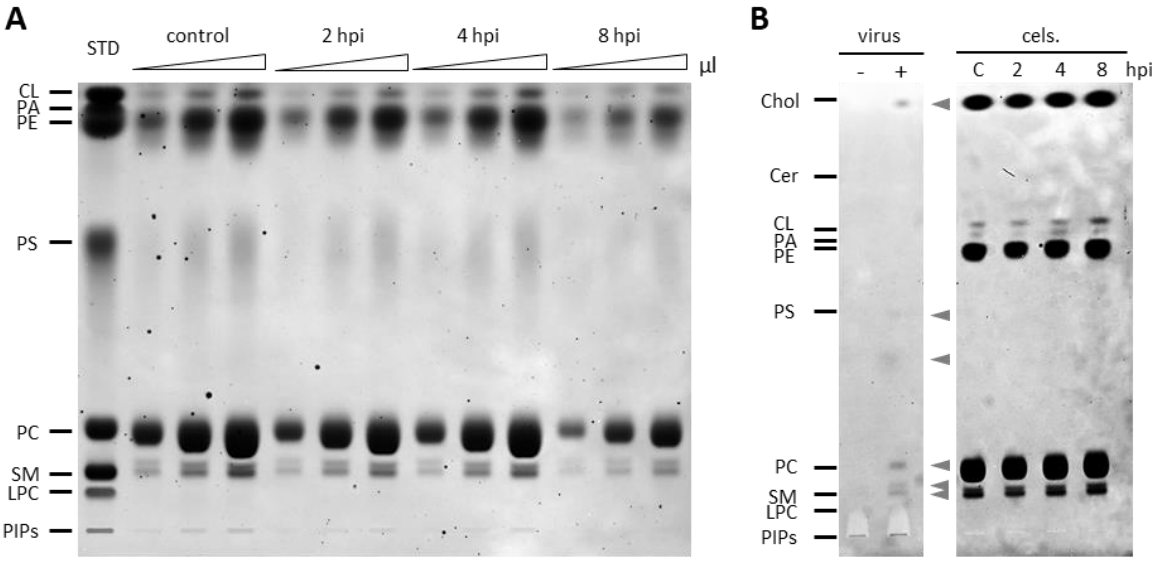


Figura 16. Cromatografía en capa fina de los extractos lipídicos de células control, células infectadas y virus BUNV purificados. *(A) Análisis mediante TLC de la composición de fosfolípidos de células control y células infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y distintos tiempos post-infección: 2, 4 y 8 hpi mediante cromatografía en capa fina (TLC, thin layer chromatography) utilizando un sistema de solventes orgánicos que permitía separar las diferentes especies de fosfolípidos formado por una primera disolución de diclorometano:etilacetato:acetona (80:16:4), y una segunda disolución de cloroformo: etilacetato:acetona:isopropanol:etanol:metanol:agua:ácido acético (30: 6: 6: 6: 16: 28: 6: 2), para el primer y el segundo desarrollo de la placa de TLC respectivamente. (B) Análisis mediante TLC de la composición de glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol de virus purificados, células control y células infectadas utilizando los sistema de solventes cloroformo:etilacetato:acetona:isopropanol: etanol:metanol:agua:ácido acético (30:6:6:6: 16:28:6:2) y ciclohexano:etilacetato (1:1), en el primer y el segundo desarrollo de la placa de TLC, respectivamente. Estándares lipídicos: ácido fosfatídico (PA), cardiolipina (CL), ceramida (cer), colesterol (chol), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina/-etanolamina/-serina/-inositoles (PC, PE, PS, PIPs), lisofosfatidilcolina (LPC).*

Respecto a los virus purificados, el resultado obtenido por TLC permitió una primera aproximación al perfilado de la composición lipídica de la envuelta de las partículas virales

del BUNV. Los lípidos identificados como principales componentes de la envuelta viral fueron el colesterol, la fosfatidilcolina y la esfingomielina (Figura 16B, izquierda). Además, se observaron bandas adicionales, más difusas, que podrían corresponderse con hexosilceramidas o fosfolípidos unidos a éter, aunque no pudieron identificarse al no disponer de los estándares lipídicos correspondientes.

2.3. Estudio de la composición lipídica de células y virus mediante espectrometría de masas

Los extractos lipídicos de células 293T control, células 293T infectadas (1 PFU/célula y 8 hpi) y virus BUNV purificados se enviaron al servicio de Lipidómica del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (CAQ-CSIC), donde se procesaron las muestras y se analizó la composición de lípidos mediante espectrometría de masas (MS), cuantificando las diferentes especies de esfingolípidos, glicerofosfolípidos y colesterol.

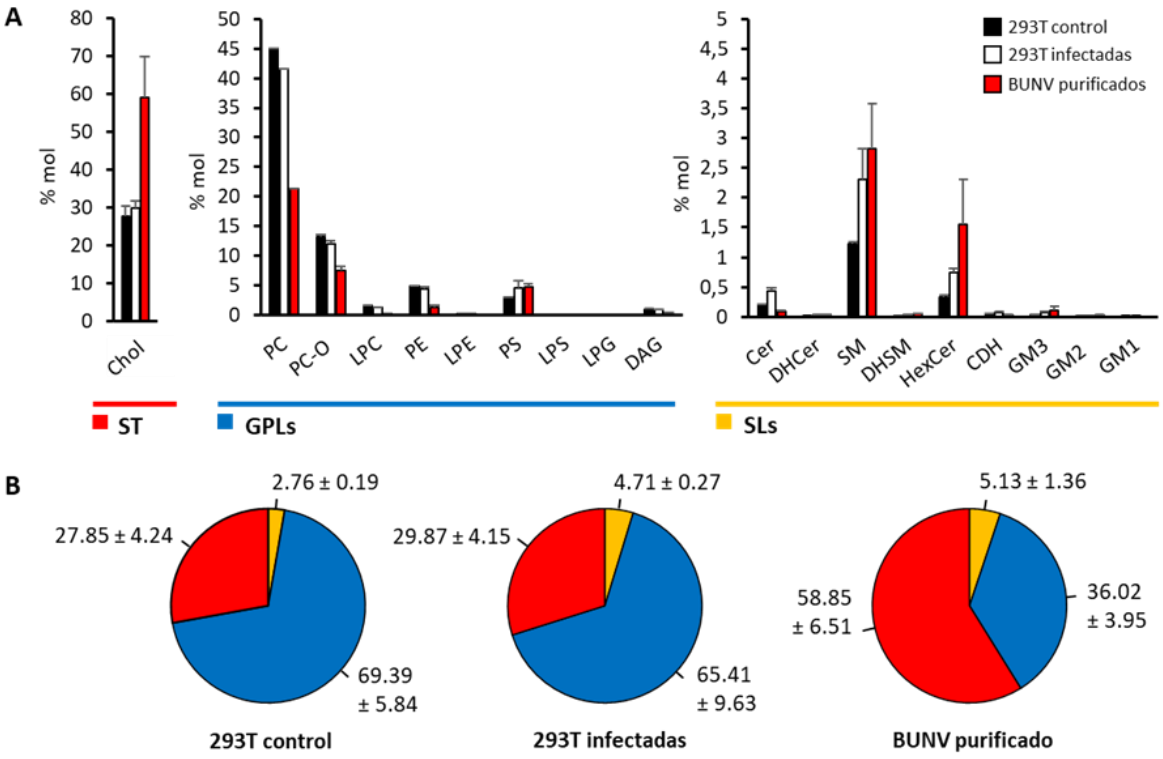


Figura 17. Composición lipídica a nivel de clase y categorías funcionales de células control, células infectadas y virus BUNV. *Se analizó el contenido de las diferentes clases de lípidos (A) y las categorías lipídicas funcionales (B) de células 293T control, células 293T infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi, y virus BUNV purificados. Los valores se normalizaron en función de la cantidad pico-molar de fosfatidilcolina de cada muestra y se estandarizaron en función del porcentaje molar de cada clase/categoría lipídica respecto al total de lípidos en la muestra. Esteroles (ST, en rojo): colesterol (chol). Glicerofosfolípidos (GPLs, en azul): diacilglicerol (DAG), fosfatidilcolina/-etanolamina/-serina (PC, PE, PS), lisofosfatidilcolina/-etanolamina/-serina/-glicerol (LPC, LPE, PLS, PLG) y PC unida a éter (O-PC). Esfingolípidos (SPs, en amarillo): ceramida (Cer), dihidroceramida (DHCer), esfingomielina (SM), dihidroesfingomielina (DHSM), hexosilceramida (HexCer), dihexósidoceramida (CDH) y gangliósidos (GM1, GM2, GM3). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n = 3).*

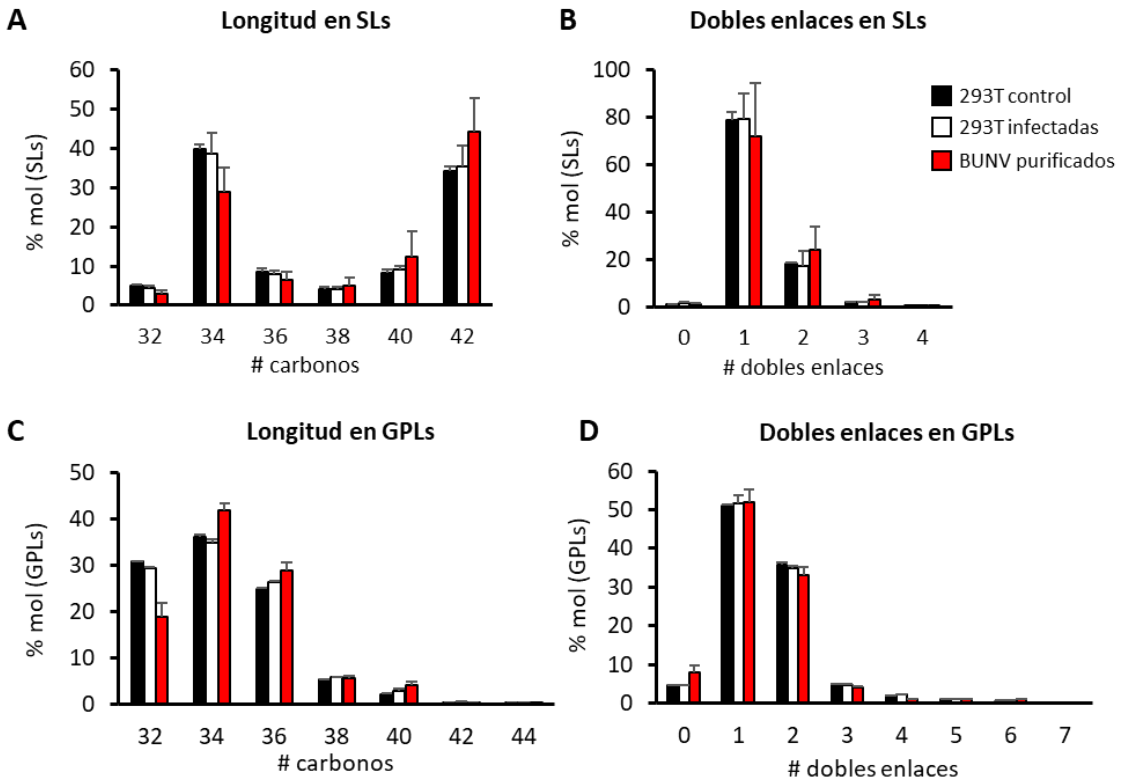


Figura 18. Análisis de la longitud y grado de saturación de los esfingolípidos y glicerofosfolípidos de células control, células infectadas y virus BUNV. *Se analizaron los cambios en: la longitud de las cadenas de los SLs expresada como la suma de átomos de carbono de la cadena larga y la cadena acílica (A), el grado de saturación de los SLs expresado como número de dobles enlaces totales en la cadena larga y la cadena acílica (B), la longitud de las cadenas de los GPLs como la suma de átomos de carbono de las cadenas acílicas (C), y el grado de saturación de los GPLs como número de dobles enlaces totales en las cadenas acílicas (D). Los valores se normalizaron en función de la cantidad pico-molar de fosfatidilcolina de cada muestra y se estandarizaron en función del porcentaje molar de cada clase lipídica respecto al total de lípidos en la muestra. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n = 3).*

Para ofrecer una visión general de cómo variaba la composición de los lípidos totales de células control, células infectadas y la envuelta del BUNV, se calcularon los porcentajes molares de los diferentes lípidos y se agruparon en clases y categorías lipídicas funcionales (Figura 17). También se analizaron las características de los esfingolípidos y glicerofosfolípidos en base a la longitud (número de átomos de carbono) y el grado de saturación (número de dobles enlaces) de sus cadenas acílicas (Figura 18). Por último, se analizó la composición lipídica a nivel de especie (lípidos individuales identificados por MS dentro de cada categoría) de glicerofosfolípidos y esfingolípidos. El resultado se ha recogido en las Figuras 19 y 20, respectivamente.

2.3.1. Cambios en la composición lipídica celular durante la infección

En primer lugar, se analizaron las diferencias en la composición de los extractos lipídicos procedentes de células completas. A nivel de familias de lípidos de membrana, la composición molar de las células 293T control era de un 27,9% de colesterol, 2,7% de esfingolípidos y 69,4% de glicerofosfolípidos; mientras que las células infectadas

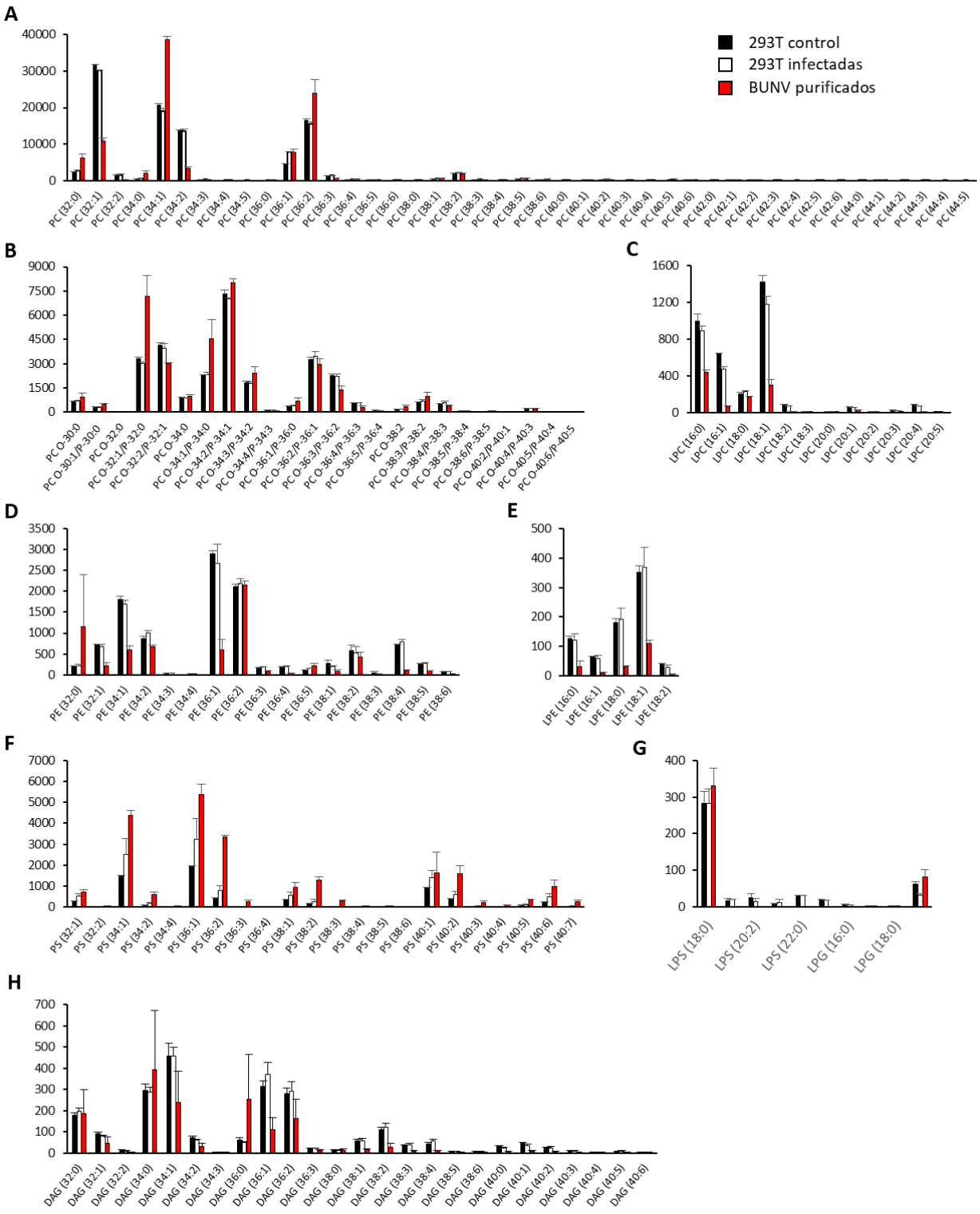


Figura 19. Composición lipídica a nivel de especie de glicerofosfolípidos en células control, células infectadas y virus BUNV. *Se analizó el contenido de las diferentes clases de glicerofosfolípidos en células 293T control (negro), células 293T infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (blanco), y virus BUNV purificados (rojo). Los valores se normalizaron en función de la cantidad pico-molar de fosfatidilcolina de cada muestra y se estandarizaron en función del porcentaje molar de cada clase/categoría lipídica respecto al total de lípidos en la muestra. Cuantificación a nivel de especies de fosfatidilcolinas, PC (A); ésteres de fosfatidilcolina, PC-O (B), lisofosfatidilcolinas, LPC (C); fosfatidiletanolaminas, PE (D); lisofosfatidiletanolaminas, LPE (E); fosfatidilserinas (F), lisofosfatidilserinas (G); y diacilgliceroles, DAG (H). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n = 3).*

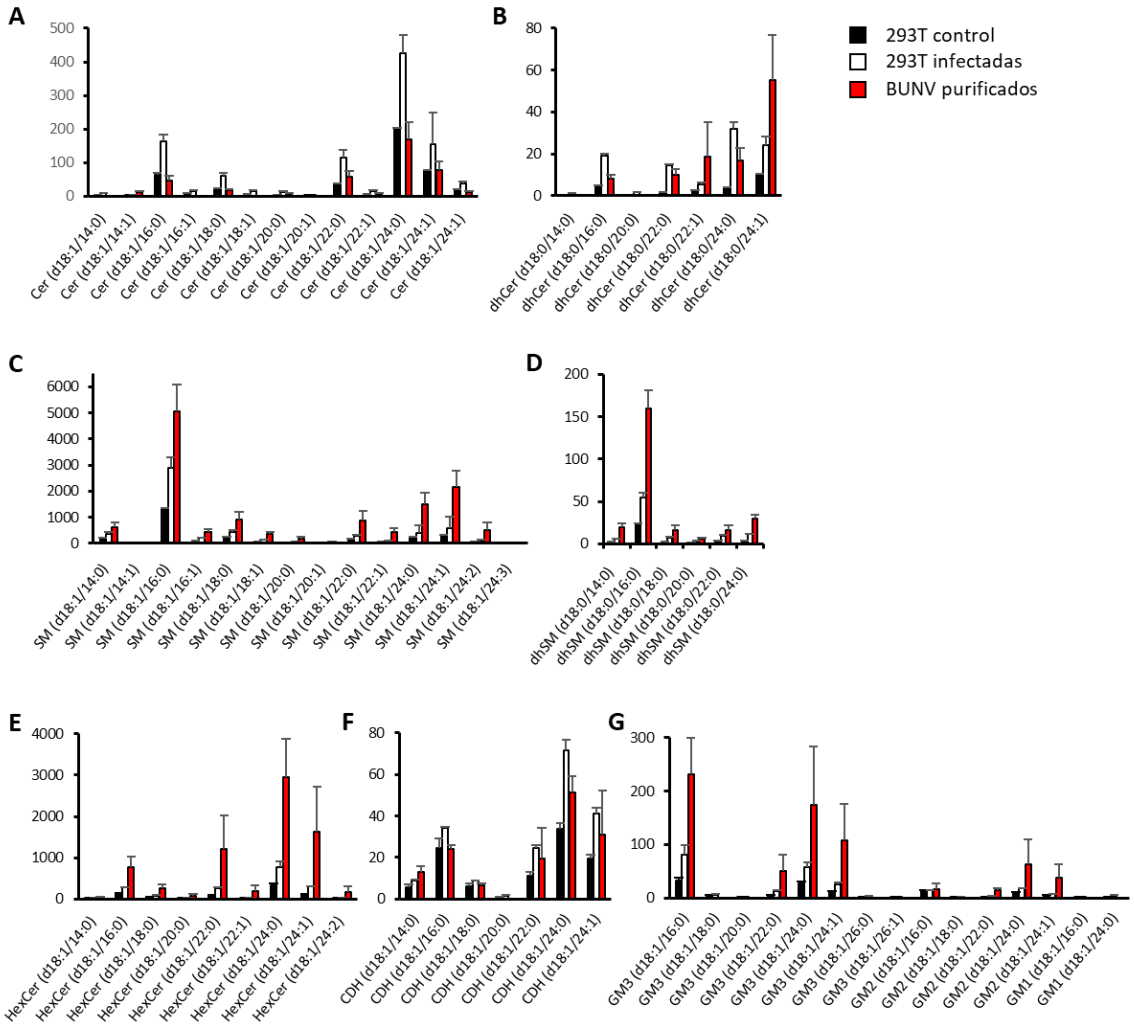


Figura 20. Composición lipídica a nivel de especie de esfingolípidos en células control, células infectadas y virus BUNV. *Se analizó el contenido de las diferentes clases de esfingolípidos en células 293T control (negro), células 293T infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (blanco), y virus BUNV purificados (rojo). Los valores se normalizaron en función de la cantidad pico-molar de fosfatidilcolina de cada muestra y se estandarizaron en función del porcentaje molar de cada clase/categoría lipídica respecto al total de lípidos en la muestra. Cuantificación a nivel de especies de ceramidas, Cer (A); dihidroceramidas, dhCer (B); esfingomielinas, SM (C); dihidroesfingomielinas, dhSM (D); hexosilceramidas, HexCer (E); dihexósidoceramida, CDH (F); y gangliósidos, GM1, GM2 y GM3 (G). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n = 3).*

presentaban una composición media de 29,9% de colesterol, 4,7% de esfingolípidos y 65,4% de glicerofosfolípidos. Aunque se observó una tendencia hacia el incremento de colesterol en las células infectadas por el BUNV con respecto a las células control en las tres réplicas incluidas en el estudio, solo la diferencia en los niveles de esfingolípidos resultó ser estadísticamente significativa, con porcentaje molar 1,7 veces más elevado en células 293T infectadas por el BUNV que en células control.

Glicerofosfolípidos, GPLs

Las diferencias en cuanto a la composición molar de las diferentes categorías de GPLs entre células control e infectadas fueron pequeñas. Se observó una reducción del 10% en la

cantidad de fosfatidilcolina (PC) y un incremento significativo del 40% en los niveles de fosfatidilserina (PS) en las células infectadas respecto a las células control. Además, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la longitud ni el grado de saturación de las cadenas acílicas entre los dos grupos.

Esfingolípidos, SLs

A pesar de que se había observado una diferencia significativa entre los niveles globales de SLs entre células control e infectadas, al igual que sucedía con los GPLs, no se encontraron diferencias en cuanto a la longitud ni el grado de saturación de las cadenas acílicas. Los principales esfingolípidos desregulados durante la infección del BUNV fueron las esfingomielinas, las ceramidas y las hexosilceramidas.

En las células 293T infectadas con el BUNV, la cantidad de esfingomielina (SM) y dihidroesfingomielina (dhSM) duplicaba los niveles de las células control sin infectar, siendo especialmente relevante el incremento en las especies SM(d18:1/16:0) y dhSM(d18:1/16:0).

Otros de los principales esfingolípidos alterados durante la infección fueron las ceramidas (Cer) y dihidroceramidas (dhCer), que pueden proceder tanto de la degradación de SM por las esfingomielinasas o de la síntesis *de novo* mediante la reacción de condensación a partir de palmitato y serina (Hannun y Obeid, 2008). En concreto, las diferencias se observaron en las especies de ceramidas con cadenas acílicas insaturadas Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/ 18:0), Cer(d18:1/22:0) y Cer(d18:1/24:0), presentando valores que duplicaban los de las células control. Dado que la concentración intracelular de SM y dhSM también se encontraba incrementada, el aumento en la cantidad de Cer era posiblemente resultado de la síntesis *de novo* en lugar de la degradación de SM. En células infectadas, la cantidad de ceramidas glucosiladas, glucosilceramidas o hexosilceramidas (HexCer) también era el doble que en células control.

2.3.2. Composición lipídica de virus purificados

Además de evaluar los cambios en la composición lipídica de las células completas durante la infección, también se estudió el lipidoma viral o composición de los lípidos que forman la envuelta de las partículas virales del BUNV.

La composición de la envuelta viral del BUNV presentaba una distribución en porcentaje molar de familias de lípidos de membrana de: 58,9% de colesterol; un 5,1% de esfingolípidos; y un 36% de glicerofosfolípidos. Esta distribución es muy particular y

destaca por el enriquecimiento en esfingolípidos y, especialmente, la alta proporción de colesterol.

Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos (GLPs) mayoritarios de la envuelta del BUNV identificados mediante MS fueron fosfatidilcolina (PC: 21,4%), fosfatidilcolina unida a éter (O-PC: 7,5%), fosfatidilserina (PS: 4,8%) y fosfatidiletanolamina (PE: 1,4%), en orden de abundancia. Además, se observó una disminución significativa en el porcentaje molar de GPLs de cadena acílica de longitud de 32 carbonos en favor de un enriquecimiento en los GPLs con cadenas de 34 y 36 carbonos en la envuelta de los virus con respecto a la composición lipídica celular.

Esfingolípidos

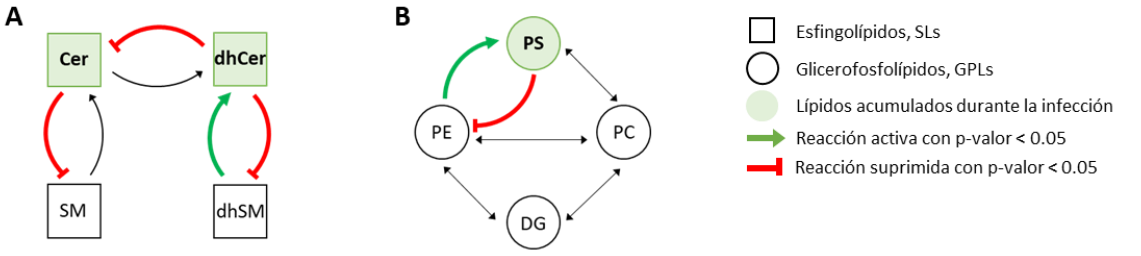
Con respecto a los esfingolípidos, los más abundantes en la envuelta del BUNV fueron la esfingomielina (SM) y las hexosilceramidas (HexCer), que representaban un porcentaje molar del 2,8% y 1,6%, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que la concentración intracelular en ceramidas era superior en células infectadas con respecto a células control, este enriquecimiento no se tradujo en una acumulación de ceramidas en las partículas virales. Además, cabe destacar la presencia de gangliósidos GM3 en la envuelta viral del BUNV, en una proporción molar 5 veces superior a la encontrada en las membranas de células control. Aunque en el cómputo total los GM3 representaban un porcentaje molar bajo de la composición lipídica de la envuelta.

La identificación de los lípidos de la envuelta del BUNV mediante MS fue congruente con los resultados del experimento previo obtenido mediante cromatografía en capa fina.

2.3.3. Análisis de rutas metabólicas de lípidos alteradas mediante BioPAN®

La interpretación de los datos de lipidómica obtenidos por espectrometría de masas es compleja. Los cambios observados entre dos muestras biológicas normalmente abarcan un gran número de lípidos estructuralmente relacionados que, a su vez, están regulados por enzimas dentro de las diferentes rutas metabólicas. Para comparar los resultados obtenidos entre células control e infectadas dentro del contexto metabólico celular, se utilizó el software BioPAN (*Bioinformatics Methodology for Pathway Analysis*). BioPAN es una herramienta online de código abierto desarrollada por LIPID MAPS® a través del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH). Esta herramienta permite visualizar los datos cuantitativos de lipidómica dentro de las rutas metabólicas biosintéticas de lípidos. Además, facilita una lista de genes que podrían estar implicados en la activación o represión de las enzimas del metabolismo lipídico.

El análisis con BioPAN enfrentando los datos de células 293T infectadas contra los de células control identificó cambios significativos en las rutas metabólicas de esfinfolípidos (Figura 21A) y glicerofosfolípidos (Figura 21B). Respecto a los esfingolípidos, la conversión de dihidroesfingomielina a dihidroceramida se encontraría sobreactivada en células infectadas, mientras que la reacción inversa estaría reprimida. También se encontraría reprimida la ruta dihidroceramida>ceramida>esfingomielina. Como consecuencia, se produciría una acumulación de ceramidas y dihidroceramidas en células infectadas. Las enzimas del metabolismo de esfingolípidos predichas por el software con actividad desregulada durante la infección fueron las esfingomielina-sintasas 1 y 2 (SMS1 y SMS2), la esfingomielina-fosfodiesterasa 1 (SMPD1), las esfingolípido-delta-4-desaturasas 1 y 2 (DEGS1 y DEGS2) y el transportador de ceramidas (CERT1), presentando un *z-score* con valores absolutos superiores a 2,5 (Figura 21C).



C

Reacción	Z-score	Enzimas implicadas	
dhSM → dhCer	2.548	*SMS1*, *SMS2*, *SMPD1*	Reacciones sobre-activadas con p-valor < 0.05
PE → PS	1.726	*PTDSS2*	
dhCer → dhSM	-3.456	*SMS1*, *SMS2*	Reacciones reprimidas con p-valor < 0.05
dhCer → Cer → SM	-2.903	*DEGS1*, *DEGS2*, *SMS1*, *SMS2*, *CERT1*	
PS → PE	-2.164	*PISD*	

Figura 21. Composición lipídica a nivel de especie de glicerofosfolípidos en células control, células infectadas y virus BUNV. *Se analizó el contenido de las diferentes clases de glicerofosfolípidos en células 293T control (negro), células 293T infectadas a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (blanco), y virus BUNV purificados (rojo). Los valores se normalizaron en función de la cantidad pico-molar de fosfatidilcolina de cada muestra y se estandarizaron en función del porcentaje molar de cada clase/categoría lipídica respecto al total de lípidos en la muestra. Cuantificación a nivel de especies de fosfatidilcolinas, PC (A); ésteres de fosfatidilcolina, PC-O (B), lisofosfatidilcolinas, LPC (C); fosfatidiletanolaminas, PE (D); lisofosfatidiletanolaminas, LPE (E); fosfatidilserinas (F), lisofosfatidilserinas (G); y diacilgliceroles, DAG (H). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n = 3).*

En el caso del análisis de glicerofosfolípidos, la reacción química significativamente sobreactivada en células 293T infectadas sería la correspondiente a la biosíntesis de fosfatidil-serina (PS) a partir de fosfatidil-etanolamina (PE), mientras que la reacción inversa se encontraría reprimida. Como resultado, se incrementaría el nivel de PS en células infectadas. Las enzimas predichas por el software como responsables de este cambio son la

fosfatidilserina-sintasa 2 (PTDSS2) y la fosfatidilserina-decarboxilasa (PISD) con unos valores *z-score* de 1,726 y -2,164, respectivamente.

2.4. El papel del colesterol en la infección por BUNV

2.4.1. Metabolismo del colesterol durante la infección

El colesterol celular puede proceder de dos fuentes, pudiéndose distinguir entre el colesterol exógeno que es captado mediante endocitosis de lipoproteínas desde el medio extracelular, y el colesterol endógeno de nueva síntesis. La biosíntesis de colesterol tiene lugar en el retículo endoplásmico liso a partir de acetil-CoA (Berg *et al.,* 2002), y la reacción limitante del proceso es la reducción del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato, catalizada por la enzima HMGCoA reductasa o HMGR (Figura 22A). Esta enzima se encuentra altamente regulada a través de distintos mecanismos: (1) a nivel de transcripción, las proteínas SREBP 1a, 1c y 2 se activan cuando la concentración de colesterol en el RE es baja y se translocan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción activando la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, incluyendo la HMGR y las propias proteínas SREBP; (2) a nivel funcional, la HMGR presenta inhibición por producto (mevalonato y colesterol); y (3) mediante fosforilación por la quinasa AMPK, siendo inactiva la forma fosforilada de HMGR.

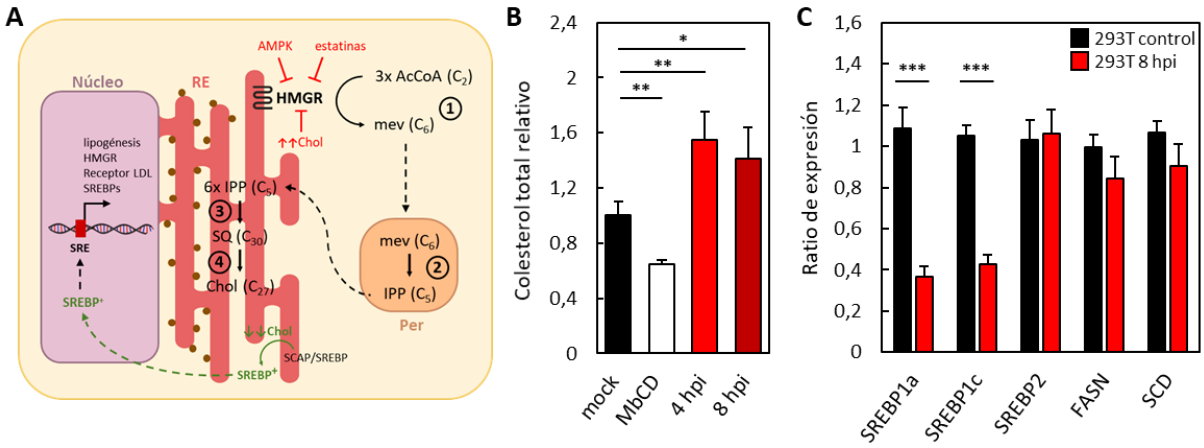


Figura 22. Estudio de la interferencia del BUNV sobre el metabolismo del colesterol. *(A) Esquema del proceso de biosíntesis del colesterol, regulado positivamente a nivel de transcripción por las proteínas SREBP (en verde). Además, se puede bloquear a través de la inactivación de la HMGR por fosforilación de la AMPK e inhibición por producto (en rojo). Farmacológicamente, las estatinas inhiben la HMGR. (B) Cuantificación del colesterol intracelular mediante el ensayo enzimático con AmplexRed® a partir de células 293T infectadas con virus BUNV (MOI de 1 PFU/célula, y 4/8 hpi). Se añadió un control de células sin infectar (mock) y un control de depleción de colesterol de membrana incubando 1 h con MβCD 10 mM. La cantidad de colesterol total se normalizó con respecto a la concentración de proteínas de cada muestra (n = 4). (C) Cuantificación de la expresión de SCREBP1a/1c, SCREBP2, FASN y SCD mediante RT-qPCR, en células 293T control e infectadas con virus BUNV. El resultado se muestra normalizado con respecto al control sin infectar (n = 6). RE, retículo endoplásmico. Per, peroxisoma. AcCoA, acetil-Coenzima A. Mev, mevalonato. IPP, isopentenil pirofosfato. SQ, escualeno. Chol, colesterol. HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. AMPK, proteína quinasa activada por AMP. SRE, elementos regulados por esteroles. SREBPs, proteínas de unión a SRE. FASN, ácido graso sintasa. SCD, estearoil-CoA desaturasa. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. ***, p-valor < 0,001; **, p-valor < 0,01; *, p-valor < 0,05. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Se cuantificaron los niveles intracelulares de colesterol utilizando el ensayo enzimático de AmplexRed® (Invitrogen). Para ello, se infectaron células 293T con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y se recogieron muestras a tiempos de 4 y 8 hpi. Se incluyó un control negativo de infección y un control de depleción de colesterol por tratamiento con metil-β-ciclodextrina (MβCD) 10 mM durante 1 h. En paralelo, se llevaron a cabo la extracción de lípidos y la cuantificación de proteínas (utilizando el kit de ensayo Pierce™ BCA, ThermoFischer) de cada muestra. A partir de los extractos lipídicos secos, se procedió con el ensayo de cuantificación de AmplexRed® según las especificaciones de la casa comercial, leyendo la concentración del producto de la reacción colorimétrica (directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra) a una longitud de onda de 565 nm. La concentración de colesterol intracelular de cada muestra se normalizó respecto a la concentración de proteínas totales. Como puede observarse en la Figura 22B, durante la infección se produce un incremento significativo en la concentración de colesterol intracelular durante la infección. Observándose un valor más alto a tiempos cortos de infección (4 hpi) que a 8 hpi. Por otra parte, el tratamiento con MβCD 10 mM durante una hora fue eficaz para deplecionar el colesterol de la membrana celular produciendo una caída de los niveles de colesterol de aproximadamente el 40% con respecto al control sin tratar.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio de los niveles de expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de los factores de transcripción SCREBP a nivel de tránscrito primario, en comparación con un control endógeno (GAPDH) cuya expresión no se ve afectada por la infección. Se utilizaron cebadores específicos para las dos isoformas de SREBP1 (1a y 1c) y para SREBP2. Además, se introdujeron cebadores para la ácido graso-sintasa (FASN), y la estearoil-CoA desaturasa (SCD). Todos ellos se utilizan habitualmente en la bibliografía para el seguimiento del metabolismo del colesterol y la lipogénesis (Mouhid *et al.,* 2019; Sánchez-Martínez *et al.,* 2015). Se estudió el efecto en células 293T infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi, respecto a células 293T control. El resultado reveló que durante la infección de BUNV, se reducían significativamente los niveles de expresión relativos de las isoformas 1a y 1c de SREBP1 un 66 y 60%, respectivamente; mientras que los niveles de SREBP2, FASN y SCD no presentaban cambios significativos (Figura 22C). La reducción en los niveles de expresión de las isoformas de SREBP1 podría parecer que contradice el resultado del incremento de colesterol intracelular observado en células infectadas, puesto que estas proteínas estimulan la colesterogénesis. No obstante, cabe recordar que los factores SREBP son sensores de los niveles colesterol en el RE, que se activan cuando se reduce la concentración de colesterol en este orgánulo, y que la expresión de estos se encuentra autorregulada. Por este motivo, una reducción en los niveles de expresión de las

SREBPs podría indicar que la concentración de colesterol en el RE es elevada durante la infección de BUNV, como resultado de una reprogramación metabólica desde tiempos tempranos de infección.

2.4.2. El flujo del colesterol durante la infección

Visto que la concentración de colesterol intracelular aumentaba durante la infección, y habiendo comprobado que era el lípido mayoritario en las partículas virales maduras del BUNV, se estudió la localización del colesterol intracelular durante la infección. Para ello, se utilizó la sonda filipina III. La filipina III es un compuesto de la familia de los macrólidos poliénicos producido por *Streptomyces filipinensis* con actividad antibiótica y antifúngica. Se utiliza como sonda para la localización y cuantificación de colesterol libre gracias a su especificidad de unión al colesterol de las membranas biológicas con una estequiometría 1:1, formando un complejo fluorescente con un pico de emisión a una longitud de onda alrededor de 480 nm (Castanho *et al.,* 1992).

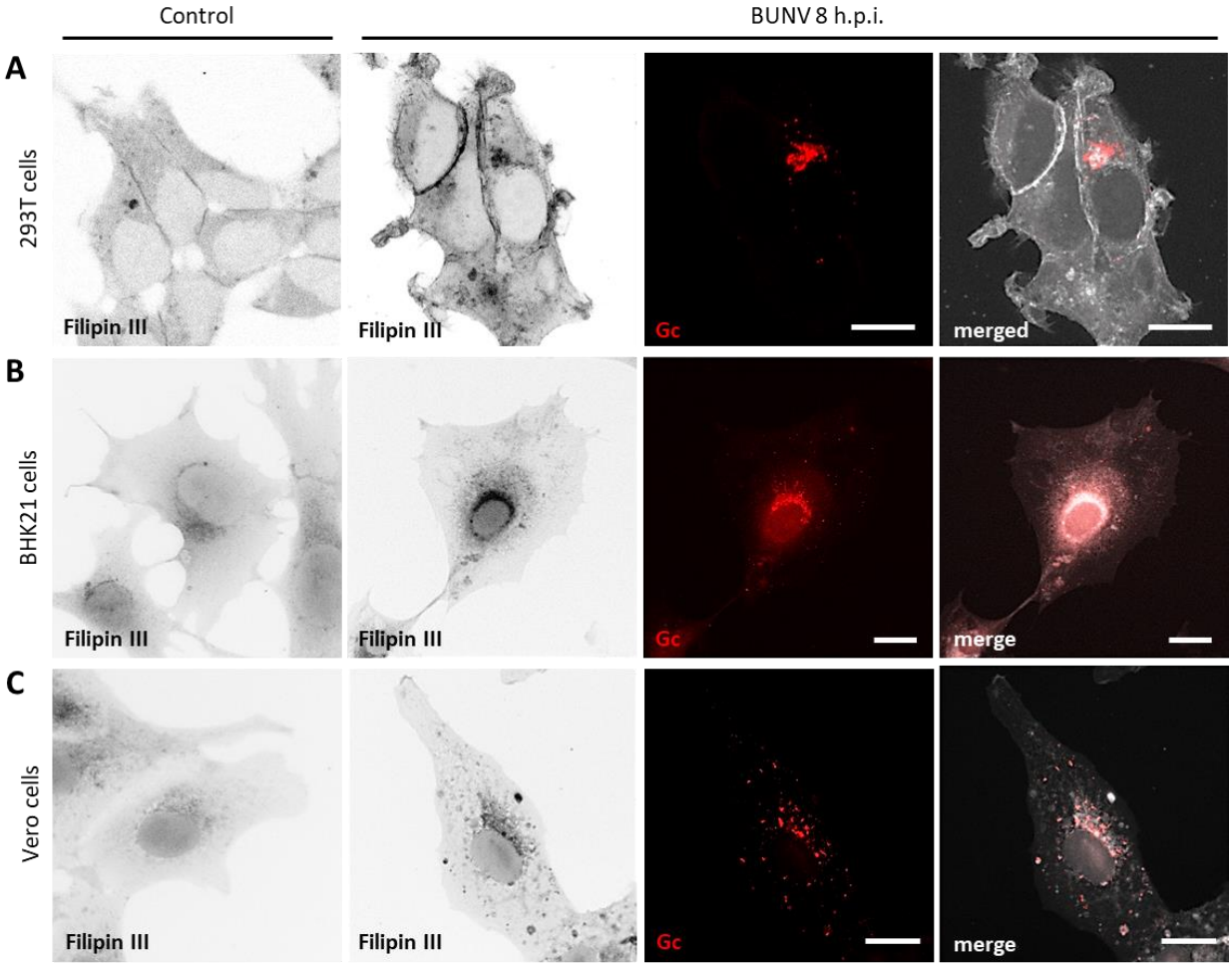


Figura 23. Localización del colesterol intracelular durante la infección por BUNV mediante microscopía de fluorescencia. *Se procesaron células 293T (A), BHK21 (B) y Vero (C) control o infectadas con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi para microscopía de fluorescencia, marcando el colesterol con la sonda Filipina III (escala de grises) y las factorías virales con un anticuerpo primario anti-Gc (rojo). Se puede apreciar que el virus BUNV forma su factoría viral en membranas enriquecidas en colesterol. Barras de escala: 10 µm en A y 20 µm en B.*

Aunque las células 293T se utilizan frecuentemente en investigación por su facilidad de cultivo, capacidad de transfección y alta eficacia para la producción de proteínas recombinantes, a nivel morfológico son células de tamaño pequeño, con núcleo grande y volumen citoplásmico reducido. Debido a estas últimas características, no eran las más adecuadas para realizar estudios de localización subcelular por microscopía de fluorescencia. Por este motivo, se decidió estudiar la localización del colesterol utilizando dos líneas celulares adicionales: BHK21 y Vero. Se infectaron células 293T, BHK21 y Vero con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula durante 8 hpi, y se procesaron para microscopía de fluorescencia marcando las factorías virales con un anticuerpo primario anti-Gc y el colesterol celular con filipina III. En las células 293T y BHK-21, en las que el virus BUNV construye una factoría en la que el aparto de Golgi se mantiene compacto, se observó una acumulación de colesterol en la zona yuxtanuclear correspondiente al Golgi y coincidiendo con la señal de Gc (Figura 23A-B). En el caso de las células Vero, en las que el Golgi se fragmenta desde tiempos tempranos de infección dando lugar a *mini* factorías virales, también se apreciaba cierta acumulación de colesterol con un patrón punteado más disperso coincidente con la señal de Gc. Además, se observó que la señal de la sonda filipina III parecía definir la estructura del retículo endoplásmico (RE) (Figura 23C).

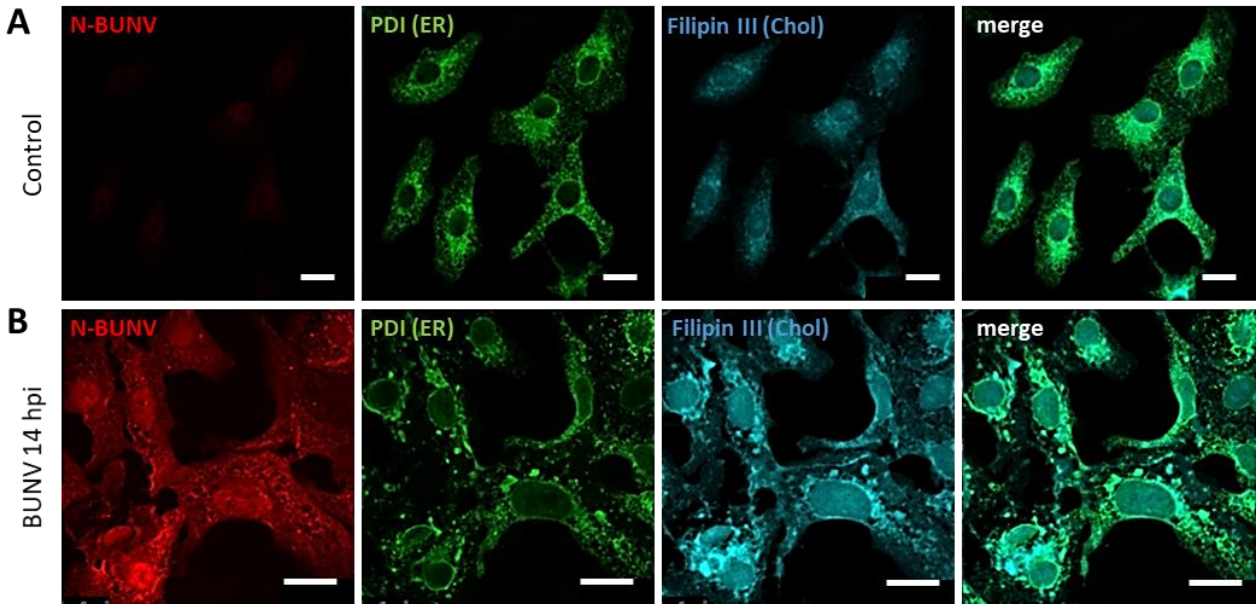


Figura 24. Localización del colesterol intracelular en estructuras procedentes de RE a tiempos tardíos de infección. *Se muestran células Vero control e infectadas con virus BUNV (MOI de 1 PFU/célula y 16 hpi, tiempo tardío de infección). Imágenes correspondientes a la proyección de secciones obtenidas por microscopía confocal en las que se ha marcado la proteína viral N con un anticuerpo primario anti-N (rojo), el retículo endoplásmico con un anticuerpo primario anti-PDI (verde), y el colesterol intracelular con la sonda filipina III (cian). Barras de escala: 15 µm.*

El RE es el orgánulo celular en el que se produce la síntesis de colesterol. Además, como se ha expuesto en la sección 1.2. de resultados, las membranas de este compartimento celular se encuentran modificadas durante la infección del BUNV, siendo especialmente llamativas

las estructuras encontradas en células Vero en forma de grandes cisternas o acúmulos. Ya que a las 8 hpi el marcaje de colesterol parecía definir una estructura compatible con el RE en células Vero, se decidió estudiar la localización del colesterol a un tiempo de infección más avanzado en el que las estructuras alteradas procedentes del RE son más evidentes. Para ello, se infectaron células Vero con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula, se recogieron a las 14 hpi y se procesaron para microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-N (marcador de infección), un anticuerpo anti-PDI (marcador de RE) y filipina III para marcar el colesterol intracelular. A este tiempo post-infección, prácticamente el 100% de la monocapa celular se encontraba infectada. Se observó que la señal de filipina III era intensa y se solapaba con la señal de PDI, definiendo las estructuras alteradas que derivan del RE e indicando que el retículo se encontraba cargado de colesterol en células infectadas (Figura 24).

2.4.3. La interferencia en el flujo del colesterol como estrategia antiviral

Dada la importancia del colesterol en el ciclo vital del BUNV, se seleccionaron dos compuestos con diferente acción sobre el flujo del colesterol, la simvastatina y la metil-β-ciclodextrina (MβCD) (Figura 25A), y se evaluó su capacidad para inhibir la infección del BUNV. Las estatinas son inhibidores específicos de la HMGR utilizados frecuentemente para el tratamiento de la hipercolesterolemia en humanos, mientras que la MβCD se utiliza en investigación para extraer el colesterol de membranas biológicas, y es frecuentemente utilizada en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria para encapsular y solubilizar moléculas hidrofóbicas.

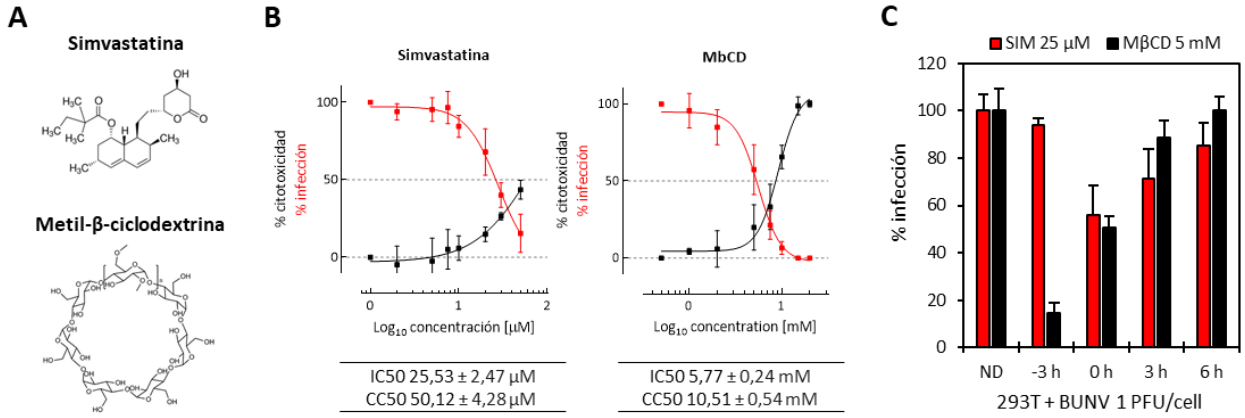


Figura 25. Efecto del tratamiento con simvastatina y metil-β-ciclodextrina sobre la infección del BUNV en células 293T. *(A) Estructura molecular de la simvastatina (SIM) y de la metil-β-ciclodextrina (MβCD). (B) Ensayo de citotoxicidad y curva de inhibición de la infección de BUNV por SIM y MβCD en células 293T. El porcentaje de células infectadas se determinó mediante microscopía de fluorescencia, y la citotoxicidad mediante ensayo de viabilidad basado en MTT. Se muestras los valores de IC50 y CC50 de las drogas debajo de las gráficas. (C) Estudio de la adición de las drogas a diferentes tiempos. Se infectaron células 293T con el virus BUNV (MOI = 1 PFU/célula), a los tiempos indicados (0, 3, 6 hpi) se añadieron simvastatina 25 µM o MβCD 5 mM, y se mantuvieron en el medio de cultivo. Para la condición de pretratamiento (-3 h), las drogas se añadieron 3 horas antes de la infección y se retiraron en el momento de inoculación del virus. Se determinó el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes con al menos dos réplicas cada uno. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Se estudió la inhibición de la infección del virus BUNV en presencia de concentraciones crecientes de simvastatina y MβCD, calculando el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia en células 293T utilizando un anticuerpo anti-N para cuantificar el porcentaje de células infectadas (Figura 25B). Paralelamente, se testó la citotoxicidad de ambos compuestos en células no infectadas mediante un ensayo de viabilidad basado en MTT. Tanto la simvastatina como la MβCD inhibieron eficazmente la infección del BUNV en células 293T con valores de IC50 alrededor de 25 μM y 6 mM, respectivamente. No obstante, en ambos casos el valor de las IC50 se encontraba próximo a la dosis a la que se empezó a observar citotoxicidad.

Para determinar qué etapa del ciclo vital se encontraba afectada por estos compuestos, se infectaron las células 293T y se añadieron simvastatina 20 μM o MβCD 10 mM a diferentes tiempos (Figura 25C). Cuando se añadieron la simvastatina y la MβCD junto al inóculo viral (0 h) y se mantuvieron en el medio de cultivo después de la hora de adsorción, ambas moléculas presentaron alrededor de un 50% de inhibición de la infección respecto al control de infección sin tratar (ND, *no drug*), un dato coherente con las concentraciones que se emplearon, próximas a las IC50 previamente calculadas. Cuando se añadieron a un tiempo de infección más avanzado, a las 3 hpi la simvastatina conservó cierto efecto inhibitorio mientras que, si eran añadidas a las 6 hpi, ambas drogas no tuvieron efecto alguno sobre la infección. El pre-tratamiento de las células con simvastatina no tuvo efecto, sin embargo, el tratamiento con MβCD 5 mM previo a la adición del inóculo viral, sí fue suficiente para inhibir la infección reduciéndose el porcentaje de infección hasta el 20%, y obteniendo un efecto antiviral mayor al obtenido cuando las células se añadía la MβCD junto con el inóculo viral (0 hpi) o a tiempos post-infección más tardíos.

Estos resultados apuntan a que la MβCD estaría inhibiendo la entrada del virus en la célula huésped como consecuencia de la depleción del colesterol de la membrana plasmática; mientras que la simvastatina inhibiría el ciclo de replicación viral en un punto más tardío, posiblemente durante la etapa de biogénesis de la factoría viral o la replicación.

3. Papel de las proteínas transportadoras de lípidos en la infección por BUNV

En el genoma humano hay codificadas un total de 125 proteínas transportadoras de lípidos o LTPs, que se encargan de mediar el transporte no vesicular de lípidos entre membranas celulares. Las LTPs se encuentran ampliamente distribuidas en los sitios de contacto entre membranas (MCS, *Membrane Contact Sites*) de todos los tejidos y tipos celulares, e incluso en el espacio extracelular. Se clasifican en 10 familias diferentes de acuerdo con el dominio

globular de transporte de lípidos (LTD, *Lipid Transport Domain*) que presentan en su estructura molecular (Chiapparino *et al.,* 2015).

3.1. Estudio del cargo lipídico de tres proteínas transportadoras de lípidos: OSBP, CERT y FAPP2

Para la infección del virus BUNV, consideramos especialmente relevantes las LTPs que se localizan en el MCS entre el retículo endoplásmico y las cisternas del *trans*-Golgi, puesto que representan la vía de transporte más rápida para el reclutamiento de lípidos de nueva síntesis hacia la factoría viral del BUNV, establecida a partir de las membranas del aparato de Golgi. Todas LTPs que se localizan en el MCS entre el retículo y el trans-Golgi se han recogido en la Tabla 3, clasificándolas por familias en función de su LTD e indicando tanto sus posibles cargos lipídicos identificados hasta la fecha, como otros dominios funcionales que contienen en su secuencia.

LTP	Nombre completo	Dominio transporte de lípidos	Transporta...						Otros dom.				Cargos lipídicos identificados
			sacarolípidos	esteroles	esfingolípidos	glicerofosfolípidos	glucolípidos	ácidos grasos	otros ligandos	dominio PH	dominio PRELI	dominio GOLD	dominio DDHD	
PLEKHA8	Pleckstrin homology domain-containing family A member 8	**GLTP**			■		■			■				PI4P, Cer, Cer-1P, glucolípidos
GLTPD1	Ceramide-1-phosphate transfer protein				■									Cer-1P
OSBP	Oxysterol-binding protein 1	**OSBP**		■		■				■				Colesterol, PI4P
OSBPL9	Oxysterol-binding protein-related protein 9			■						■				Colesterol
OSBPL11	Oxysterol-binding protein-related protein 11			■						■				Colesterol
CERT	Ceramide transfer protein	**START**			■					■				Cer, Cer-1P, PI4P
STARD5	StAR-related lipid transfer protein 5			■					■					Colesterol, ácido biliar
PITPNM1	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1	**PITP**			■	■							■	PI, PC, PA
PITPNB	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform				■	■								PI, PC, SM
CLVS1	Clavesin-1	**CRAL-TRIO**				■								PI(3,5)P2
CLVS2	Clavesin-2					■								PI(3,5)P2
SEC14L1	SEC14-like protein 1				■				■		■	■		Cer, colina

Tabla 3. Proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) localizadas en el aparato de Golgi. *Se muestran las LTPs que se localizan en el aparato de Golgi por ser el orgánulo utilizado por el BUNV para establecer sus factorías virales. A cada familia de dominios transportadores de lípidos (LTD) se le ha asignado un color de fondo. Puede observarse que dentro de una familia no se comparte necesariamente la misma especificidad de unión a un lípido determinado. Además, se pueden encontrar LTPs de distintas familias con afinidad de unión por el mismo lípido, pudiendo hablar de redundancia de función. Los datos de actividad de unión a lípidos y localización subcelular se obtuvieron de la base de datos de UniProtKB (http://www.uniprot.org/) y a través de búsqueda manual en la literatura.*

Para el presente estudio, se seleccionaron tres LTPs pertenecientes a familias distintas: OSBP, CERT y FAPP2, también conocida como PLEKHA8 (Figura 26A). OSBP co-transporta colesterol desde el retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi y fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) en la dirección contraria. CERT transporta principalmente ceramidas de cadena larga desde el RE hasta el Golgi, siendo este un paso clave en la ruta de biosíntesis de SM, aunque también puede transportar ceramidas-1-fosfato y PI4P. FAPP2 transporta fosfatidilinositol-fosfatos (PIPs) desde el RE hasta el Golgi fundamentalmente, aunque también puede transportar ceramidas, ceramidas-1-fosfato y ciertos glucolípidos.

3.1.1. Sistema de expresión de LTPs inducible por tetraciclina

Para estudiar el cargo lipídico de las LTPs seleccionadas, se utilizaron líneas celulares derivadas de 293T modificadas para sobreexpresar de forma inducible, tras adición de tetraciclina, las proteínas OSBP, CERT o FAPP2 fusionadas en el extremo N-terminal a tres tags distintos: tag de seis histidinas (6xHis), tag de hemaglutinina (HA), y el tag comercial Strep-tag II® (Figura 26B). Los tags HA y 6xHis se utilizaron para la inmunodetección de las LTPs de interés (*western blot* e inmunofluorescencia), mientras que el Strep-tag II se utilizó para purificar las LTPs mediante cromatografía de afinidad.

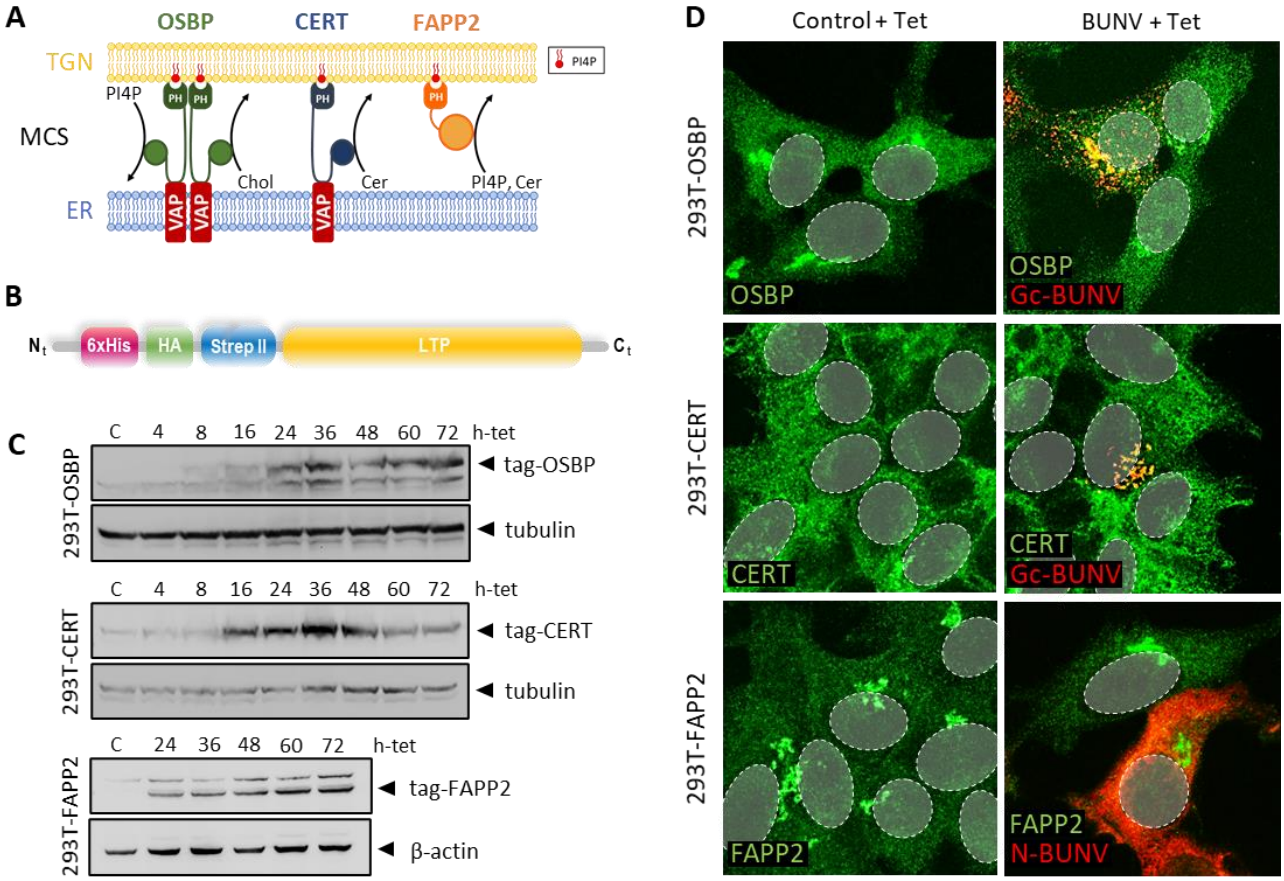


Figura 26. Caracterización de la sobreexpresión inducible por tetraciclina de OSBP, CERT y FAPP2 fusionadas a los tags 6His, HA y StrepTag II. *(A) Esquema de las tres LTPs localizadas en el MCS entre el ER y el trans-Golgi estudiadas en el presente trabajo: OSBP (transporta PI4P y colesterol), CERT (transporta ceramidas), y FAPP2/PLEKHA8 (transporta PI y ceramidas). (B) Construcción de las LTPs clonadas con el triple tag 6His-HA-StrepTag II. (C) Detección mediante electroforesis y western blot de las proteínas OSBP, CERT y FAPP2 después de inducir su expresión por tratamiento con tetraciclina a diferentes tiempos. Se utilizó un anticuerpo primario anti-HA para detectar las bandas correspondientes a las LTPs y un anticuerpo anti-tubulina como control de carga. (D) Microscopía de fluorescencia de células 293T-OSBP, 293T-CERT y 293T-FAPP2 inducidas, no infectadas e infectadas con virus BUNV (MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi). Se marcaron las LTPs con un anticuerpo anti-HA (verde), y se detectó la infección por BUNV con anticuerpos anti-Gc o anti-N (rojo).*

Para validar el funcionamiento del sistema de expresión y establecer las condiciones de inducción de las tres LTPs, se cultivaron las correspondientes líneas celulares 293T en presencia de tetraciclina a una concentración de 2 µg/ml. Se monitorizó la sobreexpresión

a tiempos crecientes mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA para la detección de las LTPs y un anticuerpo anti-tubulina como control de carga (Figura 26C). En el caso de OSBP y FAPP2 se observó que la sobreexpresión de estas LTPs aumentaba su concentración intracelular progresivamente hasta las 72 h después de añadir tetraciclina al medio de cultivo. Sin embargo, la sobreexpresión de CERT presentaba un máximo a las 36 horas tras la adición de tetraciclina y después empezaba a decaer, debido posiblemente a que esta proteína podría tener una vida media menor. Además, también se estudió la sobreexpresión de las LTPs mediante microscopía de fluorescencia tanto en células no infectadas como en presencia del BUNV. Para este ensayo, se cultivaron las células durante 36 h en presencia de tetraciclina y, pasado ese tiempo, se infectaron con el virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Se utilizó un anticuerpo primario anti-HA para marcar las LTPs y un anticuerpo anti-Gc o anti-N para marcar las células infectadas. En células control, el patrón de localización de OSBP resultó ser citoplasmático con acumulación en una zona yuxtanuclear compatible con el aparato de Golgi; el patrón de CERT era citosólico sin distinguirse una acumulación específica en ningún orgánulo, y FAPP2 presentaba una localización preferentemente en el aparato de Golgi. En células infectadas por el BUNV, no se apreció un cambio de localización evidente de CERT ni de FAPP2, mientras que en el caso de OSBP la señal parecía concentrarse en las factorías virales derivadas del aparato de Golgi coincidiendo con la señal de Gc (Figura 26D).

3.1.2. Purificación de los complejos LTP-lípido

Se estudió el cargo lipídico de OSBP, CERT y FAPP2 en células control y células infectadas por el BUNV mediante un protocolo de purificación de los complejos LTP-lípido, extracción del cargo lipídico y análisis mediante cromatografía en capa fina y/o espectrometría de masas puesto a punto por el grupo de investigación de nuestra colaboradora la Dra. Anne-Claude Gavin en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, EMBL-Heidelberg (Figura 27A).

Para purificar los complejos LTP-lípido, se sembraron las células 293T-OSBP, 293T-CERT y 293T-FAPP2, y se cultivaron en presencia de tetraciclina 2 µg/ml durante 72 h para obtener un pellet celular de 4 ml. A las células 293T-CERT se les añadió una dosis adicional de tetraciclina a las 36 h puesto que, como se había visto previamente, a partir de ese tiempo empezaba disminuir la concentración intracelular de esta proteína. En el caso de las muestras procedentes de células infectadas, 64 h después de la adición de tetraciclina se retiró el medio de cultivo y se añadió virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. Después de la hora de adsorción viral, se descartó el inóculo, se añadió medio DMEM fresco con 2 µg/ml de tetraciclina y se incubaron las células hasta las 8 hpi.

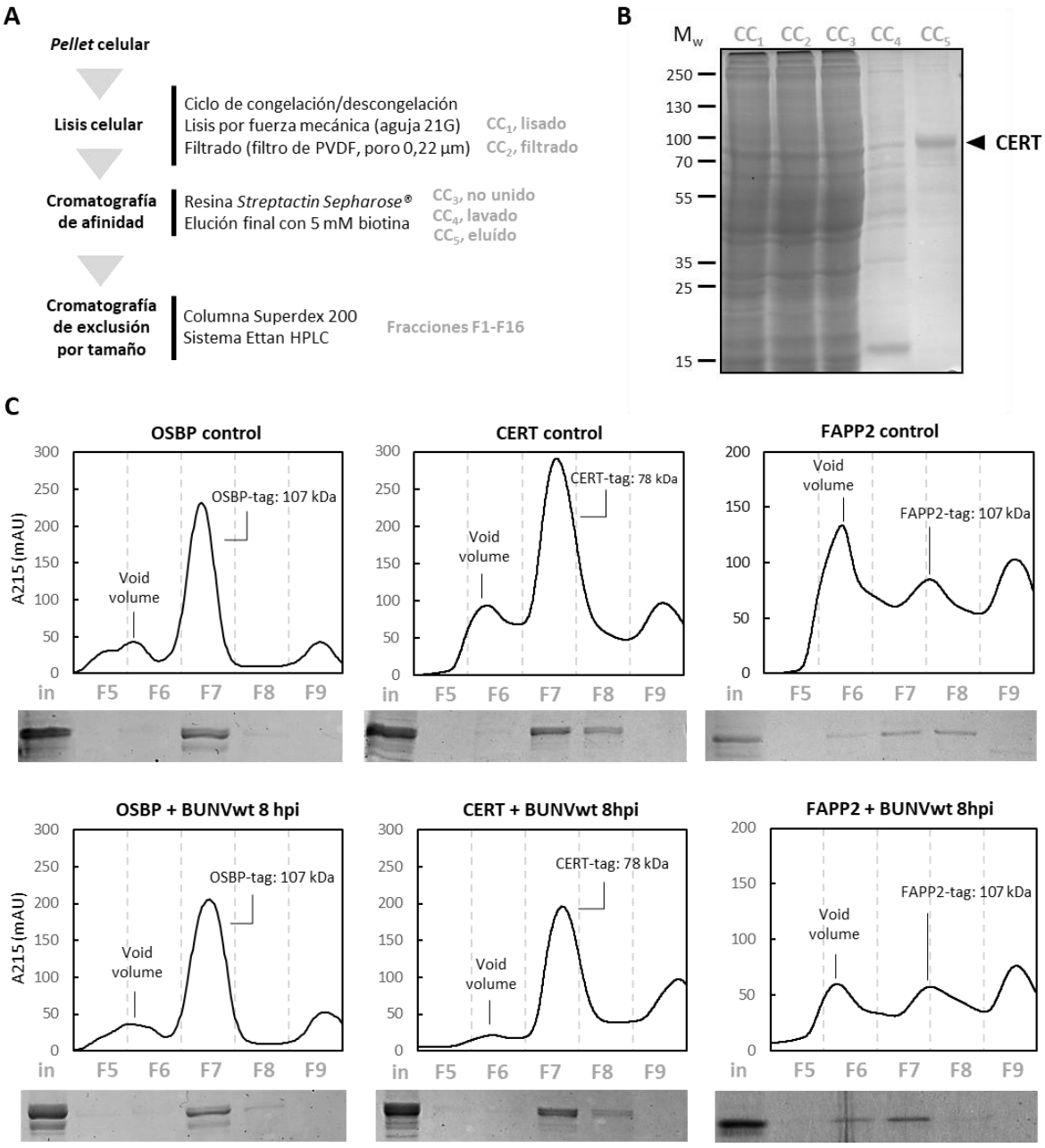


Figura 27. Purificación de los complejos LTP-cargo lipídico. (A) Esquema del proceso de purificación de los complejos LTPs-lípido correspondientes a OSBP, CERT y FAPP2 en células control y células infectadas. *Se recogieron muestras en los puntos indicados para realizar un control de calidad (CC) del proceso de purificación. (B) Imagen de un gel de electroforesis teñido con azul de Coomasie en el que se cargaron los distintos controles de calidad (CC1-5). Este ejemplo corresponde al proceso de purificación de la muestra CERT de células control. (C) Para cada LTP purificada, el panel superior muestra el cromatograma de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Size Exclusion Chromatography) correspondiente a las fracciones F5 a F9. El panel inferior muestra el resultado de la tinción con azul de Coomasie de un gel de electroforesis para las mismas fracciones. Void volume, indica el pico a partir del cual empezó a eluir la muestra aplicada en la columna de la SEC. In (input), se corresponde con la muestra que se inyectó en la columna de la SEC.*

Para seguir el proceso de purificación, se recogieron alícuotas en los diferentes pasos de lisis, filtrado y cromatografía de afinidad con resina de Strep-tactina (controles de calidad CC_1-CC_5), se cargaron en un gel de PAGE-SDS y se analizaron mediante electroforesis tiñendo con azul de Coomasie. En la Figura 27B se muestra el resultado representativo de

uno de estos geles, en concreto de la muestra de CERT purificada a partir de células control no infectadas. En él se puede observar la diferencia entre la fracción procedente del lisado celular (CC_1) y la fracción que eluyó de la columna de cromatografía de afinidad (CC_5), enriquecida en la LTP que se estaba purificando.

El último paso en la purificación de los complejos LTP-lípido consistió en inyectar la fracción eluída de la columna de afinidad en una segunda columna de cromatografía, en este caso de exclusión por tamaño (SEC, *size exclusion chromatography*), acoplada a un sistema de HPLC. La SEC permitió una separación eficiente de los complejos LTP-lípido de otras partículas ricas en lípidos y de mayor tamaño que habrían co-purificado en la cromatografía de afinidad. Estas partículas de mayor tamaño eluyeron cerca del volumen de exclusión o *void volume*. Gracias al rango de la columna de SEC elegida, el pico de elución de las LTPs se situó entre las fracciones 7 y 8. En la Figura 27C se recoge la zona central de los cromatogramas obtenidos para las 6 muestras analizadas. En los paneles inferiores se muestra el análisis adicional de las fracciones F5 a F9 mediante electroforesis en gel de PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie.

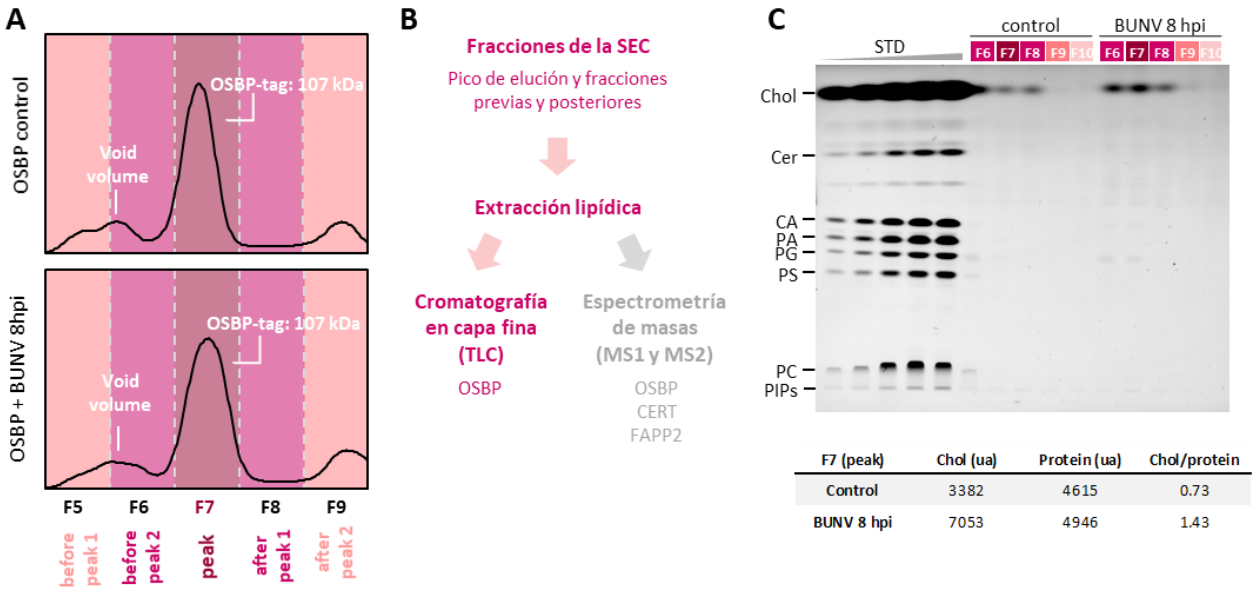
3.1.3. Estudio del cargo lipídico de OSBP mediante cromatografía en capa fina

El principal cargo lipídico que se esperaba encontrar unido al bolsillo hidrofóbico de OSBP era colesterol. No obstante, no es posible determinar el contenido en colesterol de una muestra utilizando las técnicas convencionales de ionización por electrospray y espectrometría de masas. Por este motivo, se decidió analizar, en primer lugar, el cargo lipídico que transportaba OSBP en células 293T control e infectadas con BUNV mediante cromatografía en capa fina o TLC, que sí permite la identificación de colesterol, antes de pasar al análisis mediante espectrometría de masas en busca de otros posibles cargos lipídicos diferentes.

Se seleccionaron las fracciones correspondientes al pico de elución de la proteína OSBP en la SEC (fracción F7, *peak*) y de las dos fracciones anteriores y posteriores al pico de elución (*before peak 1-2* y *after peak 1-2*) (Figura 28A); y se sometieron a un proceso de extracción lipídica. Los extractos lipídicos secos se aplicaron sobre una placa de sílice para TLC, junto con un control que contenía diferentes estándares lipídicos conocidos, y se desarrolló la placa utilizando un sistema de solventes orgánicos que permitía la separación cromatográfica de las distintas clases de fosfolípidos, el colesterol y las ceramidas.

El resultado mostró que el principal lípido transportado por OSBP en ambas condiciones, control e infección, era el colesterol (Figura 28C). Se cuantificó el colesterol de la fracción correspondiente al pico de elución por densitometría de las bandas obtenidas y

la cantidad de proteína en esa misma fracción, y se calculó la relación del colesterol transportado por cantidad de proteína OSBP (chol/prot). Se obtuvieron valores de 0,73 y 1,43 para las muestras procedentes de células control y de células infectadas, respectivamente. El valor de la ratio chol/prot durante la infección por el BUNV resultó ser del doble con respecto al control.



F7 (peak)	Chol (ua)	Protein (ua)	Chol/protein
Control	3382	4615	0.73
BUNV 8 hpi	7053	4946	1.43

Figura 28. Análisis del cargo lipídico de OSBP mediante cromatografía en capa fina (TLC). *(A) Cromatogramas de la SEC correspondientes a los complejos OSBP-cargo lipídico purificados a partir de células control y células infectadas con el BUNV 8 hpi. Se recogieron las fracciones correspondientes al pico de elución del complejo OSBP-cargo lipídico (F7, PEAK), así como las dos fracciones anteriores y posteriores (before peak y after peak). (B) Esquema de los pasos del protocolo realizado. (C) Cromatograma de la TLC para las muestras de OSBP procedentes de la SEC. La tabla inferior muestra la concentración de proteína (mediante ensayo BCA), la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes al colesterol, y la relación colesterol/proteína de las fracciones F7 correspondientes al pico de elución de la SEC. Estándares lipídicos: ácido fosfatídico (PA), cardiolipina (CL), ceramida (cer), colesterol (chol), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina/-etanolamina/-serina/-inositoles (PC, PE, PS, PIPs), lisofosfatidilcolina (LPC).*

3.1.4. Estudio del cargo lipídico de OSBP, CERT y FAPP2 mediante espectrometría de masas

Para finalizar, se analizó el cargo lipídico de las tres LTPs seleccionadas mediante espectrometría de masas. Se llevó a cabo la extracción lipídica tanto de la fracción correspondiente al pico de elución de la proteína en la SEC (*peak*) como de la fracciones inmediatamente anterior y posterior (controles *before peak* y *after peak*); y los extractos lipídicos correspondientes se procesaron por HPLC-MS/MS independientemente. Los cromatogramas, los valores de masa/carga (m/z) y el tiempo de retención de cada ión precursor obtenidos por MS fueron analizados siguiendo un protocolo de procesamiento de datos diseñado para este tipo particular de muestras en la Unidad de Biología Computacional del EMBL-Heidelberg. Este protocolo combinaba el empleo de un algoritmo

informático programado *ex proceso*, con la búsqueda y comparación manual de los cromatogramas en la base de datos SwissLipids. Se compararon los lípidos presentes en el grupo muestral (*peak*) y los grupos control (*before peak* y *after peak*), para determinar las características de los lípidos que se encontraban enriquecidos en el grupo muestral. Al final del proceso de análisis, se obtuvo la identificación de una serie de lípidos agrupados en dos listas, correspondientes a los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente (Figura 29).

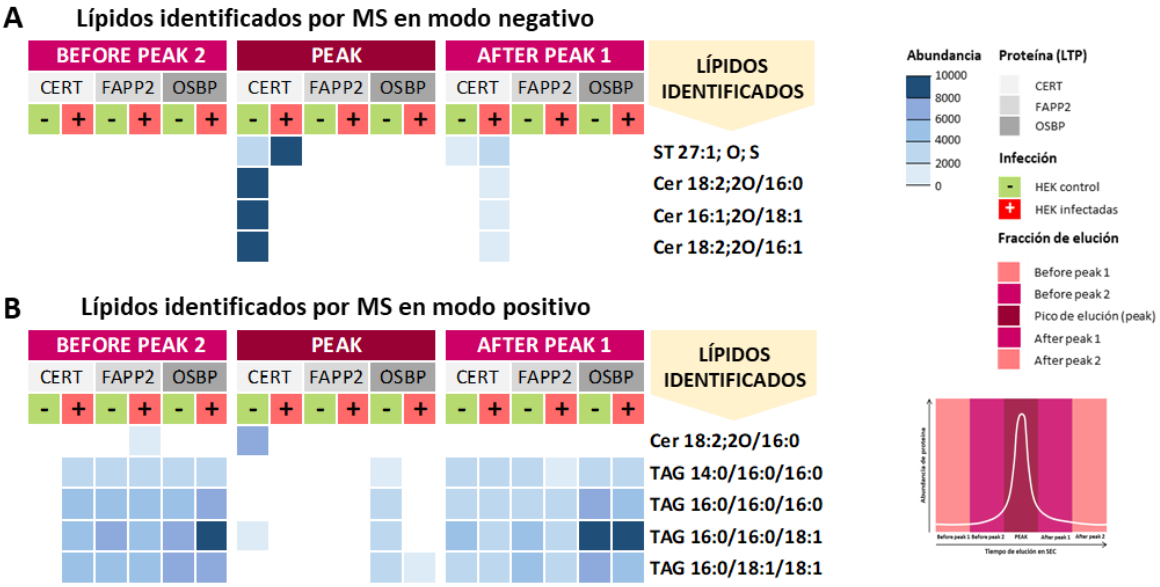


Figura 29. Determinación del cargo lipídico de OSBP, CERT y FAPP2 mediante espectrometría de masas. *Se muestran los lípidos identificados por espectrometría de masas en modo negativo (A) y en modo positivo (B) según su abundancia en los extractos lipídicos de las fracciones correspondientes con el pico de elución en la HPLC (PEAK), la fracción anterior y la posterior (before peak y after peak). Para cada LTP, se comparó el cargo lipídico en ausencia (HEK control) y en presencia del BUNV (HEK infectadas). Esterol sulfato (ST 27:1; O; S); Cer, ceramida; TAG, triacilglicérido. El análisis del cargo lipídico a partir de los datos procedentes de espectrometría de masas lo llevó a cabo el Dr. Kevin Titeca, bajo la supervisión de la Dra. Anne-Claude Gavin en el EMBL-Heidelberg.*

No se pudo identificar mediante espectrometría de masas ningún cargo lipídico específico en las fracciones correspondientes al pico de elución de la SEC (*peak*) para las muestras de OSBP ni FAPP2. Aunque hay que tener en cuenta que los principales lípidos que transportan estas dos proteínas, el colesterol y los fosfatidilinositol-fosfatos, no son detectables mediante protocolos convencionales de análisis por MS, sino que se requiere un paso previo de derivación química, una de las principales limitaciones de esta técnica. Los triacilglicéridos (TAGs) identificados en modo positivo se habían reportado previamente como resultados inespecíficos, que aparecían habitualmente cuando se seguía este protocolo de purificación de los complejos LTP-lípido. Además, cabe destacar que estos TAGs se encontraban enriquecidos en los grupos control, pero no en la fracción correspondiente al pico de elución del complejo LTP-lípido en la SEC.

En el caso de CERT, se observó un resultado inesperado. Mientras que en la proteína purificada a partir de células control no infectadas los cargos lipídicos identificados fueron ceramidas de cadena larga, en concreto de las especies Cer 18:2/16:0, Cer 16:1/18:1 y Cer 18:2/16:1, que se correspondían con los cargos lipídicos descritos previamente para esta LTP; en células infectadas se identificó el colesterol sulfato (denotado en la Figura 29 como ST 27:1; O; S) como el principal cargo lipídico. Este hecho resultaba muy interesante, dado que en la bibliografía no se había descrito previamente que este lípido, el colesterol sulfato, pudiera ser transportado por la proteína CERT.

3.2. Papel de la proteína OSBP durante la infección por BUNV

De las tres LTPs estudiadas, la que presentaba un mayor potencial como diana celular para la búsqueda de moléculas antivirales frente a bunyavirus era OSBP por varios motivos: (1) OSBP es la principal proteína que transporta colesterol desde el RE hasta el aparato de Golgi, orgánulo a partir del cual BUNV establece su factoría viral; (2) durante la infección del BUNV habíamos visto una acumulación de colesterol en el orgánulo de replicación (derivado del aparato de Golgi), y en las partículas virales que se ensamblan en sus membranas; (3) en el estudio del cargo lipídico de OSBP, se observó que parecía estar transportando una mayor cantidad de colesterol durante la infección; y (4) existían dos inhibidores comerciales de OSBP, uno aprobado para el consumo humano, el itraconazol, y otro utilizado en investigación, la orsaponina u OSW-1.

3.2.1. Efecto de la sobreexpresión de OSBP durante la infección

En primer lugar, se caracterizó el efecto de la sobreexpresión de OSBP en la infección del virus BUNV. Para ello se indujo la sobreexpresión de esta LTP en la línea celular 293T-OSBP mediante la adición de tetraciclina 2 μg/ml al medio de cultivo. A las 36 horas de tratamiento, las células se infectaron con el BUNV a una MOI de 1 PFU/célula durante 8 hpi. Se realizó un estudio por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-HA policlonal producido en conejo para marcar la proteína OSBP, y un anticuerpo monoclonal anti-Gc para marcar las factorías virales. Se observó que se producía una acumulación de OSBP en las factorías virales con marcaje de Gc (Figura 30A).

También se estudió el título viral intracelular y extracelular expresado en PFU/ml obtenido en células 293T control y en células que sobreexpresaban OSBP. Se observó un incremento significativo en el título viral cuando la infección tenía lugar en células 293T que sobreexpresaban OSBP, multiplicándose por dos y por tres el título viral extra e intracelular, respectivamente (Figura 30C). Sin embargo, la sobreexpresión de OSBP no se tradujo en una

progresión más rápida de la infección en términos de porcentaje de células infectadas (Figura 30B).

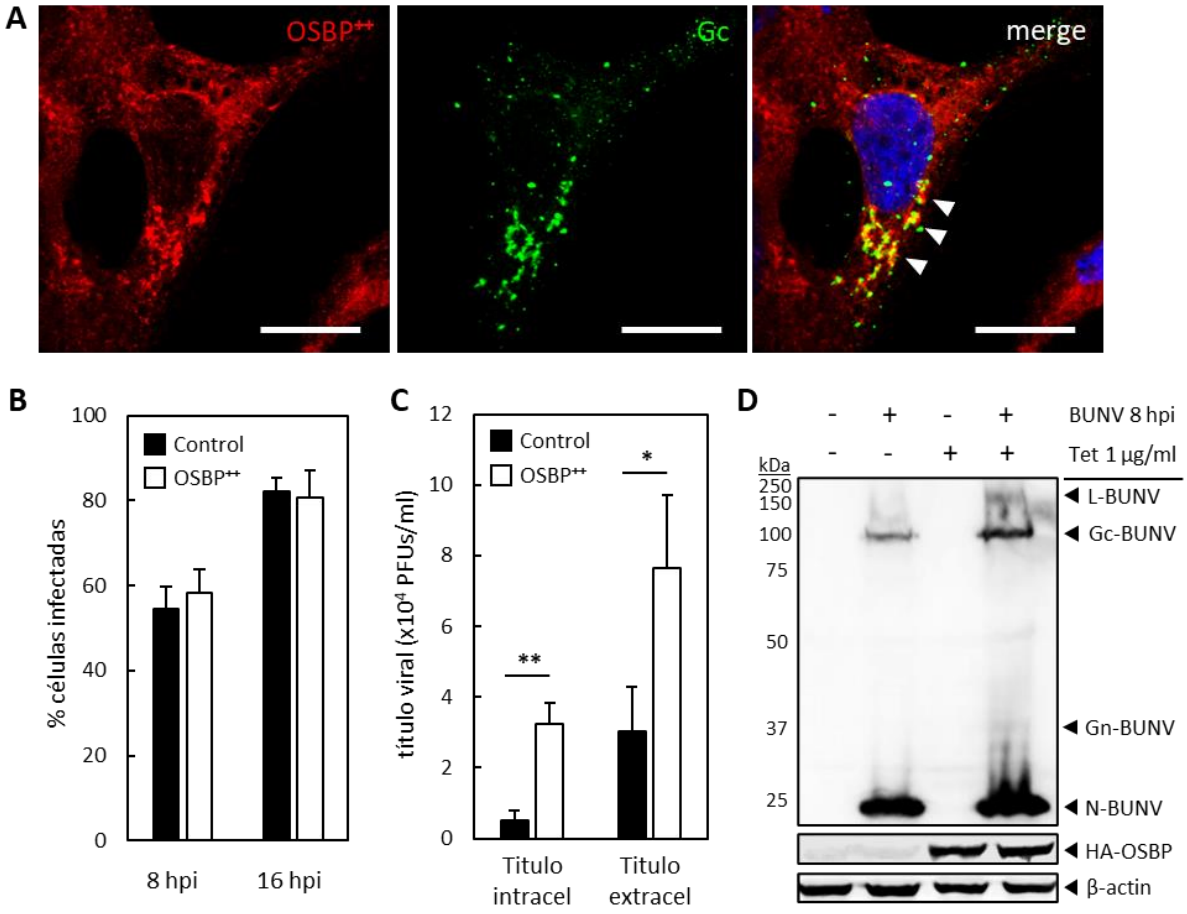


***Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de OSBP en la infección**. (A) Células 293T-OSBP a las que se indujo la expresión de OSBP-HA mediante tratamiento con tetraciclina. A las 36 horas del tratamiento, se infectaron las células con el BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. La proteína OSBP se marcó con un anticuerpo anti-HA (rojo), las factorías virales con un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína viral Gc (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las puntas de flecha blancas señalan puntos de solapamiento de la señal de ambas proteínas. Barras de escala: 20 µm. (B) Cuantificación del porcentaje de células infectadas a 8 y 16 hpi a partir del estudio mediante microscopía de fluorescencia en células 293T-OSBP control sin inducir y células 293-OSBP a las que se indujo la sobreexpresión de OSBP-HA por tratamiento con tetraciclina. (C) Cuantificación del título viral intra y extracelular de los medios de cultivo de células 293T-OSBP inducidas o no inducidas por tratamiento con tetraciclina, e infectadas con el BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar. *p<0,05; ** p<0,01. (D) Detección mediante electroforesis y western blot de las proteínas estructurales del BUNV y la proteína OSBP con anticuerpos primarios anti-BUNV (policlonal) y anti-HA, respectivamente. Se utilizó la detección de β-actina con un anticuerpo específico como control de carga.*

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la sobreexpresión inducida de OSBP en la cantidad intracelular de las proteínas virales Gc y N a las 8 hpi mediante electroforesis y *western blot*, utilizando un antisuero policlonal que reconoce las proteínas estructurales del virus BUNV, monitorizando la sobreexpresión de OSBP mediante un anticuerpo anti-HA y utilizando un anticuerpo anti-β-actina como control de carga (Figura 30D). El resultado mostró que la sobreexpresión de OSBP producía un incremento y acumulación de proteínas virales en el

interior de las células infectadas. De hecho, pudieron observarse las proteínas virales Gn y L, que normalmente no pueden detectarse mediante *western blot*.

3.2.2. Localización de OSBP durante la infección

Para estudiar con mayor detalle la localización de OSBP durante la infección, se cultivaron células 293T-OSBP tratadas 36 horas con tetraciclina y se infectaron con el virus recombinante rBUNVGc-eGFP, cuya proteína de la envuelta Gc está truncada y fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*). Este virus posee una infectividad más baja y una dinámica más lenta, por lo que las células se infectaron a una MOI de 5 PFU/célula y 16 hpi. Pasado ese tiempo, las células se fijaron y procesaron para MF con un anticuerpo anti-HA para localizar la proteína OSBP, y un anticuerpo anti-gigantina para marcar el compartimento *cis-media* Golgi (Figura 31A-F). El resultado mostró que, durante la infección, la proteína OSBP era reclutada al aparato de Golgi con señal de gigantina (al igual que la proteína viral Gc-GFP), disminuyendo su concentración libre en el citoplasma. Aunque ambas proteínas eran reclutadas al aparato de Golgi, las señales de fluorescencia de la glicoproteína viral Gc y de OSBP solo presentaban un solapamiento parcial en algunos puntos. Esto implicaba que no estaban ubicadas exactamente en las mismas regiones del Golgi. Mientras Gc se encontraría acumulada principalmente en el compartimento *cis-media* Golgi (puesto que la señal de Gc se correlaciona con el marcaje de gigantina) y en las zonas de ensamblaje de nuevas partículas virales, OSBP podría estar desplazada hacia el compartimento trans-Golgi y/o en los complejos replicativos.

Para apoyar el resultado obtenido por MF, se realizó un inmunomarcaje de criosecciones y observación por ME según la técnica de Tokuyasu (Tokuyasu, 1973; Sasche *et al.,* 2018). Para este estudio, las células 293T-OSBP fueron igualmente tratadas con tetraciclina 2 µg/ml durante 36 horas, infectadas con virus BUNV a 1 PFU/célula y fijadas a las 8 hpi. Las criosecciones se procesaron para inmunomarcaje con un anticuerpo primario monoclonal anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm a una concentración 1:50. El inmunomarcaje de criosecciones por el método de Tokuyasu permite localizar e identificar las moléculas de interés dentro del entorno celular, siendo su principal limitación el hecho de que solo es posible detectar los epítopos moleculares que quedan expuestos en la superficie de las secciones. Mediante esta técnica, se consiguió localizar la proteína OSBP en el interior de las esférulas virales de BUNV (Figura 31G-I), siendo la primera vez que se ha descrito la localización de una proteína transportadora de lípidos en el interior de los complejos replicativos de un virus. Este dato es coherente con la ausencia de colocalización de Gc y OSBP en Golgi, ya que la glicoproteína

Gc de BUNV no está presente en los complejos replicativos, sino que se acumula en las membranas del Golgi correspondientes con las zonas de ensamblaje y *budding* viral.

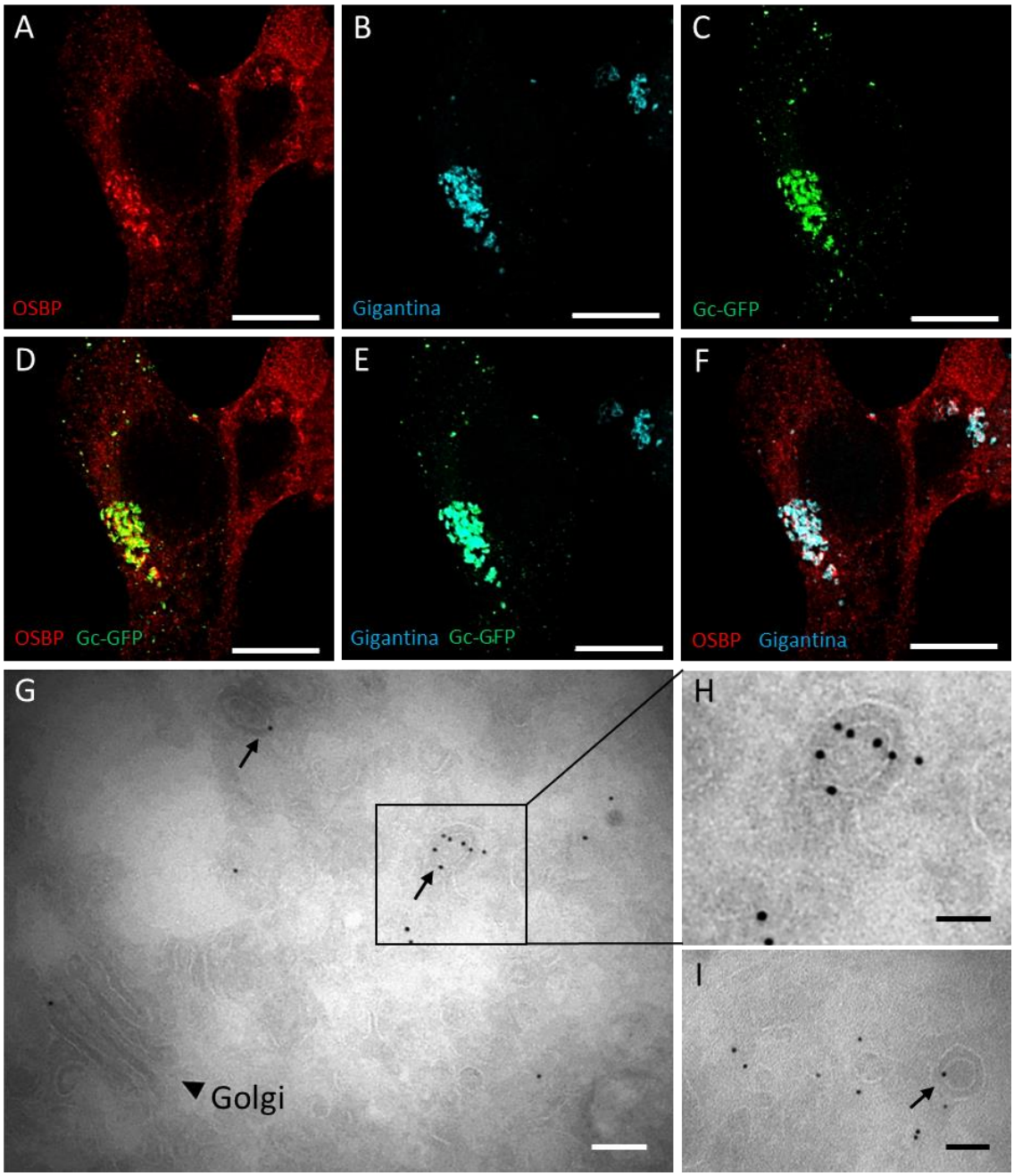


Figura 31. Localización subcelular de OSBP mediante microscopía confocal e inmunomarcaje en criosecciones para microscopía electrónica. *(A-F) Células 293T-OSBP a las que se indujo la expresión de OSBP-HA mediante tratamiento con tetraciclina. A las 36 horas del tratamiento, se infectaron las células con el virus recombinante rBUNGc-eGFP a una MOI de 1 PFU/célula y 16 hpi. La proteína OSBP se marcó con un anticuerpo anti-HA (rojo) y el Golgi con un anticuerpo anti-gigantina (azul), la proteína viral Gc (verde) se utilizó como marcador de la factoría viral. (G-I) Imágenes de ME de criosecciones de células 293T-OSBP inducidas con tetraciclina e infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. La proteína OSBP se localizó mediante marcaje con un anticuerpo primario anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm. La punta de flecha señala los sáculos del aparato de Golgi y las flechas indican partículas de oro coloidal en el interior de las esférulas virales. Barras de escala: 20µm en A-F, 100nm en G e I; 50nm en H.*

3.2.3. La inhibición de la actividad de OSBP como diana para el desarrollo de estrategias antivirales

Como se ha mencionado previamente, se seleccionaron dos compuestos cuya capacidad para inhibir la actividad de OSBP ya se había descrito con anterioridad, el itraconazol y la OSW-1 (Strating *et al.,* 2015; Burgett *et al.,* 2011) (Figura 32A), y se evaluó su capacidad para bloquear la infección del virus BUNV. El itraconazol (ITZ) es un antimicótico perteneciente a la familia de los triazoles que se utiliza en clínica para tratar infecciones micóticas tanto en pulmones como en uñas y piel, y candidiasis de la boca, garganta y esófago; mientras que la orsaponina u OSW-1 es una molécula aislada de la planta bulbosa *Albuca bracteata* que se utiliza en investigación por ser un antagonista específico de las proteínas OSBP y ORP4 (*OSBP-related protein 4*).

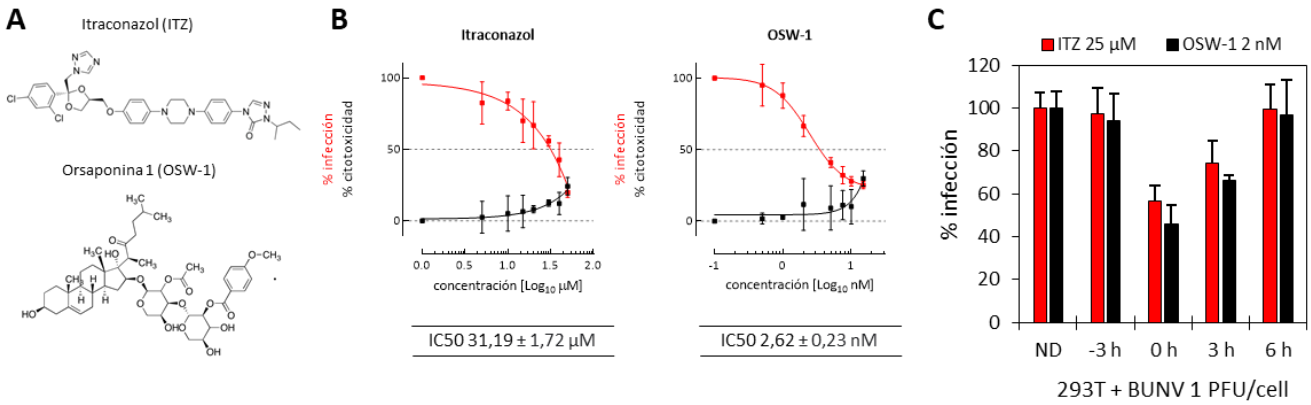


Figura 32. Efecto de los inhibidores de OSBP, itraconazol y OSW-1 sobre la infección del BUNV en células 293T. *(A) Estructura molecular del itraconazol (ITZ) y la orsaponina (OSW-1). (B) Ensayo de citotoxicidad y curva de inhibición de la infección de BUNV por ITZ y OSW-1 en células 293T. El porcentaje de células infectadas se determinó mediante microscopía de fluorescencia, y la citotoxicidad mediante ensayo de viabilidad basado en MTT. Se muestras los valores de la IC50 de las drogas debajo de las gráficas. (C) Efecto de la adición de las drogas a diferentes tiempos: se infectaron células 293T con el virus BUNV (MOI de 1 PFU/célula), a los tiempos indicados (0, 3, 6 hpi) se añadieron ITZ 25 µM u OSW-1 2 nM, y se mantuvieron en el medio de cultivo. Para la condición de pretratamiento (-3 h), las drogas se añadieron 3 horas antes de la infección y se retiraron en el momento de inoculación del virus. Se determinó el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes con al menos dos réplicas cada uno. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Se estudió la progresión de la infección del BUNV en presencia de concentraciones crecientes de itraconazol y OSW-1, calculando el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia en células 293T utilizando un anticuerpo anti-N para cuantificar el porcentaje de células infectadas (Figura 32B). Paralelamente, se testó la citotoxicidad de ambos compuestos en células no infectadas mediante un ensayo de viabilidad basado en MTT. Tanto el itraconazol como la OSW-1 inhibieron la infección de BUNV en células 293T con unos valores IC50 de 31,19 ± 1,72 µM y 2,62 ± 0,23 nM respectivamente, sin que se observara citotoxicidad para estas concentraciones.

Para determinar qué etapa del ciclo de replicación viral se encontraba afectada por estos compuestos, se infectaron células 293T a una MOI de 1 PFU/célula, añadiendo a diferentes tiempos itraconazol 25 μM u OSW-1 2 nM (Figura 32C). El pretratamiento con ambas drogas no afectó a la infectividad del virus, descartándose que el mecanismo de inhibición actuara sobre etapas tempranas de adhesión y entrada del virus en la célula. Cuando se añadieron junto al inóculo viral (0 h) y se mantuvieron en el medio de cultivo después de la hora de adsorción, ambas moléculas presentaron alrededor de un 50% de inhibición de la infección respecto al control de infección sin tratar (ND, *no drug*), un dato coherente con las concentraciones que se habían empleado, próximas a las IC50. Cuando el itraconazol y la OSW-1 se añadieron a las 3 hpi también se observó una disminución en el porcentaje de infección, pero en menor medida que cuando se añadieron las drogas junto al inóculo viral. En este caso la infección se redujo un 30% con respecto al control sin tratar. Sin embargo, el tratamiento a un tiempo más tardío (6 hpi) no tuvo efecto en la infección.

3.2.4. Efectos de la inhibición farmacológica de OSBP

Para continuar con la caracterización del mecanismo de acción del itraconazol y la OSW-1, se llevaron a cabo experimentos adicionales mediante microscopía óptica de fluorescencia y electrónica.

a. Efecto sobre la expresión de proteínas virales N y Gc

Para estudiar el efecto del itraconazol (ITZ) y la OSW-1 en la producción de las proteínas virales N y Gc, se infectaron células 293T con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula, y se añadieron al medio de cultivo ITZ 10 μM u OSW-1 2 nM desde el inicio de la infección. A las 8 hpi las células se fijaron y se procesaron para microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos primarios anti-Gc y anti-N (Figura 33A). Se cuantificó la señal relativa de fluorescencia de las proteínas N y Gc, normalizada en función del número de células por campo, y se calculó la relación entre las señales de Gc y de N (Figura 33B-C). Cuando las células se trataron con itraconazol u OSW-1, se observó una reducción significativa de un 50-60% en la señal de la proteína viral N. Sorprendentemente, a pesar de utilizar unas dosis de ITZ y OSW-1 cercanas a los valores de sus respectivas IC50 determinadas previamente, la señal de Gc se redujo más del 90% con respecto a la infección control.

Cabe recordar que, debido al diseño del protocolo empleado basado en microscopía de fluorescencia (*Sección 3.2.2.*), los valores de IC50 habían sido determinados en base a la señal de fluorescencia de la proteína N del BUNV. No obstante, a la vista del resultado obtenido en este experimento, el valor de la IC50 real para el itraconazol y la OSW-1 muy probablemente sea menor al calculado previamente.

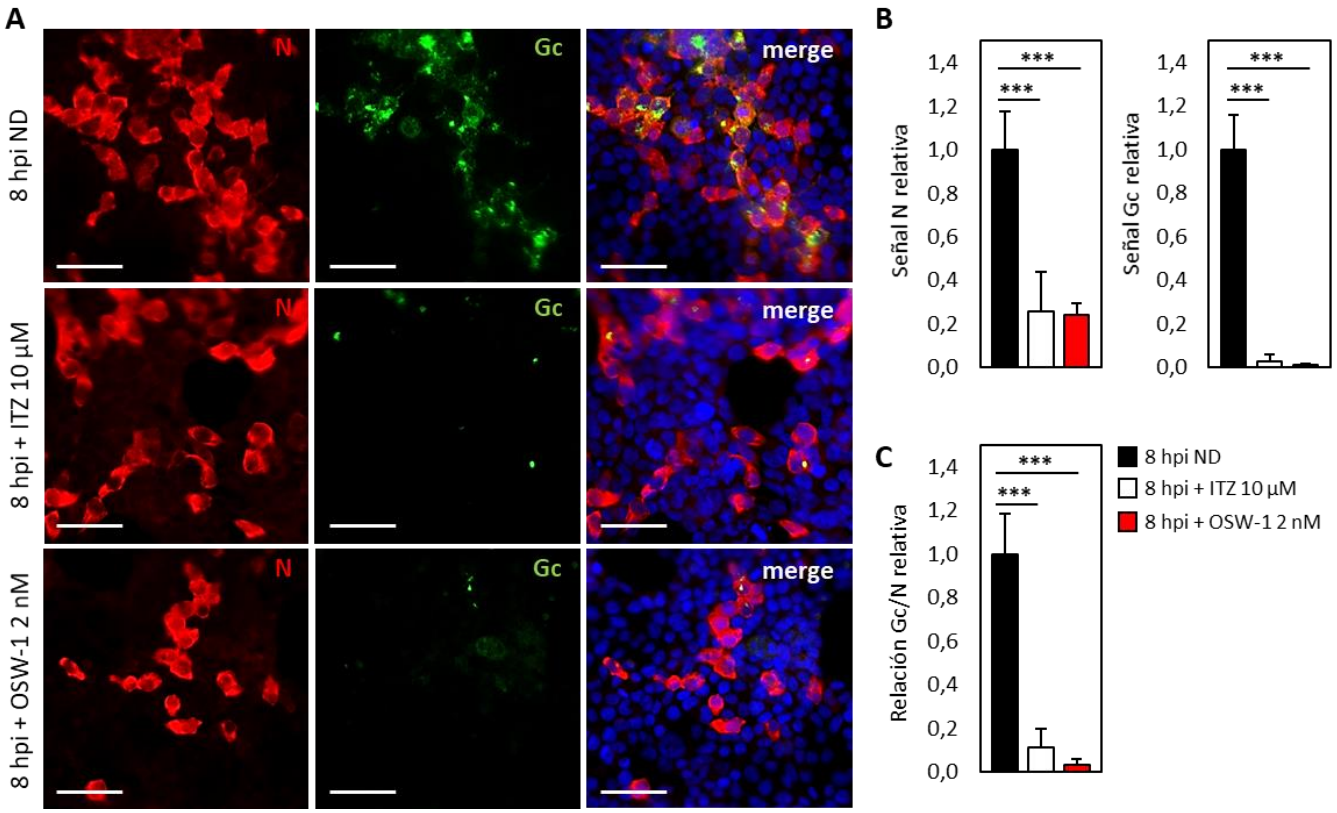


Figura 33. Efecto de la inhibición de OSBP en la señal de N y Gc. *Se infectaron células HEK293T con virus BUNV (MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi) en ausencia (ND, no drug) o en presencia de itraconazol (10 µM) y OSW-1 (2 nM). Se procesaron las muestras para microscopía de fluorescencia con doble marcaje para las proteínas virales N (de transcripción temprana, en rojo) y Gc (de transcripción tardía, en verde) (A). Se cuantificó el porcentaje de células con señal de N y Gc y se normalizó con respecto a la condición en ausencia de droga (B). Se calculó la relación de la señal de la proteína Gc con respecto a la proteína N para cada condición (relación Gc/N) y se normalizó el resultado con respecto a la infección en ausencia de droga (C). Barras de escala en A: 30 µm. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. ***, p-valor < 0,001. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

b. Efecto sobre la localización del colesterol intracelular

Tanto el itraconazol como la OSW-1 son inhibidores de OSBP, y esta proteína se encarga de transportar el colesterol desde el RE hasta el aparato de Golgi. Para estudiar la localización del colesterol tras el tratamiento con ambas drogas, se incubaron células 293T durante 8 h con ITZ 10 µM u OSW-1 2 nM, se fijaron y procesaron para microscopía de fluorescencia marcando el colesterol intracelular con la sonda filipina III. Se incluyeron los siguientes controles: (1) células 293T sin tratar; (2) células infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi; y (3) células tratadas con U18666A, un inhibidor de la proteína NPC1 (*Niemann Pick C1*) que transporta colesterol entre lisosomas y RE. La inhibición de NPC1 produce la acumulación de colesterol en el sistema endo-lisosomal, por lo que se ha utilizado como control positivo de cambio de localización y acumulación de colesterol.

En las células 293T control no infectadas y sin tratar, el colesterol se distribuye homogéneamente en la membrana plasmática y orgánulos intracelulares, observándose

pequeñas acumulaciones citoplasmáticas de forma aislada (Figura 34A). En las células infectadas, el colesterol se acumuló en una zona yuxtanuclear compatible con el aparato de Golgi (Figura 34B, flechas negras) que se corresponderían con los sitios de replicación del BUNV, como ya se había observado previamente. El tratamiento con U18666A dio lugar a un patrón de acumulación de colesterol en estructuras vesiculares compatibles con lisosomas (Figura 34C). En células 293T tratadas con ITZ 10 µM (Figura 34D), el patrón de acumulación de colesterol fue muy similar al del tratamiento con U1866A, pudiendo observarse una acumulación de colesterol en estructuras vesiculares distribuidas por todo el citoplasma. Sin embargo, el tratamiento con OSW-1 2 nM (Figura 34E) no parecía alterar la localización del colesterol con respecto al control sin tratar.

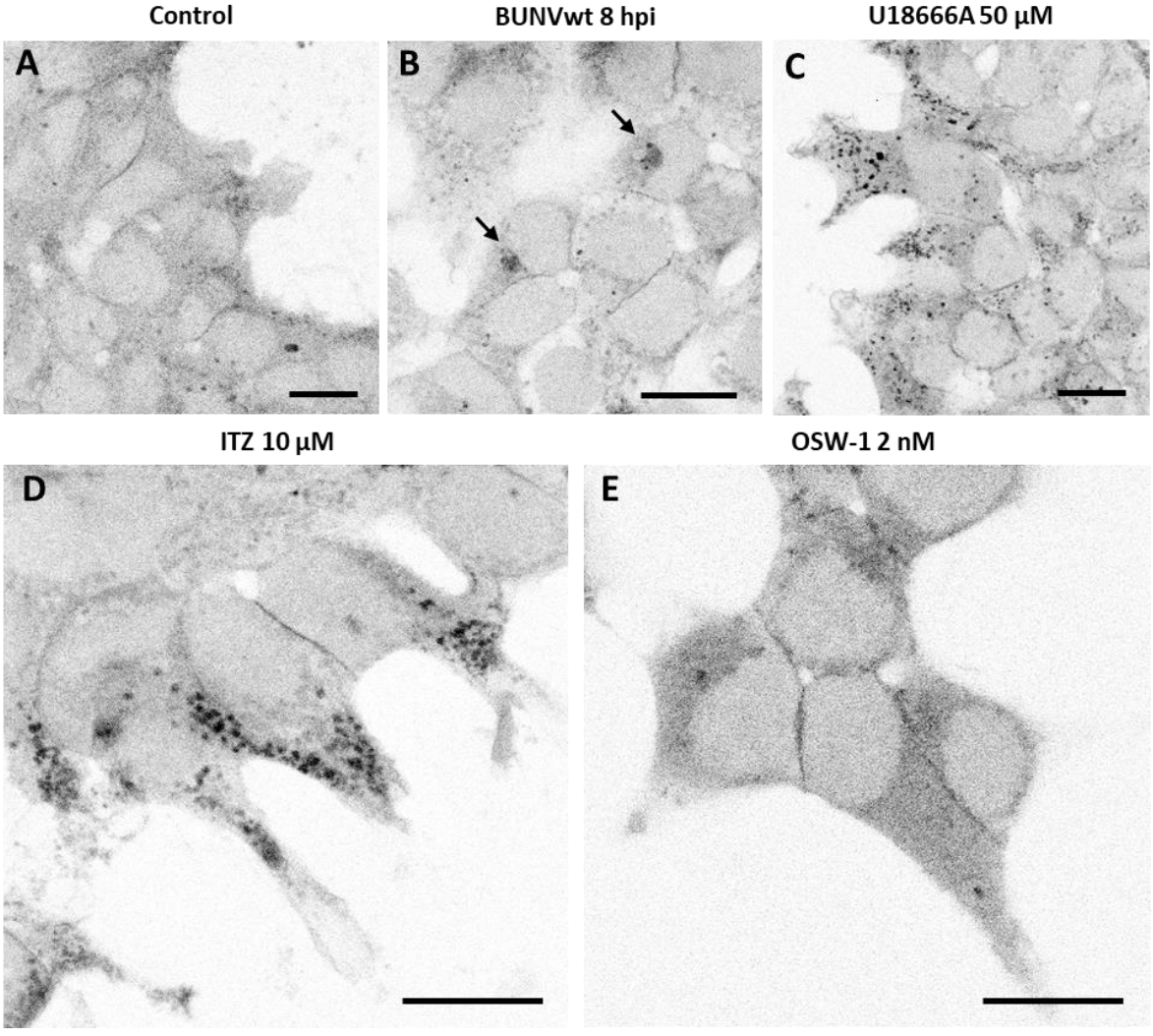


Figura 34. Efecto de la inhibición de OSBP con las drogas ITZ y OSW-1 sobre la localización de colesterol en células 293T. *Imágenes de microscopía de fluorescencia en las que se marcó el colesterol intracelular mediante marcaje con la sonda filipina III (escala de grises). (A) Células control no infectadas y sin tratar; (B) células infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi; (C) células tratadas 8 h con U18666A 50 µM; (D) células tratadas 8 h con ITZ 10 µM; (E) células tratadas 8 h con OSW-1 2 nM. Barras de escala: 10 µm.*

c. Efecto sobre el aparato de Golgi y la localización de OSBP

También se estudió la localización de la proteína OSBP tras el tratamiento con ITZ y OSW-1. Para ello se transfectaron células BHK21 con el plásmido pcDNA-OSBP-GFP, que contenía la proteína humana OSBP fusionada en su extremo N-terminal con la proteína verde fluorescente, GFP. Se decidió cambiar la línea celular y utilizar células BHK21 porque por su morfología y volumen de citoplasma permitían una mejor visualización del interior celular mediante microscopía óptica de fluorescencia, además 293T y BHK21 comparten la característica de que, durante la infección del BUNV, el aparato de Golgi permanece compacto y no se disgrega. A las 48 horas post-transfección, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco que contenía itraconazol 10 µM u OSW-1 2 nM y se incubaron las células en presencia de estás drogas durante 8 horas. Pasado ese tiempo, se fijaron las muestras y se procesaron para MF utilizando un anticuerpo anti-gigantina y DAPI para marcar el aparto de Golgi y los núcleos celulares, respectivamente.

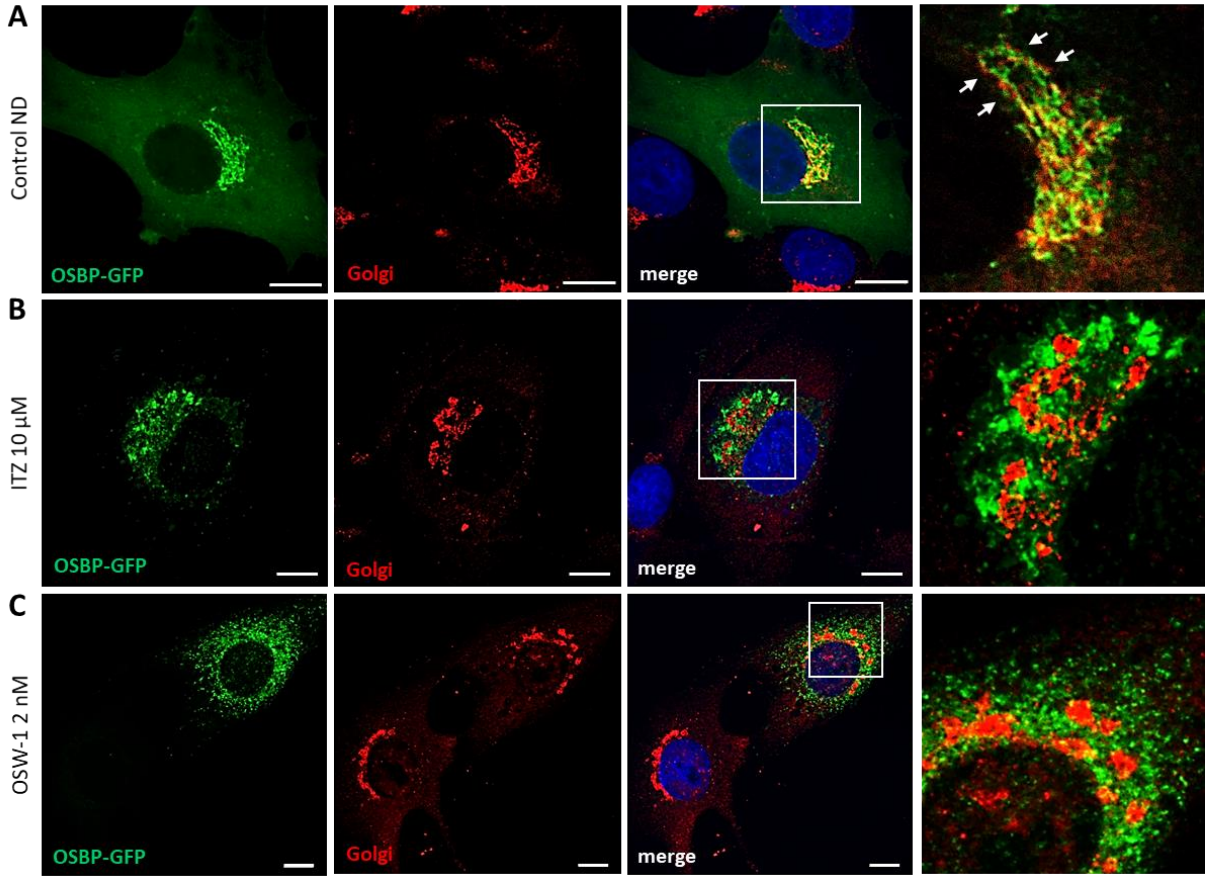


Figura 35. Efecto de la inhibición con las drogas ITZ y OSW-1 sobre el aparato de Golgi y la localización de OSBP. *Se transfectaron células BHK21 con un plásmido que contenía una construcción de la proteína OSBP humana fusionada con la proteína verde fluorescente, GFP. A las 48 h post-transfección, se añadieron al medio de cultivo las drogas itraconazol (ITZ) 10 µM u OSW-1 2 nM y se incubaron las células durante 10 h. Se procesaron las muestras para microscopía confocal marcando el aparato de Golgi con un anticuerpo primario anti-gigantina (rojo) y el núcleo con DAPI (azul). Se muestra el resultado de la proyección ortogonal de secciones de microscopía confocal de células control sin tratar (A), células tratadas con ITZ 10 µM (B) y células tratadas con OSW-1 2 nM (C). Las imágenes de la columna de la derecha son zooms de la zona correspondiente al aparato de Golgi. Barras: 10 µm.*

En células BHK21 control, OSBP presentaba una localización citosólica y con señal acumulada en el aparato de Golgi. Las señales de OSBP y gigantina se solapaban en varios puntos o se disponían paralelamente en las regiones en las que no coincidía la señal, indicando que estaban contenidas en el mismo compartimento celular, el aparato de Golgi (flechas blancas en la imagen derecha de la Figura 35A). Este resultado es coherente con lo ubicación descrita previamente para las dos proteínas: la gigantina es un marcador de la región cis-media Golgi mientras que OSBP se acumula en mayor medida en la región trans-Golgi. En el caso de las células tratadas con itraconazol y OSW-1, el sistema de cisterna del Golgi aparecía engrosado, dilatado y menos compacto que en el control sin tratar. Además, en ambos casos no se observó solapamiento de la señal de gigantina y OSBP, indicando un cambio en la localización de OSBP. Para el tratamiento con itraconazol (Figura 35B), la señal de OSBP continuaba localizada alrededor del aparato de Golgi, pero sin colocalizar con gigantina. Sin embargo, cuando las células se trataron con OSW-1, la señal de OSBP dejó de estar confinada en el aparato de Golgi y pasó a tener un patrón de distribución citosólico (Figura 35C).

d. Efecto de la inhibición de OSBP sobre la ultraestructura (MET)

Por último, mediante microscopía electrónica se llevó a cabo un estudio de la ultraestructura de células 293T control e infectadas con el virus BUNV (MOI: 1 PFU/célula, y 8 hpi) en ausencia o en presencia de itraconazol 10 μM u OSW-1 2 nM. Centrando la atención sobre la región del aparato de Golgi, puesto que previamente se había visto que OSBP se localizaba predominantemente en este orgánulo durante la infección y, a la vez, la factoría viral del BUNV se establece a partir de las membranas del Golgi.

Se observó que las células 293T control poseían un aparato de Golgi grande, en el que se distinguía con claridad el apilamiento de los diferentes grupos de cisternas aplanadas que forman este orgánulo (Figura 36A). En células infectadas sin tratar, se observó una gran cantidad de orgánulos de replicación (ORs), esférulas virales y virus intracelulares (Figura 36B). Tanto el tratamiento con itraconazol como con OSW-1 bloquearon la morfogénesis de las factorías virales, y no se pudieron encontraron esférulas virales asociadas a membranas del Golgi ni virus intracelulares en células tratadas. No obstante, el efecto sobre el aparato de Golgi tras el tratamiento con estos compuestos fue diferente. Mientras que las células tratadas con OSW-1 presentaban una organización similar a las células sin tratar y no parecía estar alterada la orientación ni la ultraestructura de las membranas del Golgi (Figura 36G-I), el tratamiento con itraconazol producía una desestructuración o desmantelamiento de las membranas del Golgi, que se volvieron difusas y dejaron de distinguirse las cisternas (Figura 36E-F).

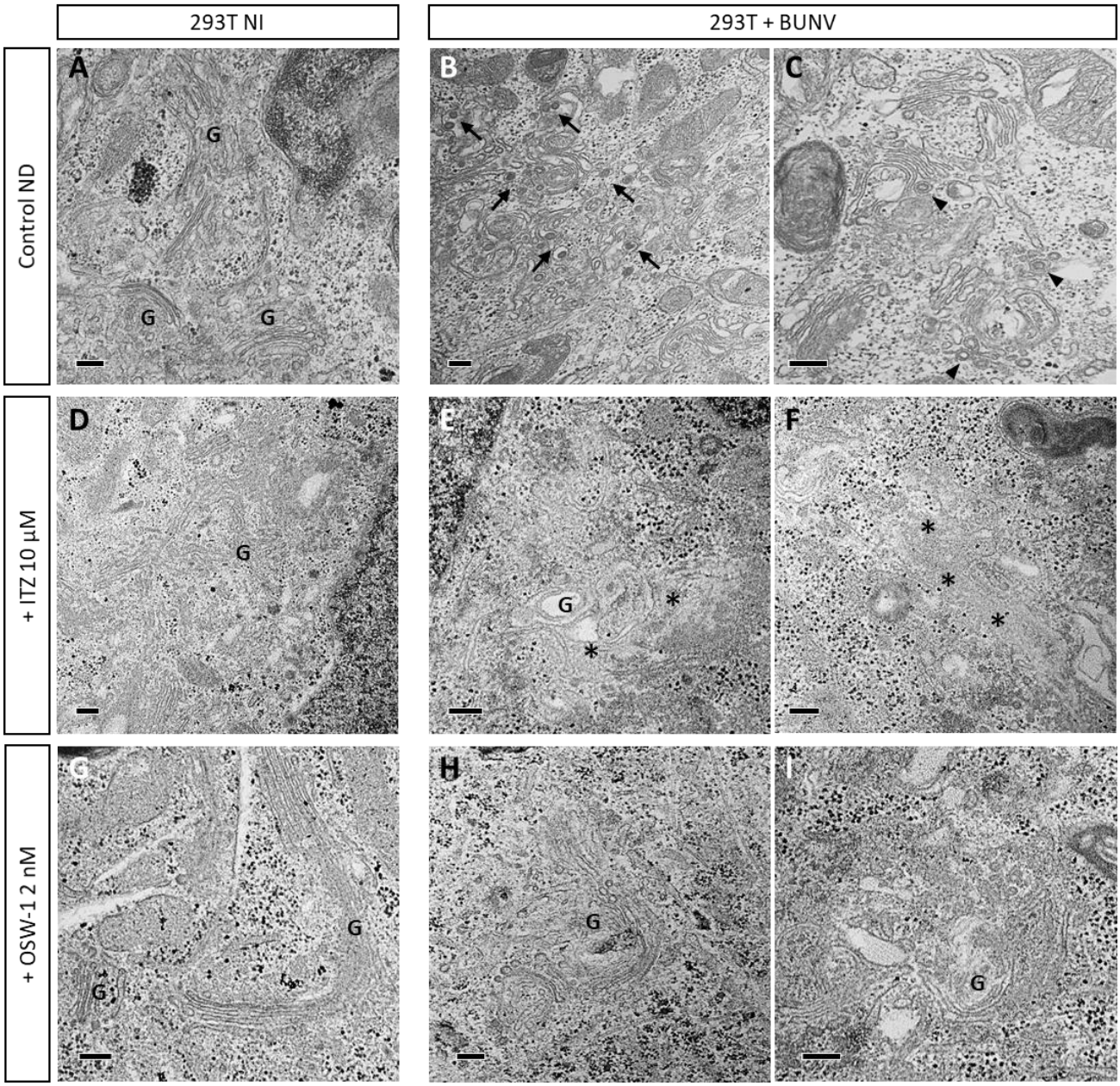


Figura 36. Microscopía electrónica de células 293T infectadas por el BUNV en presencia o ausencia de ITZ y OSW-1. *Las células control (NI) o infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula se trataron con itraconazol 10 µM u OSW-1 2 nM según se indica. A las 8hpi, se recogieron las células, se incluyeron en resina epoxi y se obtuvieron secciones ultrafinas para su visualización por MET. NI, células no infectadas; ND, células sin no tratadas ('no drug'); G, aparato de Golgi; flechas negras, virus intracelulares; puntas de flecha negras, esférulas virales o ROs. *, membranas difusas procedentes del Golgi. Barras de escala: 200 nm.*

3.2.6. Efecto del silenciamiento de OSBP mediante siRNAs en la infección

Una vez descrito el efecto de la inhibición farmacológica de OSBP sobre la infección del BUNV, se estudió el efecto del silenciamiento específico de OSBP a nivel de transcrito primario mediante siRNAs.

Para conseguir el silenciamiento, se transfectaron las células 293T con una mezcla de tres dupletes siRNAs de 27 mer dirigidos específicamente contra tres regiones del mRNA

de OSBP (siOSBP, OriGene®). Como control negativo de silenciamiento, se transfectaron las células con un duplete de RNA control universal *scrambled* (siSCR). Se monitorizó la eficiencia del proceso de silenciamiento a nivel de proteína a las 72 horas post-transfección (hpt) mediante *western blot* con un anticuerpo específico anti-hOSBP. Se consiguió un porcentaje de silenciamiento elevado del 90% a nivel de proteína (Figura 37A).

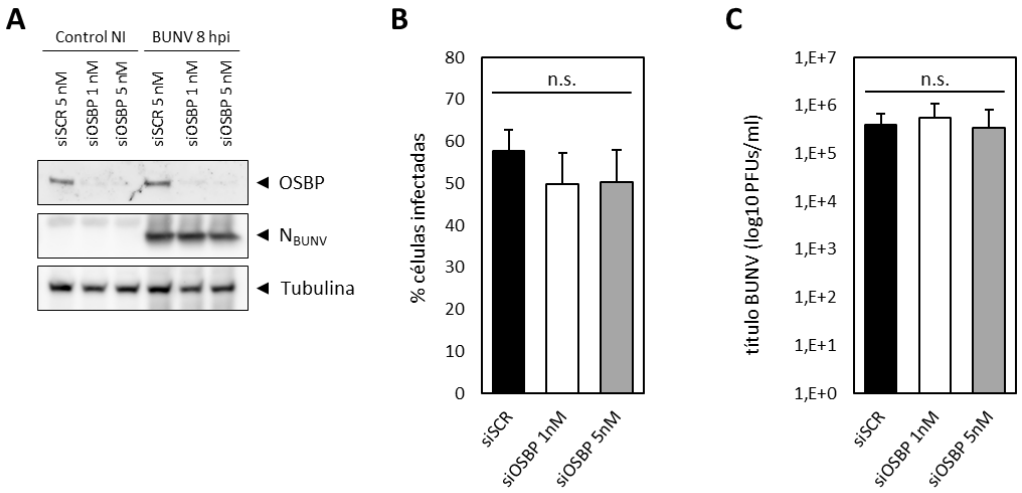


***Figura 37. Efecto del silenciamiento de OSBP en la infección del BUNV**. Células 293T transfectadas con una mezcla de tres dupletes siRNA de 27 mer específicos dirigidos contra el mRNA de OSBP (siOSBP) o con un siRNA control SCRAMBLE (siSCR). Para estudiar el efecto del silenciamiento en la infección, a las 72 hpt, las células se infectaron con el BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. (A) Se estudiaron las células transfectadas y/o infectadas (según se indica) mediante western blot con un anticuerpo anti-N contra la proteína de la nucleocápside de BUNV, y se evaluó el rendimiento del silenciamiento a nivel de proteína a las 72 hpt con un anticuerpo primario anti-hOSBP específico. (B) Se cuantificó el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia con un anticuerpo anti-N para marcar las células infectadas y DAPI para marcar los núcleos y contabilizar el número total de células por campo. Se estudiaron 30 campos por condición procedentes de tres experimentos independientes. (C) Se cuantificó el título viral extracelular mediante ensayo de placas de lisis (n = 3). Las barras de error en B y C representan la desviación estándar.*

A continuación, las células 293T transfectadas con siOSBP 72 h se infectaron con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Se estudió la expresión de proteínas virales mediante *western blot* con un anticuerpo anti-N que reconoce la nucleoproteína del BUNV (Figura 37A), el porcentaje de células infectadas mediante inmunofluorescencia y microscopía óptica confocal con un anticuerpo anti-Gc (Figura 37B), y se cuantificó el título viral del medio extracelular mediante ensayo de placa (Figura 37C).

Curiosamente, a pesar de los resultados anteriores en los que la inhibición de OSBP con itraconazol y OSW-1 tuvieron efecto antiviral contra el BUNV, no se observaron diferencias significativas al comparar las células 293T control transfectadas con el siSCR control con las células transfectadas con el siOSBP, ni en el porcentaje de infección, ni en la expresión de proteínas virales, ni en el título viral obtenidos a un tiempo de infección de 8 hpi. Este hecho implicaría que exclusivamente el bloqueo de la proteína OSBP no sería suficiente para inhibir el ciclo de replicación viral del BUNV.

4. Papel de la dinámica del *network* mitocondrial en la infección por BUNV

La comprensión de la dinámica mitocondrial durante las infecciones virales representa un campo de estudio muy interesante para el desarrollo de antivirales de amplio espectro ya que, además de ser los orgánulos encargados de producir la mayor parte de la energía química celular, las mitocondrias están implicadas en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patológicos.

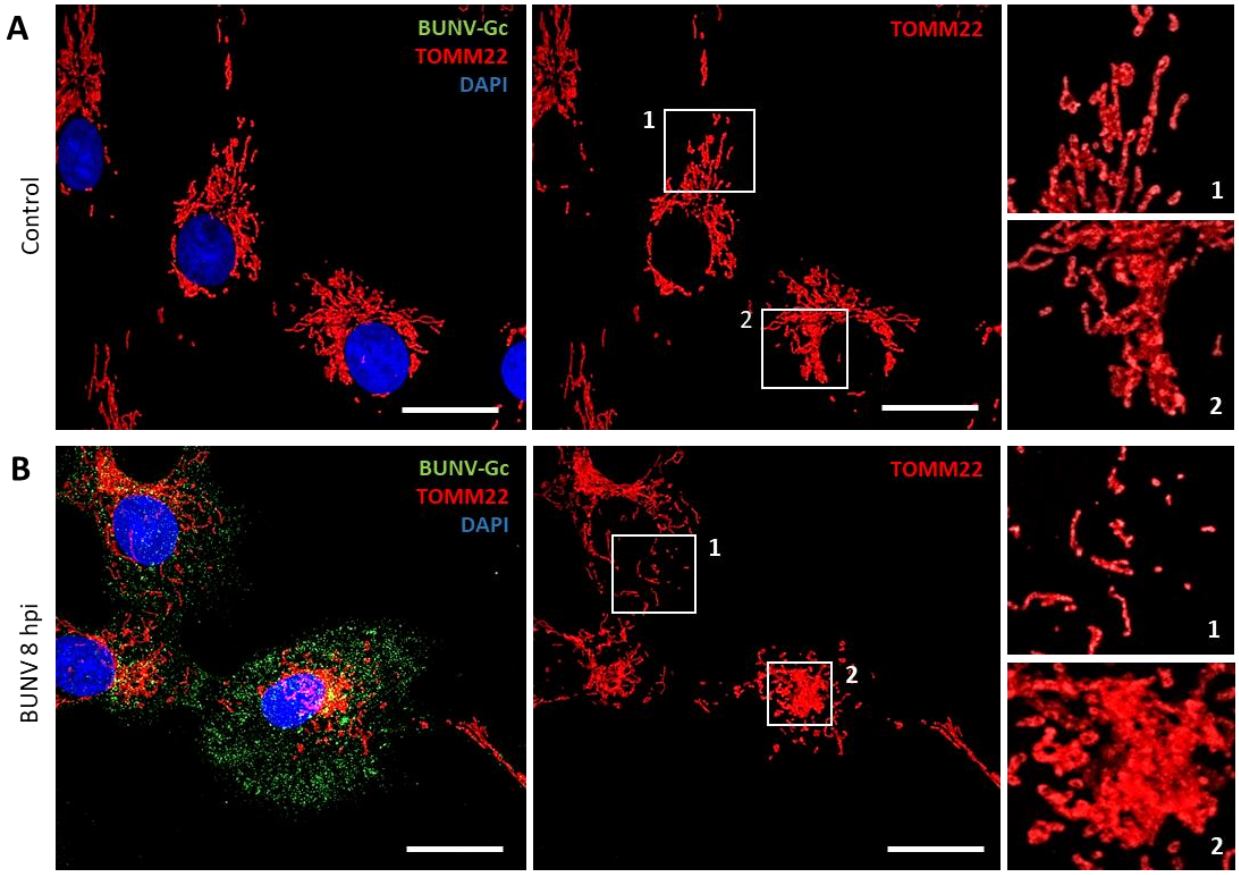


Figura 38. Microscopía confocal del network mitocondrial en células Vero control e infectadas. *Se infectaron células Vero con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. A las 8 hpi se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia. El network mitocondrial se marcó con un anticuerpo policlonal anti-TOMM22 y un anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 594 (rojo), las factorías virales se marcaron con un anticuerpo primario monoclonal anti-Gc y un anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 488 (verde), y los núcleos con DAPI (azul). En las imágenes de la izquierda y centro se muestra la vista general del network mitocondrial global de células control (A) e infectadas (B). A la derecha se muestran zooms de las mitocondrias localizadas en las zonas periférica (1) y yuxtanuclear (2). Barras de escala: 25 µm.*

4.1. Estudio de la alteración estructural del network mitocondrial durante la infección por BUNV

4.1.1. Efecto de la infección del virus BUNV sobre la arquitectura del network mitocondrial

Para caracterizar los cambios en el *network* mitocondrial global durante la infección por el BUNV, se infectaron células Vero a una MOI de 1 PFU/célula durante 8 horas y se procesaron para inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. Se utilizó un anticuerpo

contra la proteína viral Gc para marcar las factorías virales y un anticuerpo policlonal anti-TOMM22 para visualizar el contorno del *network* mitocondrial. La proteína TOMM22 es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial, que forma parte de los complejos de importación de proteínas desde el citosol hasta el interior de las mitocondrias. TOMM22 se utiliza comúnmente como marcador mitocondrial en células de mamífero. Además, previamente habíamos comprobado que los niveles de esta proteína se mantenían constantes durante la infección.

En células Vero no infectadas, se puede observar un *network* formado por mitocondrias alargadas que se extienden desde los bordes del núcleo hasta zonas más periféricas de la célula de forma más o menos homogénea (Figura 38A). Sin embargo, en las células infectadas por el BUNV las mitocondrias son reclutadas y se agregan de forma masiva en una zona yuxtanuclear, coincidiendo con las factorías virales que presentan señal de Gc. La distribución de mitocondrias en el citoplasma es más heterogénea en células infectadas, el gran agregado mitocondrial en torno a las factorías virales contrasta con la ausencia o la presencia de muy pocas mitocondrias de pequeño tamaño en las regiones periféricas de la célula (Figura 38B).

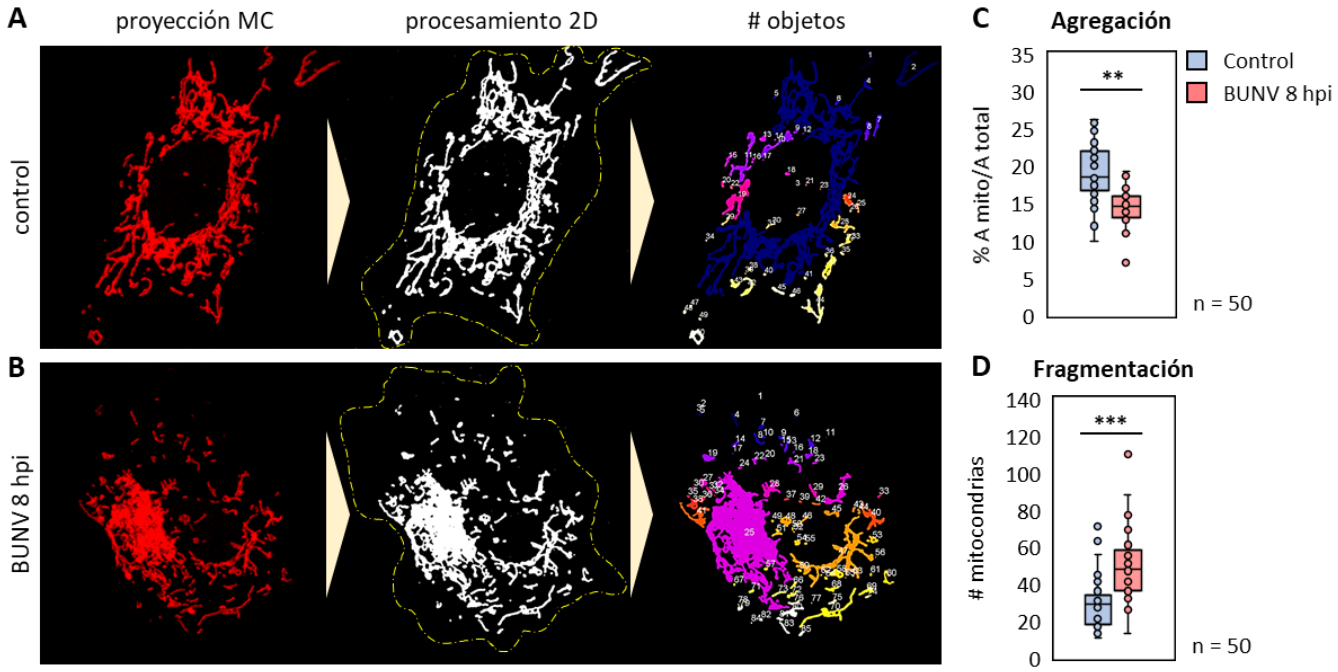


Figura 39. Cuantificación de la agregación y fragmentación network mitocondrial en células infectadas. *A partir de la proyección ortogonal de secciones ópticas de microscopía confocal de células control e infectadas (imágenes de la izquierda en A y B) se procesó la señal fluorescente correspondiente al network mitocondrial con el programa ImageJ®: se ajustó manualmente el threshold, se convirtió la imagen a 8 bits y se redujo el ruido con los filtros mean y sharpen (imágenes centrales). Se midió el área celular (delimitada por la línea discontinua en la imagen) y el área ocupada por el network mitocondrial. Se cuantificó el número de objetos (mitocondrias) con la herramienta de análisis 3D Objects Counter (imágenes de la derecha). Se representó el estado de agregación mitocondrial como porcentaje del área celular ocupado por la huella mitocondrial (C). Se representó el estado de fragmentación del network como número de mitocondrias o redes mitocondriales independientes por célula (D). Se estudiaron 50 células por condición procedentes de tres experimentos independientes. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. ***, p-valor < 0,001; **, p-valor < 0,01. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Para cuantificar las modificaciones observadas, se procesaron las imágenes obtenidas por secciones confocales con el software ImageJ® para obtener una única imagen plana de 8 bits. Se midió el área celular total, el área ocupada por la huella del *network* mitocondrial y el número de mitocondrias con la herramienta de análisis *3D counter* (Figura 39A-B). Se calcularon dos indicadores: el porcentaje del área celular ocupado por la huella del *network* mitocondrial como medida del estado de agregación (Figura 39C), y el número de mitocondrias o redes mitocondriales independientes como medida del estado de fragmentación (Figura 39D). El resultado mostró una diferencia significativa en ambos indicadores al comparar células control con células infectadas. Se observó una disminución en el porcentaje del área celular ocupado por la huella mitocondrial durante la infección, lo que evidencia que las mitocondrias se encuentran agregadas. Además, el número de mitocondrias individuales es mayor en células infectadas, indicando una mayor fragmentación del *network* mitocondrial. Estos hechos se evidencian comparando las imágenes de la derecha en los paneles A y B. En la célula control se puede observar una red mitocondrial principal muy ramificada e interconectada (en color azul), redes mitocondriales individuales más pequeñas y muy pocas mitocondrias aisladas; mientras que en la célula infectada se observa un gran agregado mitocondrial (en color rosa) en el que no se distinguen las conexiones entre mitocondrias y el número de mitocondrias individuales es mayor.

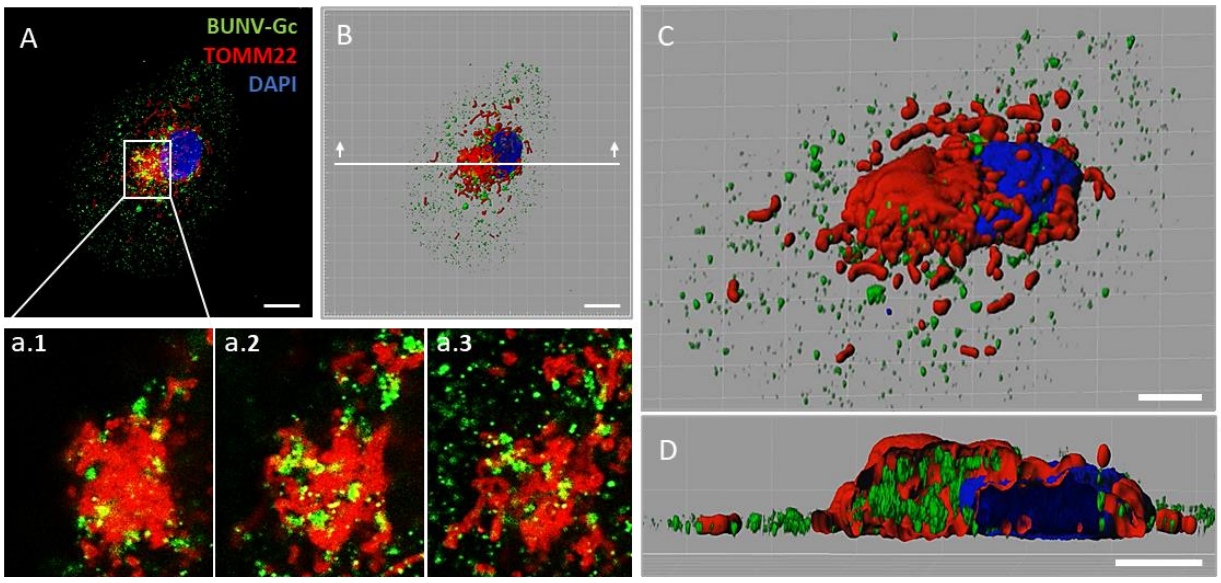


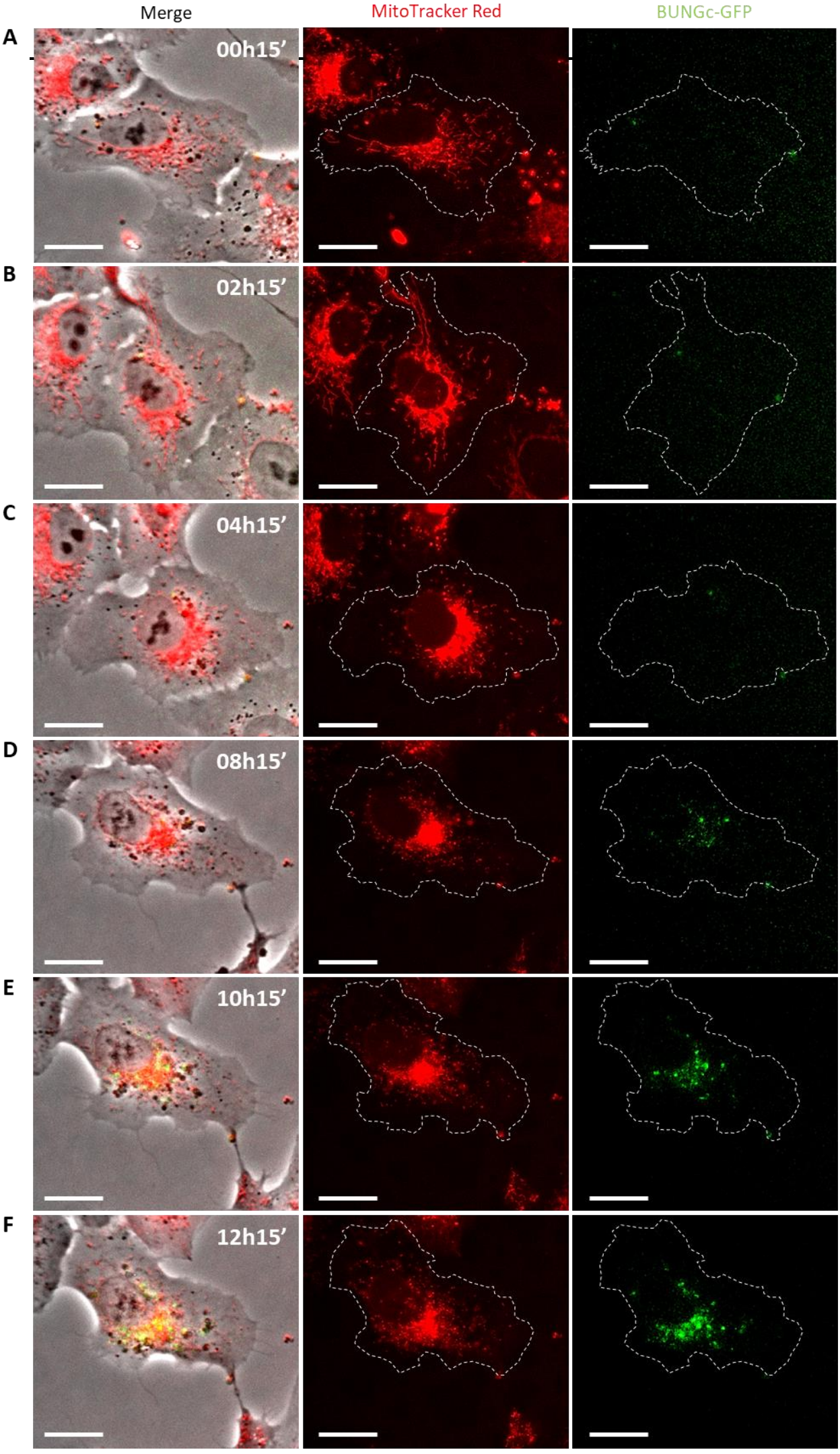
Figura 40. Reconstrucción tridimensional del network mitocondrial durante la infección por BUNV en células Vero. *(A) Proyección ortogonal de secciones obtenidas mediante microscopía confocal de una célula Vero infectada con el virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Se ha marcado el network mitocondrial con un anticuerpo anti-TOMM22 (rojo), la glicoproteína viral Gc con un anticuerpo anti-Gc (verde), y el núcleo con DAPI (azul). En la parte inferior se muestran zooms de secciones de planos confocales individuales de las zonas apical (a1), media (a2) y basal (a3) de la célula. (B, C) Reconstrucción 3D a partir de las proyecciones obtenidas mediante microscopía confocal con el software Imaris®. (D) Sección perpendicular a la base de la célula que muestra el interior del agregado mitocondrial a la altura y dirección de corte indicadas en B. Barras: 10 µm en A y B, y 5 µm en C y D.*

Por último, para entender espacialmente y de forma más precisa la disposición del *network* mitocondrial con respecto a las factorías, se realizó una reconstrucción tridimensional a partir de secciones ópticas solapantes obtenidas mediante microscopía confocal. En primer lugar, se estudiaron los planos confocales independientes para comprobar que las señales de Gc y TOMM22 no colocalizaban (Figura 40a1-a3), ya que en la proyección ortogonal sí parecía haber solapamiento de señal. A continuación, utilizando el software Imaris® se procedió a realizar la reconstrucción 3D del *network*. Los paneles B y C de la Figura 40 muestran la reconstrucción obtenida en distintas perspectivas. Las células Vero, en condiciones de cultivo estándar, tienen una morfología plana. No obstante, en células infectadas, el agregado mitocondrial alrededor de las factorías virales produce un incremento de volumen y abultamiento que supera la altura del núcleo celular. Además, al seccionar la célula perpendicularmente a la base se puede observar que las factorías virales quedan rodeadas en el interior del agregado mitocondrial dispuesto a modo de caparazón (Figura 40D).

4.1.2. Dinámica del network mitocondrial durante la infección

Para estudiar temporalmente los eventos de modificación del *network* mitocondrial que conducen a la agregación de mitocondrias en torno a la factoría viral, se realizó un estudio por video-microscopía en células vivas. Para ello se infectaron células Vero con el virus rBUNGc-eGFP, que contiene la proteína viral Gc unida a eGFP (Shi *et al.,* 2010). Tras una hora de adsorción viral, se marcó el network mitocondrial con la sonda MitoTraker™ Red FM (Molecular Probes, Invitrogen) y las células se llevaron a un microscopio de fluorescencia con sistema de incubación, obteniendo imágenes cada 15 min.

El resultado muestra que las células partían de un *network* con mitocondrias elongadas e interconectadas (Figura 41A-B). A un tiempo temprano de infección (4 hpi), ya se observa fragmentación del *network* mitocondrial y cierta agregación en una región yuxtanuclear compatible con la zona del Golgi (Figura 41C). A las 8 hpi, aparece una señal incipiente de Gc y se aprecia una mayor agregación mitocondrial (Figura 41D). A partir de ese momento la infección progresa, acumulándose la señal de Gc rodeada del agregado mitocondrial (Figura 41E-F). Este estudio *in vivo* confirmó que los cambios en el *network* mitocondrial se inician en una etapa temprana de la infección, anterior a la expresión de la proteína Gc y a la observación de efecto citopático.


Merge
MitoTracker Red
BUNGc-GFP
A
00h15’
B
02h15’
C
04h15’
D
08h15’
E
10h15’
F
12h15’

► ***Figura 41. Estudio in vivo de la dinámica del network mitocondrial durante la infección por el BUNV en células Vero.*** *Las células se infectaron con el virus rBUNGc-eGFP (5 PFU/célula) y se marcó el network mitocondrial con la sonda MitoTrackerTM (rojo). Barras de escala: 10 µm.*

4.1.3. Estudio de las crestas mitocondriales durante la infección

Para estudiar el cambio morfológico en las mitocondrias a nivel de ultraestructura, se infectaron células Vero con BUNV a 1 PFU/célula durante 8 horas y se procesaron para su estudio por TEM. Al comparar la estructura interna de las mitocondrias, las células control presentaban mitocondrias con crestas finas y paralelas, homogéneamente distribuidas y orientadas en base a la posición del orgánulo, es decir, perpendiculares a la membrana externa (Figura 42A-B). Sin embargo, durante la infección se puede observar que el espacio intermembrana es más denso a los electrones, se pierde la periodicidad entre las crestas mitocondriales, que se encontraban desorganizadas, engrosadas y distribuidas heterogéneamente, pudiendo observarse zonas huecas dentro de la matriz mitocondrial (Figura 42C-D).

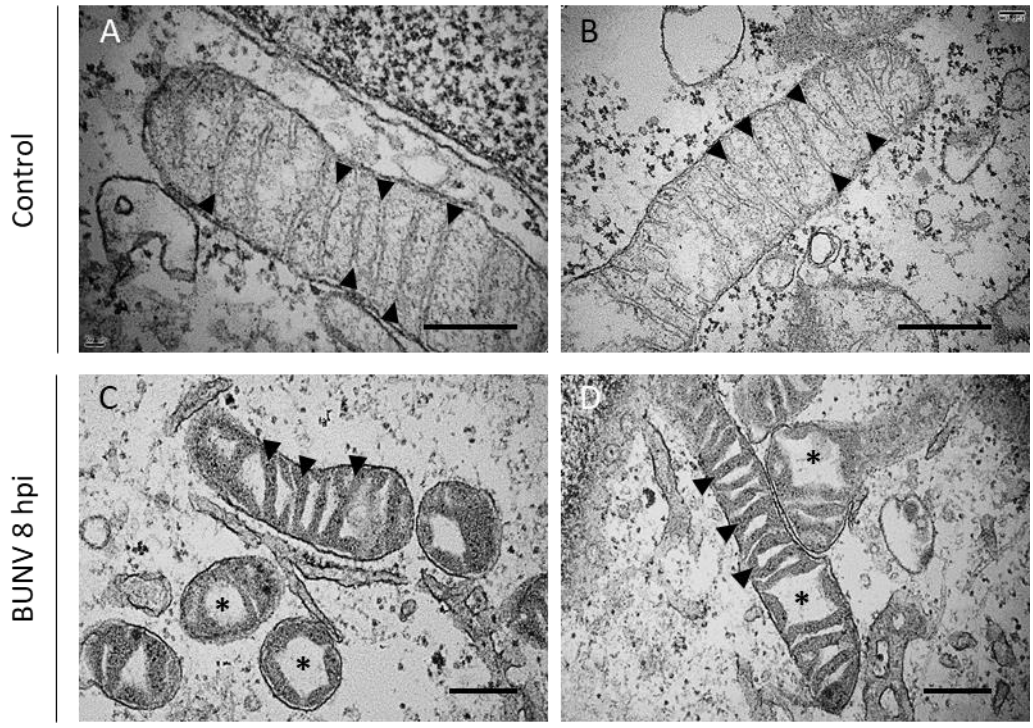


Figura 42. Alteraciones estructurales en las mitocondrias durante la infección por el BUNV en células Vero. *Imágenes obtenidas mediante TEM de mitocondrias de células Vero control (A, B) o infectadas con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi (C, D). Durante la infección se puede observar que el espacio intermembrana mitocondrial es más denso a los electrones. Además, aparecen defectos en las crestas, que se encuentran engrosadas y pierden su periodicidad característica. Las flechas marcan las crestas mitocondriales, y los asteriscos (*) las zonas huecas en la matriz mitocondrial durante la infección. Barras de escala: 200 nm.*

4.1.4. Estudio del network mitocondrial tras la infección por el virus recombinante rBUN-delNSs

En un trabajo previo del laboratorio, la proteína viral NSs se había localizado en el interior de las mitocondrias durante la infección de BUNV mediante técnicas de inmunomarcaje y microscopía (García-Serradilla y Risco, 2021). Por este motivo, se decidió estudiar mediante microscopía confocal la estructura del *network* mitocondrial tras la infección con el virus recombinante rBUN-delNSs (virus mutante por deleción de la proteína NSs), para determinar si los cambios observados podrían ser atribuibles a la presencia de esta proteína.

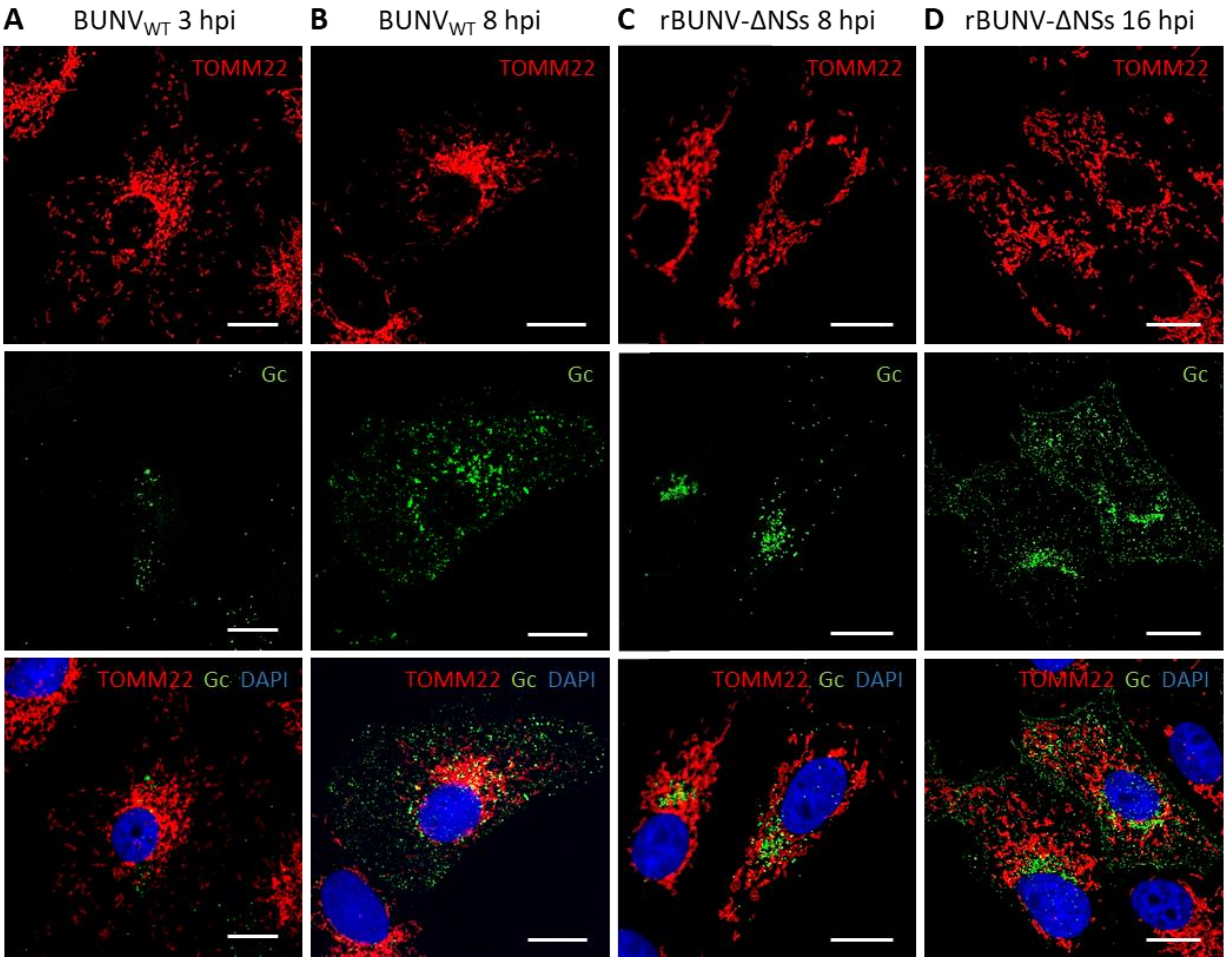


Figura 43. Microscopía confocal del network mitocondrial en células Vero control e infectadas con el virus rBUN-ΔNSs, mutante de deleción de la proteína no estructural NSs. *Se infectaron células Vero con el virus BUNV wild-type a una MOI de 1 PFU/célula y se recogieron a dos tiempos post-infección: un tiempo temprano de 3 hpi (A) y un tiempo más avanzado de 8 hpi (B). También se infectaron células Vero con el virus rBUN-ΔNSs a una MOI de 5 PFU/célula y dos tiempos de infección de 8 y 16 hpi. En este caso, los tiempos son más prolongados debido a que la dinámica de infección de este virus recombinante es más lenta al no presentar el gen NSs. Las células se fijaron y procesaron para microscopía de fluorescencia marcando el network mitocondrial con un anticuerpo anti-TOMM22 (rojo), las factorías virales con un anticuerpo anti-Gc (verde) y el núcleo con DAPI (azul). Se muestran imágenes correspondientes a la proyección ortogonal de secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal. Barras de escala: 15 µm.*

Debido a la ausencia de la proteína NSs, el virus mutante se replica en cultivo más lentamente, por lo que se decidieron estudiar dos tiempos de infección correspondientes a una infección más temprana en la que se acumula la señal de Gc en el Golgi (8 hpi), y una infección más avanzada con señal de Gc tanto en el interior de las factorías virales como dispersa por el citoplasma y en la membrana plasmática (16 hpi). Además, cabe apuntar que durante la infección con rBUN-delNSs la fragmentación del aparato de Golgi y la formación de *mini factorías* no es tan evidente en células Vero.

El resultado de este experimento mostró que la estructura global del *network* mitocondrial no se alteraba durante la infección por el virus mutante rBUNV-delNSs, presentando mitocondrias elongadas e interconectadas que se extendían desde la zona perinuclear hasta las zonas periféricas de la célula, sin producirse un reclutamiento en torno al Golgi o factoría viral (Figura 43); mientras que en las células infectadas con el virus *wild-type,* el *network* mitocondrial se fragmentaba desde tiempos tempranos de infección (3 hpi) y se agregaba en una zona yuxtanuclear como se había descrito previamente.

4.2. Estudio de la alteración funcional del network mitocondrial durante la infección por el BUNV

4.2.1. Bioenergética

El cambio observado tanto en la morfología global del *network* mitocondrial como a nivel de la ultraestructura de las crestas sugería de una posible alteración funcional en la cadena de transporte de electrones. La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Esta síntesis de ATP está acoplada a la reducción de oxígeno molecular (O_2) que actúa como último aceptor en la cadena de transporte de electrones (CTE). La reducción de O_2 en el complejo IV de la CTE es aceptada generalmente como el principal punto de consumo de oxígeno en la célula. Para estudiar la función mitocondrial en términos energéticos se determinó el índice de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*) en células Vero control e infectadas (a 1 PFU/célula y 8 hpi) utilizando el kit ensayo MitoStress® y un analizador SeaHorse XFp de Agilent, que posee una sonda sensible a oxígeno para medir el OCR.

Se monitorizó el OCR en respuesta a ciertos moduladores de la actividad mitocondrial como se describe en la *sección 2.9.* de Materiales y Métodos (Figura 44). Las células infectadas por el BUNV presentaron un índice de respiración basal significativamente menor comparado con las células control. Cuando se inyectó oligomicina (1 μM) para inhibir la actividad de la ATPasa, el OCR disminuyó a niveles similares en ambas

muestras. Sin embargo, al añadir FCCP (0,4 µm) para liberar el gradiente de protones, gracias a la formación de poros en la membrana mitocondrial interna, y desacoplar la CTE de la síntesis de ATP, se observó que la capacidad respiratoria máxima se encontraba fuertemente comprometida durante la infección, siendo significativamente menores los parámetros de la producción de ATP asociada a la respiración mitocondrial y de la capacidad de reserva en las células infectadas por el BUNV.

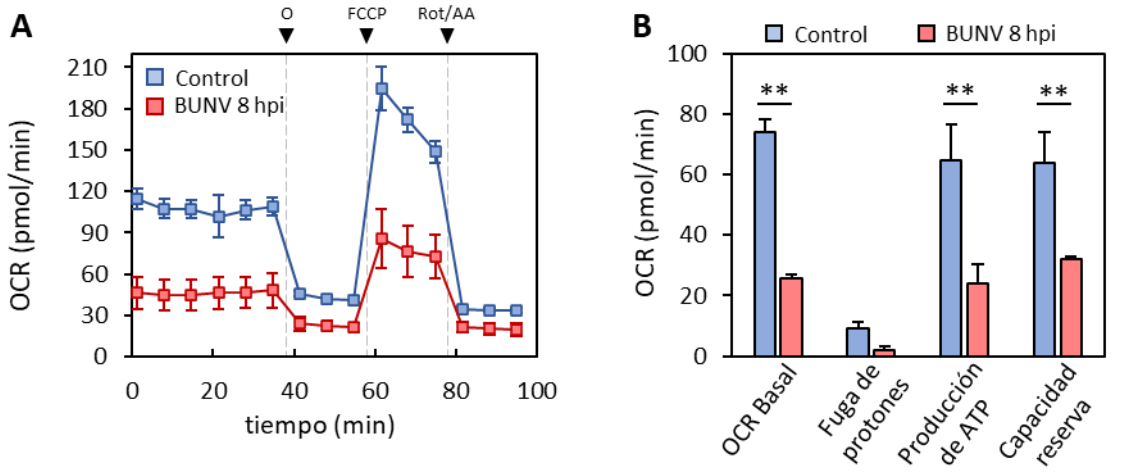


Figura 44. Perfil de respiración mitocondrial en células Vero control e infectadas por el BUNV. *Ensayo de MitoStress® utilizando un analizador Seahorse XFe96 (Agilent). (A) Ejemplo de las curvas de consumo de oxígeno obtenidas en uno de los experimentos. La tasa de consumo de oxígeno (OCR, oxygen consumption rate) se midió a tiempo real después de la adición secuencial de oligomicina (O) que inhibe la ATP sintasa; FCCP, un agente ionóforo; y rotenona/antimicina A (Rot/AA), que inhiben los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, respectivamente. (B) A partir de las curvas de la OCR, se determinaron los parámetros de respiración mitocondrial basal, asociada a la producción de ATP, asociada a la fuga de protones y la capacidad de reserva. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. **, p-valor < 0,01.*

4.2.2. Especies reactivas de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial

La respiración mitocondrial es requerida para mantener el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Gottlieb *et al.,* 2003). Para estudiar cómo el BUNV impactaba sobre el $\Delta\Psi_m$, se infectaron células Vero con el virus recombinante rBUNGc-eGFP a una MOI de 5 PFU/célula. Se decidió emplear el virus con la glicoproteína Gc fluorescente para poder identificar las células infectadas. A las 7 hpi, las células se marcaron con la sonda tetrametilrodamina (TMRM) que es sensible al $\Delta\Psi_m$, y se estudiaron mediante microscopía en condiciones *in vivo* (37ºC, 5% CO_2). Se pudo observar una disminución en la intensidad de la señal de fluorescencia de la TMRM en las células infectadas con señal verde fluorescente. Se cuantificó la fluorescencia media de la sonda TMRM normalizada por la superficie celular, obteniéndose una reducción significativa del $\Delta\Psi_m$ a las 8 hpi (Figura 45A).

Además de tener un papel clave en la generación del ATP celular, las mitocondrias son importantes sitios de producción de especies reactivas de oxígeno (mROS), cuyo estudio

ha ganado importancia en la actualidad por su implicación en eventos de señalización celular (Brillo *et al.,* 2021). Para monitorizar el estado redox mitocondrial, se trataron células Vero control e infectadas con el virus rBUNGc-eGFP (5 PFU/célula, 8 hpi) con mitoSOX®, una sonda fluorescente específica que permite la visualización y localización *in vivo* de las mROS mediante microscopía. El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia reveló que la infección por BUNV aumentaba significativamente la generación de mROS a las 8 hpi (Figura 45B).

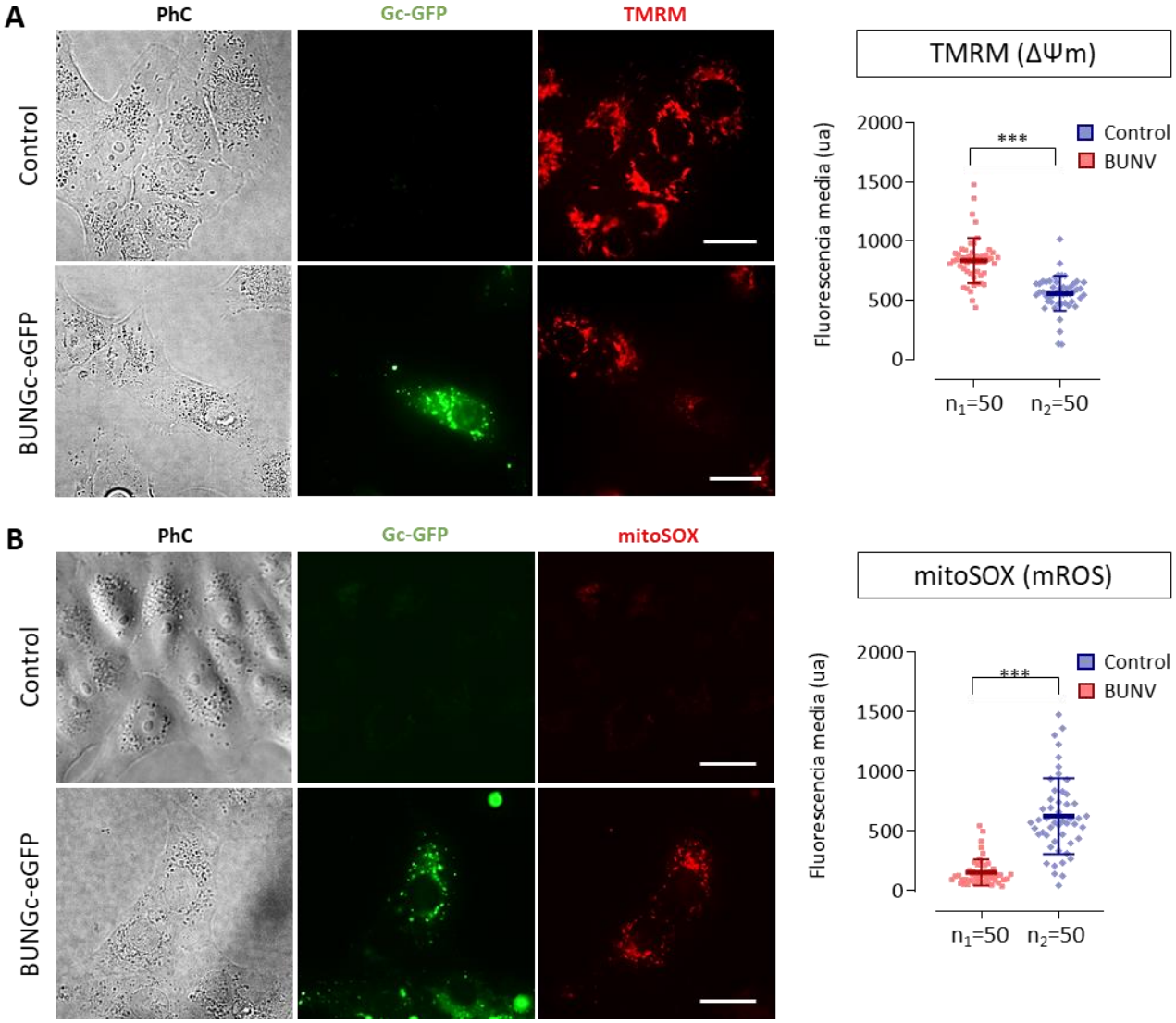


Figura 45. Efecto de la infección por BUNV en el potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) y la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS). *Se estudiaron células Vero control o infectadas con el virus recombinante rBUNGc-eGFP (a una MOI de 5 PFU/célula). A las 8 hpi, se incubaron las células 30 min a 37ºC y oscuridad con TMRM, una sonda mitocondrial sensible al ΔΨm (A); o con mitoSOX®, una sonda utilizada para la localización in situ de mROS (B). A continuación, se llevaron a un microscopio confocal con sistema de incubación, tomando imágenes (contraste de fases y emisión de fluorescencia roja y verde). Se cuantificó la fluorescencia media emitida y se normalizó en función de la superficie celular. El resultado representa la media±SD para tres experimentos independientes, en los que se estudiaron 50 células por muestra. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. ***, p-valor < 0,001. Barras de escala: 20 µm.*

4.2.3. Proliferación y muerte celular

Otra de las funciones fundamentales de las cascadas de señalización mitocondrial es la regulación de los procesos de muerte celular programada y el control de la proliferación celular (Rustin, 2002).

Para estudiar la proliferación celular durante la infección, se hizo uso de un analizador xCELLigence® RTCA (Agilent). Se sembraron células Vero sobre soportes específicos y se monitorizaron hasta que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial o el inicio de la fase estacionaria. Llegado ese punto, se infectaron las células con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y se continuó monitorizando el cultivo celular. Las células infectadas al inicio de la fase estacionaria (Figura 46A) continuaron paralelamente al control hasta las 16 hpi, cuando la impedancia comenzó a decaer debido a que las células infectadas empezaban a morir, perdiendo la adhesión y levantándose de la monocapa. Finalmente, el 100% de la monocapa se había perdido a las 36 hpi. En el caso de las células infectadas en fase de crecimiento exponencial (Figura 46B), desde el inicio de la infección las curvas de proliferación empezaron a separarse, y el crecimiento celular se vio ralentizado llegando incluso a detenerse durante aproximadamente 5 h antes de que empezara a decaer la impedancia. Cabe señalar que el inicio de la muerte celular en las células infectadas en fase exponencial se vio retrasada a las 20 hpi.

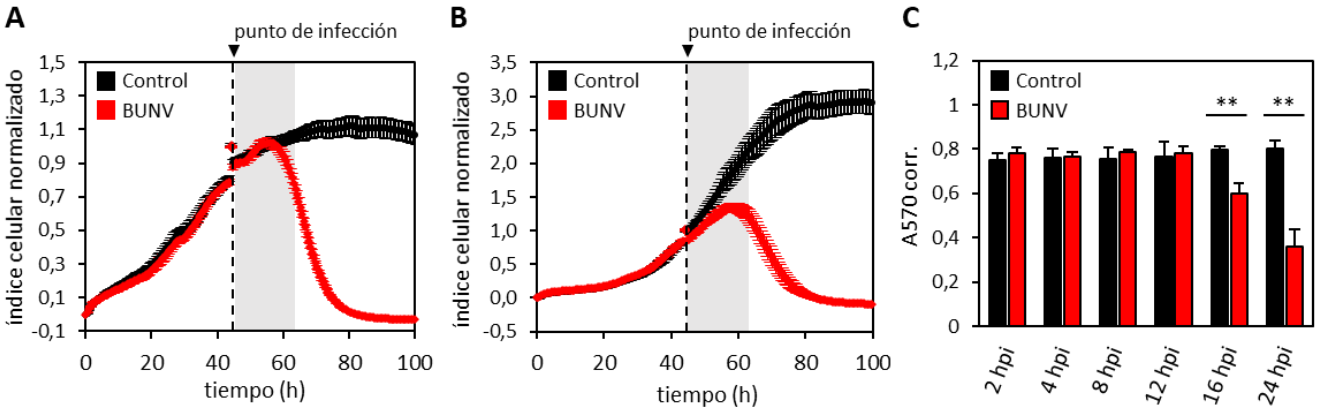


Figura 46. Efecto de la infección por BUNV en la proliferación y muerte celular. *Se sembraron células Vero sobre soportes específicos y se monitorizaron con el equipo xCELLigence® RTCA Analyser (Agilent) que permite analizar a tiempo real el crecimiento y proliferación de las células en cultivo. Cuando se alcanzó el inicio de la fase de crecimiento estacionaria (A) o durante la fase de crecimiento exponencial (B), se infectaron las células Vero con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y se continuó monitorizando el cultivo celular. Con fondo gris se indica el periodo de tiempo previo a que empezara a observarse muerte celular (15 hpi). En paralelo se realizó un ensayo de viabilidad celular (MTT) en células Vero (C), para estudiar la viabilidad celular a tiempos crecientes de infección. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. **, p-valor < 0,01. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

En paralelo al estudio de proliferación con xCELLigence®, se midió la viabilidad de células Vero infectadas en las mismas condiciones y tiempos crecientes post-infección (2, 4, 8, 12, 16 y 24 hpi) mediante un ensayo MTT. Este ensayo es de especial interés porque la

reducción del MTT se debe principalmente a la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, en particular a la enzima succinato deshidrogenasa. De este modo, relaciona directamente la viabilidad celular con la función mitocondrial. El resultado del ensayo de MTT fue compatible con el obtenido en el ensayo de proliferación: a tiempos cortos de infección no se observaron diferencias entre las células control y las infectadas. Fue a partir de las 16 hpi, cuando la viabilidad celular empezó a disminuir, alcanzándose un 50% de células vivas a las 24 hpi (Figura 46C).

4.2.4. Ciclo celular

En los estudios de proliferación se había observado una parada en el crecimiento del cultivo celular tras la infección, pero antes de iniciarse el proceso de muerte celular. Esta observación podría indicar que el BUNV estaba produciendo un arresto del ciclo celular en alguna de sus fases, como sucede durante la infección de otros virus que modifican el ciclo celular para crear un ambiente óptimo para su replicación (Fan *et al.,* 2018).

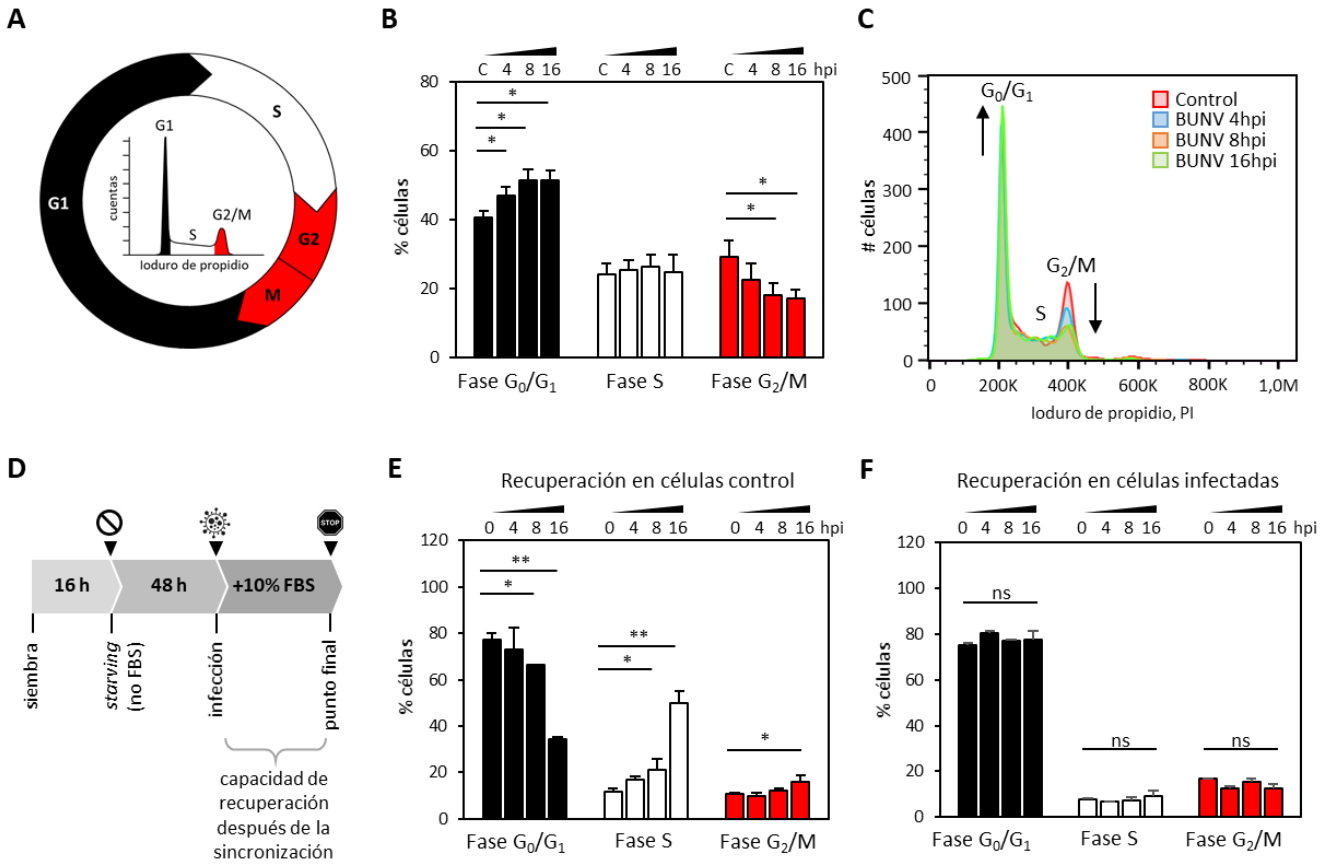


Figura 47. Efecto de la infección por BUNV en el ciclo celular. *(A) Histograma representativo de una población celular control que se obtiene mediante citometría de flujo con marcaje de yoduro de propidio (PI), formado por un pico alto y mayor que corresponde a las fases G0/G1 (dotación cromosómica 2n), una fase de meseta de las células en fase S que están sintetizando DNA, y otro pico menor correspondiente a las células en fase G2 y M (4n). (B, C) Porcentaje de células 293T en cada fase de ciclo celular a tres tiempos post-infección 4, 8 y 16 hpi. En C se muestra un histograma representativo. (D) Efecto de la infección en el ciclo celular de células Vero sincronizadas en fase G0/G1 mediante la incubación en medio sin FBS durante 48 h; después se añadió medio con 10% de FBS y se esperó a la recuperación del ciclo celular (E, células control) o se infectaron en medio con 10% de FBS (F). Se analizó el ciclo celular a distintos tiempos mediante tinción con PI. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes. Análisis de significancia estadística mediante prueba t para muestras independientes. *, p-valor < 0,05. **, p-valor < 0,01. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Para probar si la infección del BUNV era capaz de producir una parada en el ciclo celular, se infectaron células 293T y Vero con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula, se recogieron muestras a tiempos post-infección crecientes (0, 4, 8 y 16 hpi), y se analizaron los cambios en las fases del ciclo celular por citometría de flujo utilizando un marcaje con ioduro de propidio (PI), un compuesto intercalante que se une al DNA. El histograma representativo de una población celular normal está formado por un pico alto y mayor que corresponde a las fases G0 y G1 (con dotación cromosómica 2n), una fase de meseta correspondiente con las células en fase S que están sintetizando DNA, y otro pico menor asociado a las células en fases G2 y M justo previamente a la división celular (con dotación cromosómica 4n) (Figura 47A).

En células 293T infectadas, a medida que aumentaba el tiempo post-infección se producía un incremento significativo en el porcentaje de células en fase G0/G1. Paralelamente, se observó un descenso en el porcentaje de células en fase G2/M (Figura 47B-C). Sin embargo, en células Vero la infección por BUNV aparentemente no afectaba al ciclo celular (resultado no mostrado).

Nuestro protocolo estándar de infección normalmente se realizaba a una confluencia elevada y un porcentaje de FBS bajo en el medio de cultivo, lo que podría estar enmascarando el resultado en el ensayo de ciclo celular. Para intentar esclarecer si la infección por BUNV afectaba al ciclo celular en Vero, se incubaron las células 48 horas en medio DMEM sin FBS para forzar su sincronización en fase G0/G1. A continuación, se infectaron con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y después se añadió medio de cultivo con un 10% de FBS. Se recogieron muestras a tiempos crecientes y se analizaron los cambios en el ciclo celular para estudiar la capacidad de recuperación después de la sincronización. En estas condiciones, se pudo observar que las células control no infectadas volvían a entrar en el ciclo celular, aumentando progresivamente el porcentaje de células en fases S y G2/M hasta 16 horas después de haber añadido el FBS al medio de cultivo (Figura 47E). Por el contrario, la mayoría de las células infectadas con BUNV permanecieron en fase G0/G1 y no se observó un incremento de células en fases S o G2/M (Figura 47F).

4.3. Selección y validación de compuestos que alteran el *network* mitocondrial con potencial antiviral contra BUNV

En este apartado se ha estudiado el efecto tres compuestos en la progresión de la infección del BUNV en células Vero y BHK21: la digoxina, el lanatósido C y Mdivi-1 (Figura 48A). La digoxina y el lanatósido C pertenecen a la familia de medicamentos glucósidos cardíacos, utilizados para tratar la insuficiencia cardíaca y ciertas irregularidades del ritmo cardíaco y

cuyo mecanismo de acción principal es la inhibición de la bomba sodio-potasio-ATPasa de la membrana plasmática. Se seleccionaron estos dos compuestos porque en un estudio previo del laboratorio se había observado que el tratamiento con digoxina tenía un efecto dramático sobre la morfología del *network* mitocondrial, como veremos en profundidad en las siguientes secciones de este trabajo. Por otra parte, Mdivi-1 es una molécula de uso experimental que bloquea la división mitocondrial mediante la inhibición de la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1). A pesar de que no está aprobada para su administración a humanos, se ha descrito que Mdivi-1 podría tener un gran potencial para el tratamiento de cardiopatías y enfermedades neurodegenerativas (Ong *et al.,* 2010; Rappold *et al.,* 2014).

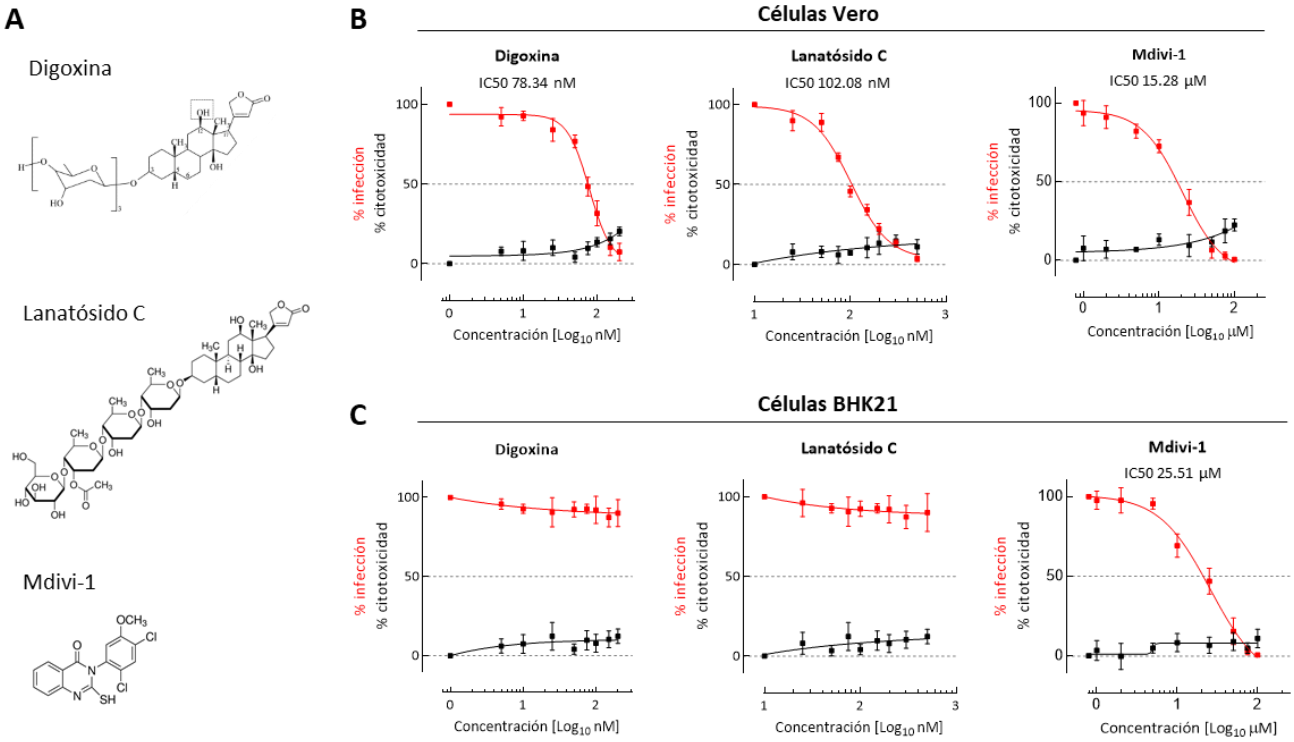


Figura 48. Efecto del tratamiento con digoxina, lanatósido C y Mdivi-1 en la infección por el BUNV en células Vero y BHK21. *(A) Estructura molecular de la digoxina (DIG), el lanatósido C (LANC) y Mdivi-1. (B) Ensayo de citotoxicidad y curva de inhibición de la infección de BUNV por DIG, LANC y Mdivi-1 en células Vero (B) y BHK21 (C). El porcentaje de células infectadas se determinó mediante microscopía de fluorescencia, y la citotoxicidad mediante ensayo de viabilidad basado en MTT. Se muestran los valores de IC50 y CC50 de las drogas debajo de las gráficas. Resultados procedentes de 3 experimentos independientes con al menos dos réplicas cada uno. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.*

Se estudió la progresión de la infección del virus BUNV en presencia de concentraciones crecientes de digoxina, lanatósido C y Mdivi-1, calculando el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia en células Vero (Figura 48B) y BHK21 (Figura 48C). Paralelamente, se testó la citotoxicidad de los tres compuestos en células no infectadas mediante el ensayo de viabilidad basado en MTT. La digoxina, el lanatósido C y Mdivi-1 inhibieron la infección de BUNV en células Vero con valores de IC50 de 78,34 nM, 102,08

nM y 15,28 µM, respectivamente, manteniéndose dentro de un rango de concentración seguro; por lo que la inhibición de la infección no sería atribuible a un efecto citotóxico de las drogas en esta línea celular. Sin embargo, en la línea celular BHK21 los glucósidos cardíacos no tuvieron efecto en la infección del BUNV, aunque sí se consiguió inhibir la infección con Mdivi-1 con una IC50 de 25,51 µM, dentro del rango de concentración segura.

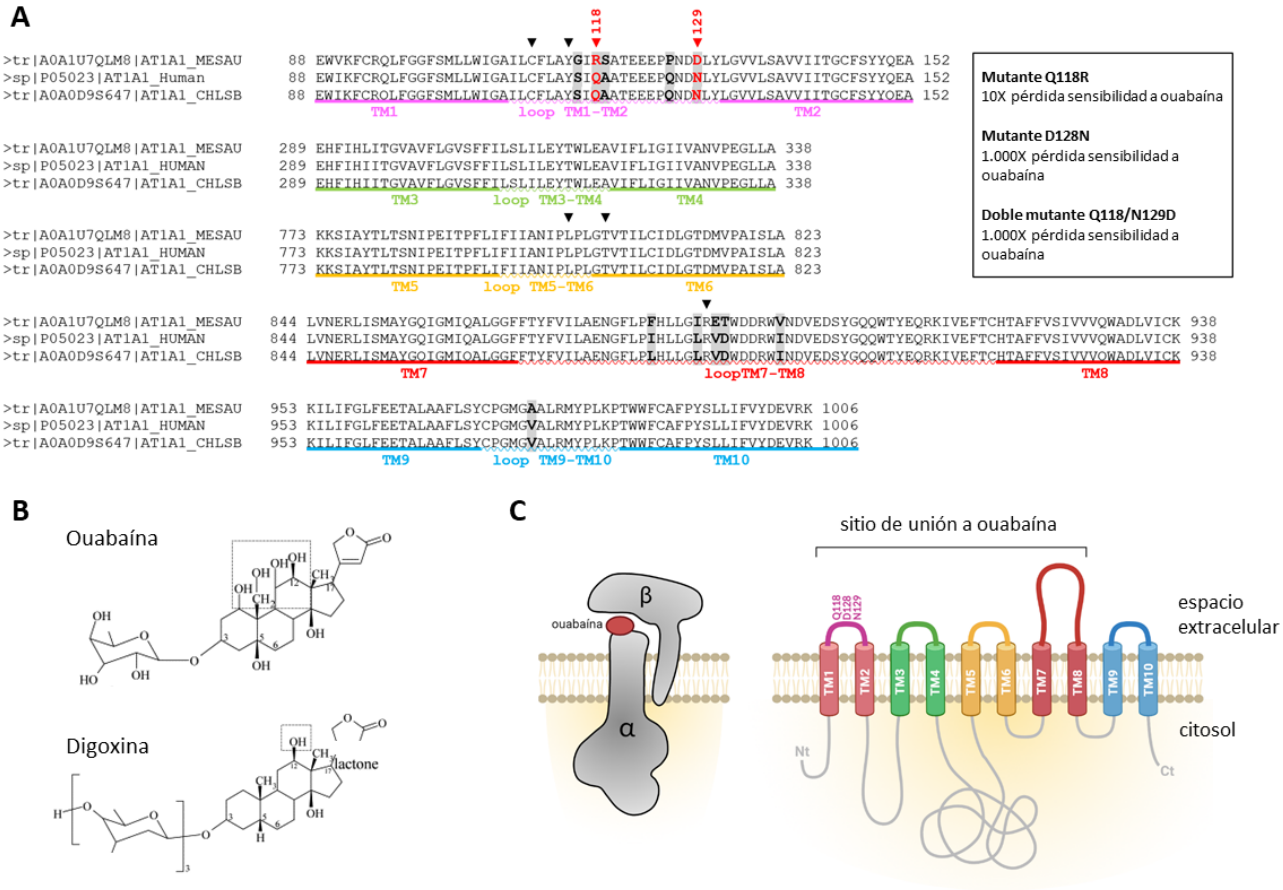


Figura 49. Alineamiento de la secuencia de la subunidad alfa de las ATPasas de Na+/K+ de hámster, humano y mono verde africano. *(A) Se muestran solo las secuencias correspondientes a los segmentos transmembrana (TM1-TM10) y los loops extracelulares, ya que son las regiones implicadas en la unión a glucósidos cardíacos. Se ha marcado con un triángulo sobre la secuencia los residuos descritos en la bibliografía como implicados en la unión a ouabaína. Se indican con fondo gris los residuos mutados en la secuencia de hámster con respecto a humano y mono verde. Además, en rojo se señalan las mutaciones Q118R y N129D. Se ha descrito previamente que el doble mutante Q118R/N129D es hasta 1000 veces menos sensible a oubaína. (B) Estructuras químicas de la ouabaína y la digoxina. (C) Esquema de la estructura molecular de la subunidad alfa de la ATPasa de Na+/K+. Notación de las secuencias: MESAU, hámster (células BHK21); Human, humano (células 293T); CHLSB, mono verde africano (células Vero).*

Para entender la diferencia en la respuesta a digoxina y lanatósido C entre células Vero y BHK21, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de la bomba sodio-potasio-ATPasa plasmática (Na^+/K^+-ATPasa) de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*, células Vero), hámster (*Mesocricetus auratus*, células BHK21) y humanos (Figura 49A). En concreto, se alinearon las regiones correspondientes a los segmentos transmembrana y los *loops* extracelulares de la subunidad alfa, puesto en la bibliografía se había descrito que son estas regiones de la proteína las que se unen a ouabaína (Keenan *et al.,* 2005) y, por tanto, al resto

de drogas derivadas como la digoxina o el lanatósido C. El mono verde africano y el humano compartían una homología del 100% en estas regiones, sin embargo, se observaron un total de 11 mutaciones puntuales en la Na^+/K^+-ATPasa de hámster (señaladas en color gris en la Figura 49A), acumuladas en los *loops* extracelulares TM1-TM2, TM7-TM8 y TM9-TM10. Entre ellas, se observaron dos mutaciones en las posiciones Q118R y N129D que habían sido asociadas a una pérdida en la sensibilidad a ouabaína de tres órdenes de magnitud (Keenan *et al.,* 2005). Estas mutaciones puntuales en la subunidad alfa de la Na^+/K^+-ATPasa de hámster podrían ser suficientes para explicar que la digoxina y el lanatósido C no inhibieran la infección del BUNV en células BHK21.

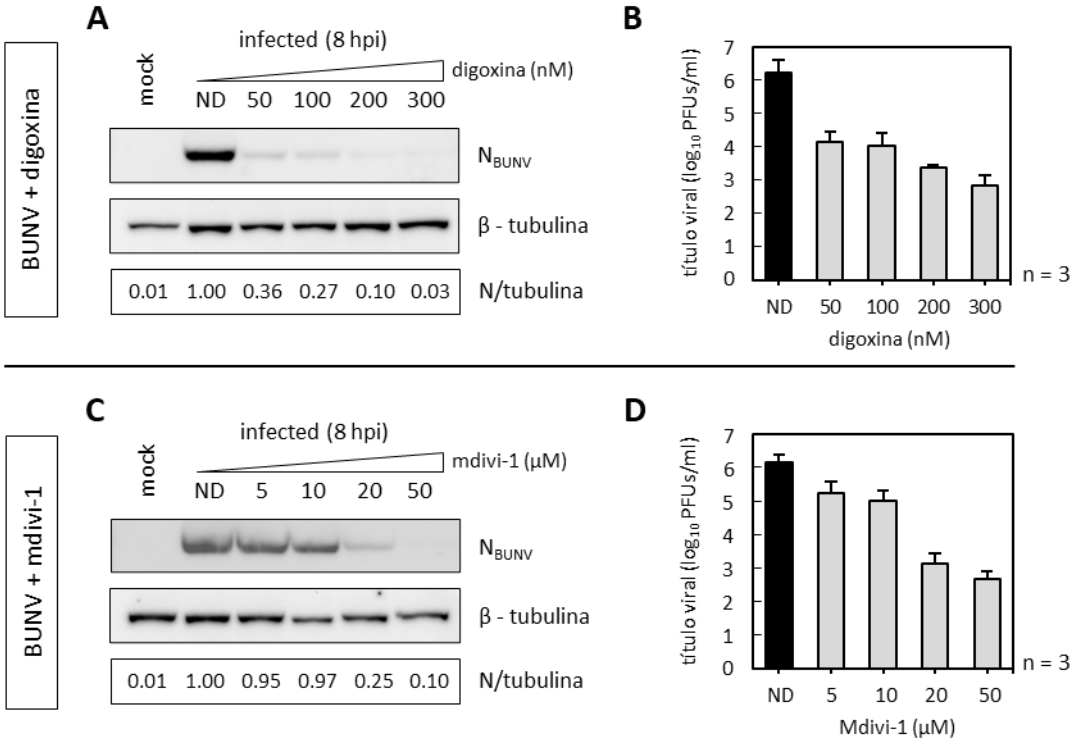


Figura 50. Efecto de digoxina y Mdivi-1 en la expresión de la proteína N y en el título viral. *Se infectaron células Vero con BUNV (MOI de 1 PFU/célula) en presencia de concentraciones crecientes de digoxina: 0, 50, 100, 200, 300 nM (A, B) o Mdivi-1: 0, 5, 10, 20, 50 μM (C, D). A las 8 hpi, se procesaron por separado las monocapas celulares y los sobrenadantes o medios de cultivo. Se cuantificó la expresión intracelular de la proteína viral N mediante western blot e inmunodetección, utilizando un anticuerpo anti-N y un anticuerpo anti-tubulina como control de carga (A, C). En paralelo, se cuantificó el titulo viral extracelular mediante ensayo de placas de lisis (B, D).*

A continuación, se evaluó el efecto de las drogas en la expresión intracelular de la proteína N del BUNV y en el título viral. Para ello se infectaron células Vero con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula, pasada una hora de adsorción viral se añadieron concentraciones crecientes de digoxina (50, 100, 200, 300 nM) o Mdivi-1 (5, 10, 20, 50 μM) al medio de cultivo, y se dejó progresar la infección hasta las 8hpi. Pasado este tiempo, se recogieron por separado el medio de cultivo y las células infectadas. El efecto de las drogas sobre la expresión de la proteína N se estudió a partir de las monocapas celulares mediante *western blot* e

inmunodetección con un anticuerpo anti-N (Figura 50A y C), y el título viral del medio de cultivo se determinó mediante ensayo de placa (Figura 50B y D). A concentraciones cercanas a sus respectivas IC50, las dos drogas redujeron la expresión de la proteína viral N, aunque a distinto nivel. La digoxina redujo en mayor medida la cantidad de la proteína N incluso a una concentración de 50 nM, por debajo de la IC50. Respecto al título viral, tanto la digoxina como Mdivi-1 disminuyeron eficazmente la cantidad de virus infectivos en el medio, reduciendo el título viral extracelular hasta tres órdenes de magnitud en células tratadas con digoxina 200 nM, o con Mdivi-1 20 μM.

4.4. Efecto de la digoxina en la infección de BUNV

En primer lugar, se caracterizaron los cambios en el *network* mitocondrial de células Vero tratadas con digoxina 100 nM, procesadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-TOMM22 y analizadas mediante microscopía confocal (Figura 51A). El tratamiento con digoxina indujo una alteración severa del *network* mitocondrial: se observaron grandes agregados mitocondriales en la región yuxtanuclear similares a los que se habían caracterizado previamente durante la infección por BUNV, mientras que las mitocondrias localizadas en la periferia celular se encontraban altamente fragmentadas, con un patrón punteado. Combinando el tratamiento con digoxina y la infección con el BUNV en condiciones estándar (1 PFU/célula, 8 hpi), las células mostraron una fragmentación general del *network* y cierta agregación de mitocondrias parcialmente coincidentes con la señal de Gc en las factorías virales (Figura 51B).

Adicionalmente, se estudió si los cambios en la estructura del *network* mitocondrial inducidos por el tratamiento con digoxina eran reversibles. Para ello, se trataron células Vero con digoxina 100 nM y, transcurridas 4 h, cuando se empezaron a observar los cambios característicos (fragmentación de la red de mitocondrias y agregación en la zona yuxtanuclear), las células se lavaron con PBS y se les añadió medio DMEM-10% FBS fresco sin digoxina (Figura 52A) o se les añadió nuevamente digoxina 100 nM (Figura 52B). En el caso de las células lavadas a las que se les retiró la digoxina del medio de cultivo, se deshicieron los agregados y las mitocondrias empezaron a ocupar todo el volumen de la célula, volviendo a tener una estructura elongada e interconectada a las 72 h, revirtiendo los cambios inducidos por la digoxina. Sin embargo, las células que permanecieron en cultivo con digoxina en el medio progresaron hacia la formación de grandes agregados mitocondriales (48 h) y la muerte celular de toda la monocapa (72 h).

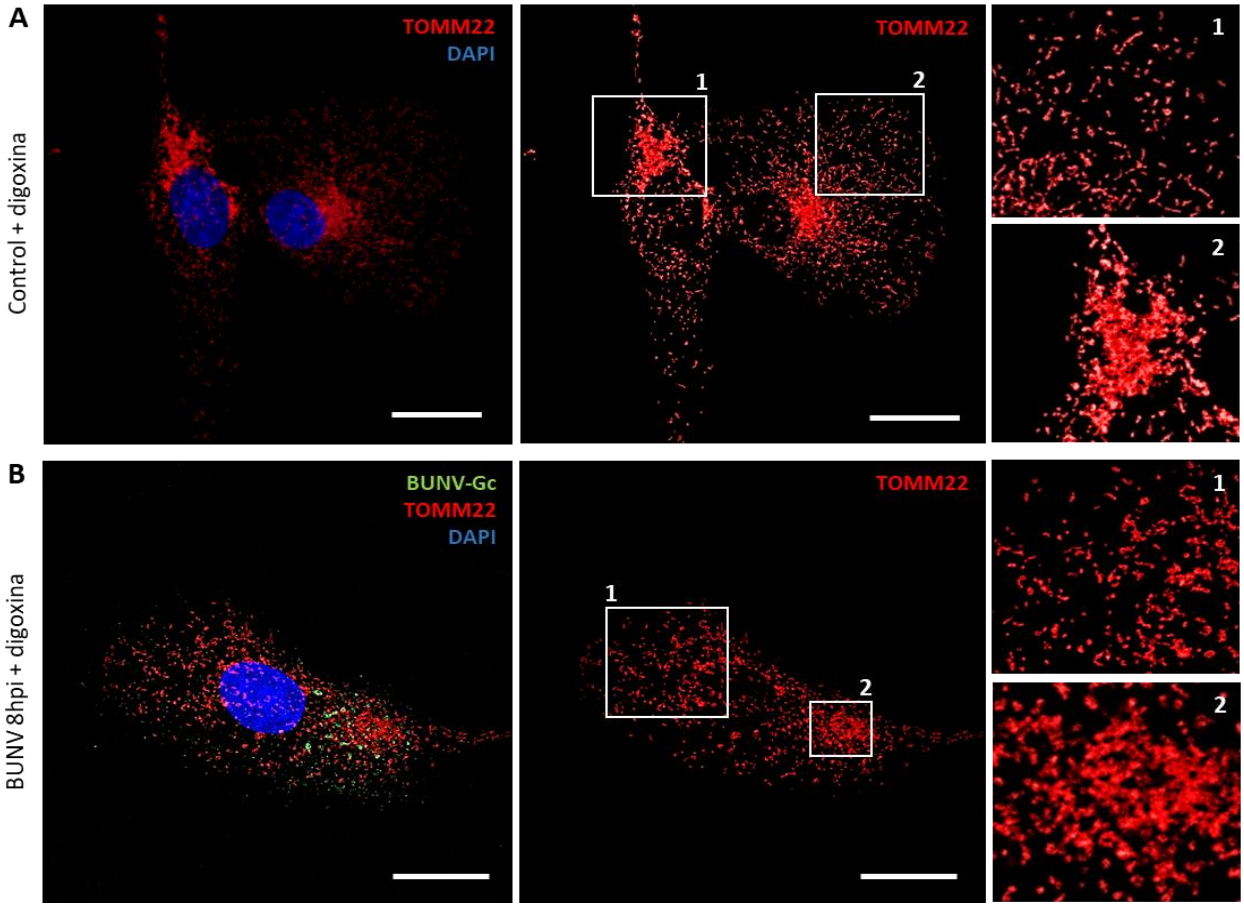


Figura 51. Microscopía de fluorescencia del network mitocondrial de células Vero control e infectadas con BUNV en presencia de digoxina. *Se infectaron células Vero con BUNV (MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi) y después de la hora de adsorción viral, se trataron con digoxina 100 nM. El network mitocondrial se marcó para MF con un anticuerpo policlonal anti-TOMM22 (rojo), las factorías virales se marcaron con un anticuerpo primario monoclonal anti-Gc (verde) y los núcleos con DAPI (azul). En las imágenes de la izquierda y el centro se muestra la vista general del network mitocondrial global de células tratadas con digoxina 100 nM sin infectar (A) e infectadas (B). A la derecha se muestran zooms de las mitocondrias localizadas en las zonas periférica (1) y yuxtanuclear (2). Barras: 25 µm.*

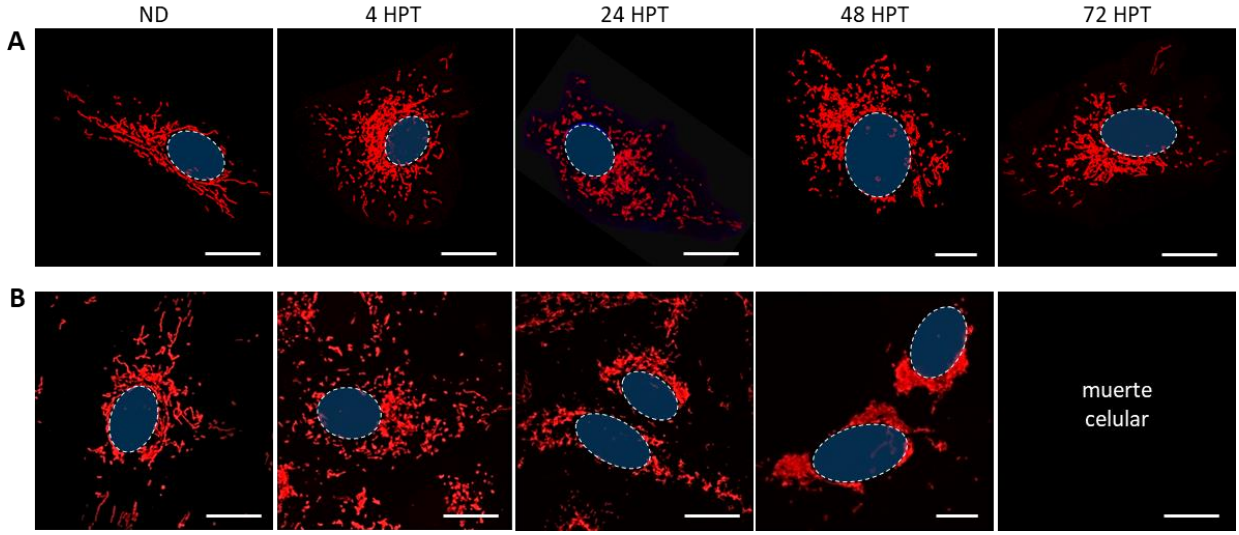


Figura 52. Recuperación del network mitocondrial de células Vero tras el tratamiento con digoxina. *Se añadió digoxina 100 nM al medio de cultivo de células Vero y se incubaron durante 4 horas a 37ºC. Pasado ese tiempo se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió medio de cultivo fresco (A), o se mantuvo la digoxina en el medio (B). Se estudiaron por MF las muestras celulares recogidas a las 24, 48 y 72 h desde el inicio del tratamiento (hpt, horas post-tratamiento), marcando el network mitocondrial con un anticuerpo anti-TOMM22 (rojo). Se ha delimitado el núcleo celular con una línea blanca punteada. En la condición en la que se mantuvo la digoxina en el medio de cultivo, a las 72 hpt las células se habían levantado por muerte celular. Barras de escala: 20 µm.*

Para ahondar en el mecanismo de acción de la digoxina como antiviral frente a BUNV, se estudiaron células Vero infectadas con el virus BUNV *wild type* (en condiciones estándar de infección, 1 PFU/célula y 8 hpi) en ausencia o presencia de digoxina 100 nM mediante microscopía confocal utilizando diferentes marcadores.

En primer lugar, se estudió el aparato de Golgi utilizando un anticuerpo anti-gigantina y, como marcador de las factorías virales, un anticuerpo anti-Gc (Figura 53). En las células control no infectadas, el Golgi de las células Vero permaneció compacto con independencia de si las células habían sido tratadas o no con digoxina, por lo que se concluyó que la digoxina no estaba actuando directamente sobre la estructura de este orgánulo. En el caso de células infectadas con el virus BUNV, el Golgi de las células Vero se fragmenta y dispersa por todo el citoplasma siguiendo un patrón punteado para dar lugar a las *mini* factorías características de esta línea celular. En las células infectadas y tratadas con digoxina 100 nM el Golgi se encontraba alterado con respecto al control, se volvía menos compacto y se dispersaba desde su posición yuxtanuclear habitual, pero sin llegar a fragmentarse como sucede en células infectadas sin tratar, por lo que de algún modo la digoxina podría estar interfiriendo en la morfogénesis de las factorías virales.

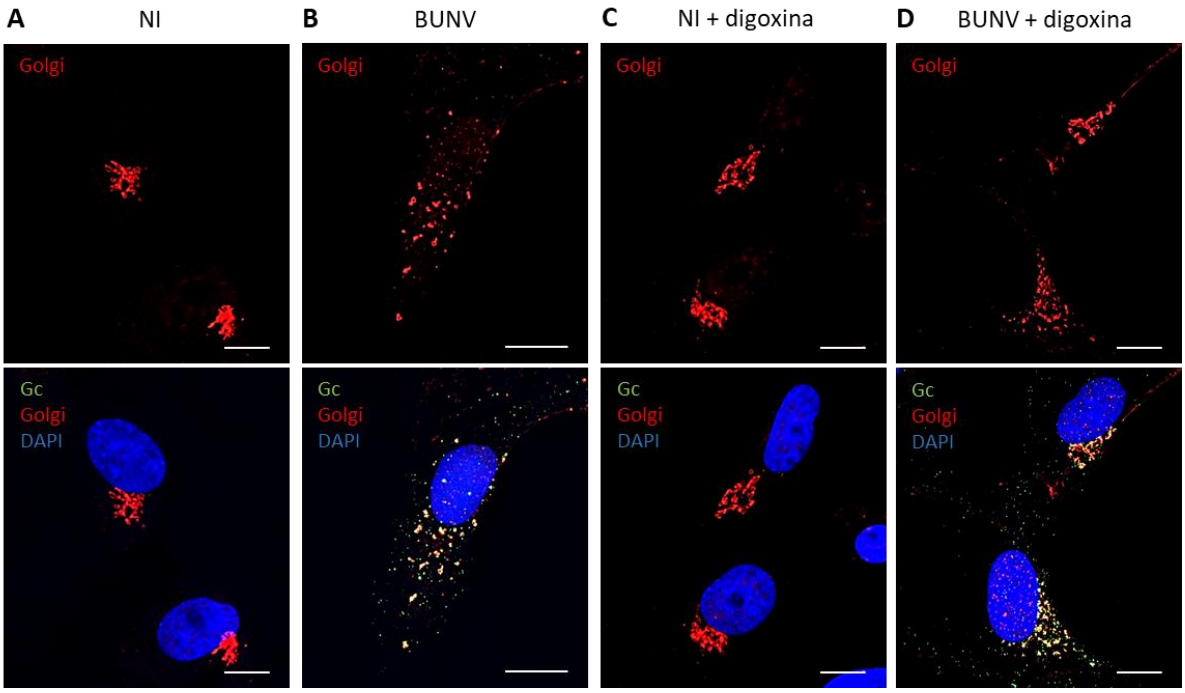


Figura 53. Microscopía confocal del aparato de Golgi en células Vero control e infectadas, en presencia o ausencia de digoxina. *Células Vero control sin infectar (A, C) o infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula (B, D). A un tiempo de 1 hpi se añadió digoxina 100 nM al medio de cultivo según se indica (C, D). A las 8 hpi, se recogieron las células y se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-gigantina para marcar el compartimento cis-media Golgi (rojo). La glicoproteína viral Gc se marcó con un anticuerpo monoclonal específico (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). NI, células no infectadas. ND, células no tratadas. Barras de escala: 15 µm.*

También se estudió la estructura del retículo endoplásmico (RE) tras el tratamiento de digoxina y la infección por el BUNV mediante un anticuerpo anti-PDI pero, en esta ocasión, se empleó un anticuerpo anti-N para marcar las células infectadas (Figura 54). En las células infectadas y tratadas con digoxina se observó un RE sin la formación de las estructuras globulares asociadas a estrés de retículo que sí se encontraban en las células infectadas sin tratar, aunque los túbulos del RE estaban engrosados en comparación con el control sin digoxina ni BUNV. Este hecho podría ser compatible con el bloqueo de la progresión de la infección. Sorprendentemente, el patrón de localización de la nucleoproteína viral N cambió drásticamente tras el tratamiento de digoxina, pasando de una localización eminentemente citoplasmática en ausencia de digoxina, a acumularse en grandes agregados.

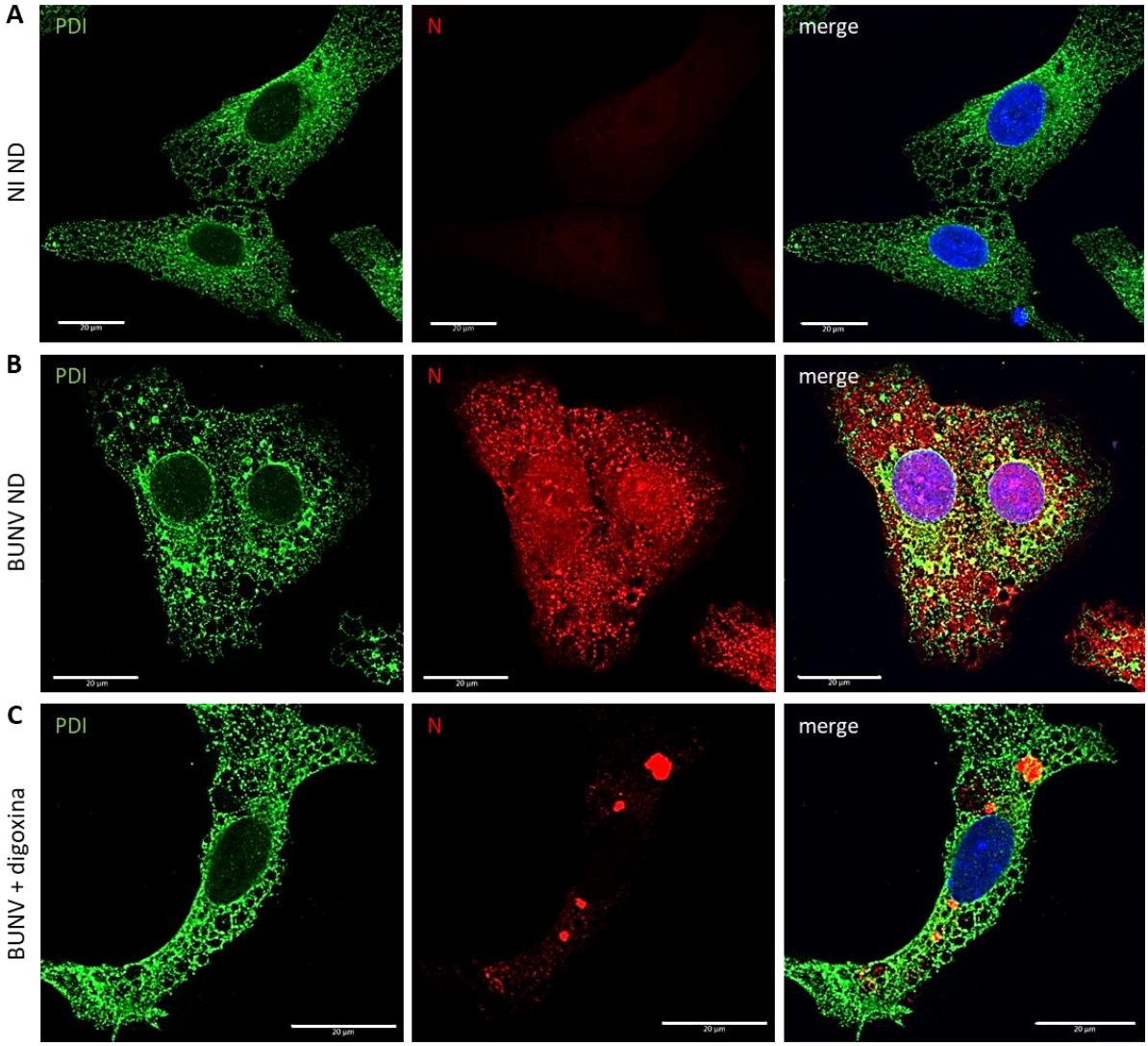


Figura 54. Microscopía confocal del retículo endoplásmico de células Vero control e infectadas en presencia o ausencia de digoxina. *Se estudiaron células Vero control sin infectar (A) o infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula (B, C). A un tiempo de 1 hpi se añadió digoxina 100 nM al medio de cultivo (C). A las 8 hpi, se recogieron las células y se procesaron para IF con un anticuerpo monoclonal anti-PDI para marcar la estructura del retículo endoplásmico (verde). Para marcar las células infectadas se utilizó un anticuerpo policlonal anti-N (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). NI, células no infectadas. ND, células no tratadas. Barras de escala: 20 µm.*

El cambio de localización de la proteína N durante la infección de células Vero tratadas con digoxina se confirmó mediante un doble marcaje de las proteínas virales Gc y N (Figura 55). La señal de Gc presentaba una localización punteada distribuida por todo el citoplasma con cierta acumulación en zonas yuxtanucleares que coincidiría con el aparato de Golgi, y se determinó que los agregados de la proteína N eran independientes de la localización de la glicoproteína Gc.

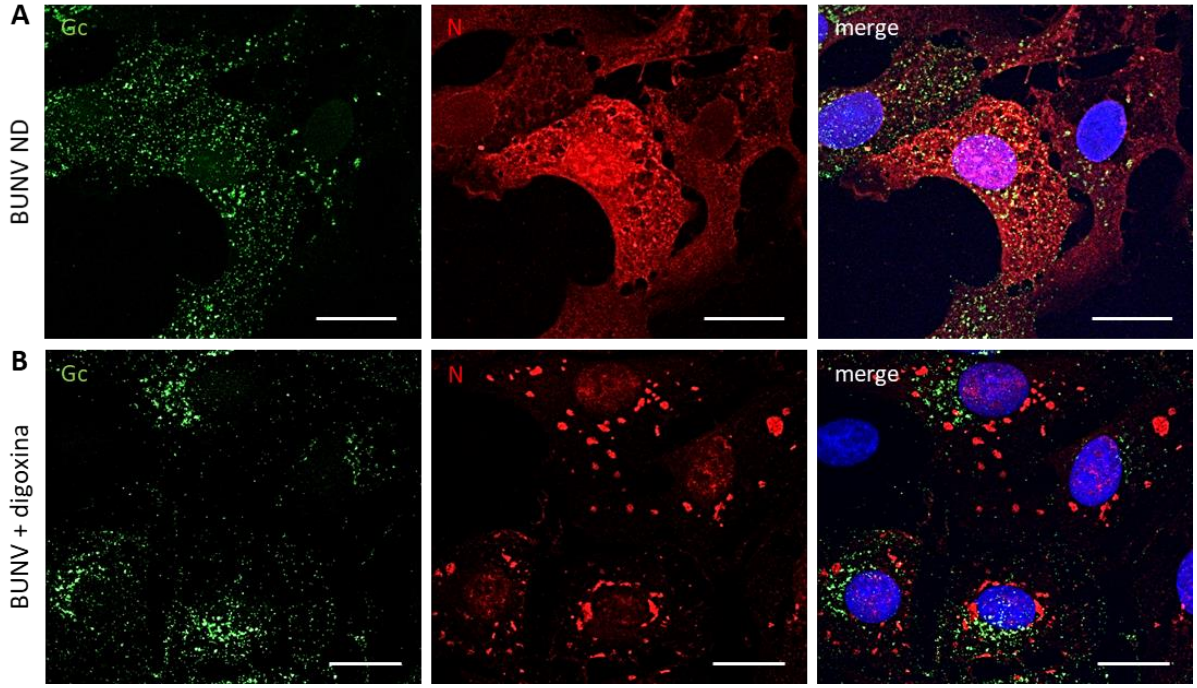


Figura 55. Microscopía confocal de las proteínas virales Gc y N durante la infección de BUNV en ausencia o presencia de digoxina. *Se estudiaron células Vero infectadas con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula en ausencia (A) o en presencia de digoxina 100 nM (B), añadida al medio de cultivo a un tiempo de 1 hpi. A las 8 hpi, se recogieron las células y se procesaron para inmunofluorescencia con dos anticuerpos primarios frente a las proteínas virales Gc (verde) y N (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). ND, células no tratadas. Barras de escala: 20 µm.*

Finalmente, también se estudió la localización de la polimerasa viral durante el tratamiento con digoxina. Para ello se infectaron células Vero con el virus recombinante rBUNL-V5, que expresa la polimerasa viral fusionada al tag V5 permitiendo su localización mediante inmunomarcaje con un anticuerpo anti-V5. En células infectadas y no tratadas con digoxina, el patrón de distribución de N y L era fundamentalmente citosólico y definiendo la estructura de algunos compartimentos membranosos, como se había descrito con anterioridad (Shi y Elliot, 2009). Sin embargo, en presencia de digoxina, las proteínas N y L colocalizaban acumulándose en agregados de elevado tamaño en el citoplasma (Figura 56).

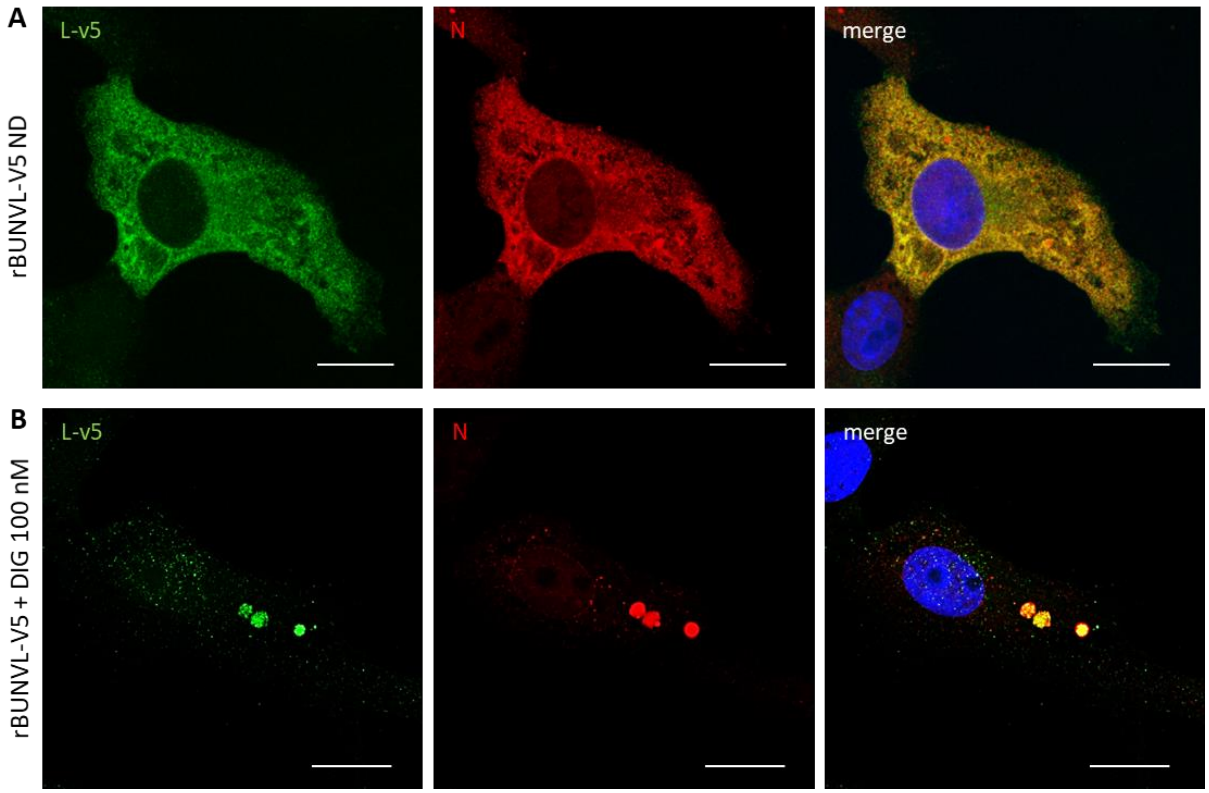


Figura 56. Microscopía confocal de células Vero infectadas con el virus recombinante rBUNVL-V5 en presencia o ausencia de digoxina. *Las células Vero se infectaron con el virus recombinante rBUNL-V5, que contiene la polimerasa viral L fusionada al tag V5, a una MOI de 1 PFU/célula en ausencia de tratamiento (A) o en presencia de digoxina 100 nM (B). A las 16 hpi, se recogieron las células y se procesaron para IF marcando la proteína viral L con un anticuerpo monoclonal anti-V5 (verde), y la proteína N con un anticuerpo policlonal anti-N (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 15 µm.*

4.5. Efecto de Mdivi-1 en la infección de BUNV

Para caracterizar los cambios en el *network* mitocondrial de células Vero inducidos por el tratamiento con Mdivi-1, se compararon células control (Figura 57A) y células tratadas durante 8 h con Mdivi-1 a una concentración de 20 µM, procesándolas para MF con un anticuerpo anti-TOMM22. Tras el tratamiento con Mdivi-1, se pudieron observar células con un *network* mitocondrial siguiendo dos fenotipos diferentes: mitocondrias alargadas, con elevado número de ramificaciones e interconexiones (Figura 57B), o *networks* mitocondriales alterados, con mitocondrias más irregulares y distribuidas por toda la superficie celular (Figura 57C). Cuando se combinó la infección con el BUNV en condiciones estándar (1 PFU/célula, 8 hpi) con el tratamiento de Mdivi-1 20 µM (Figura 57E), las células mostraron una fragmentación general del *network* y cierta agregación de mitocondrias en una zona yuxtanuclear coincidiendo parcialmente con la señal de Gc en las factorías virales, siguiendo un patrón similar al de células Vero infectadas sin tratar con Mdivi-1 (Figura 57D). Por tanto, aunque el tratamiento con Mdivi-1 20 µM reducía significativamente el

porcentaje de células infectadas, no se observaron diferencias en el *network* mitocondrial de las células tratadas con Mdivi-1 en las que llegaba a progresar la infección con respecto a las células infectadas sin tratar.

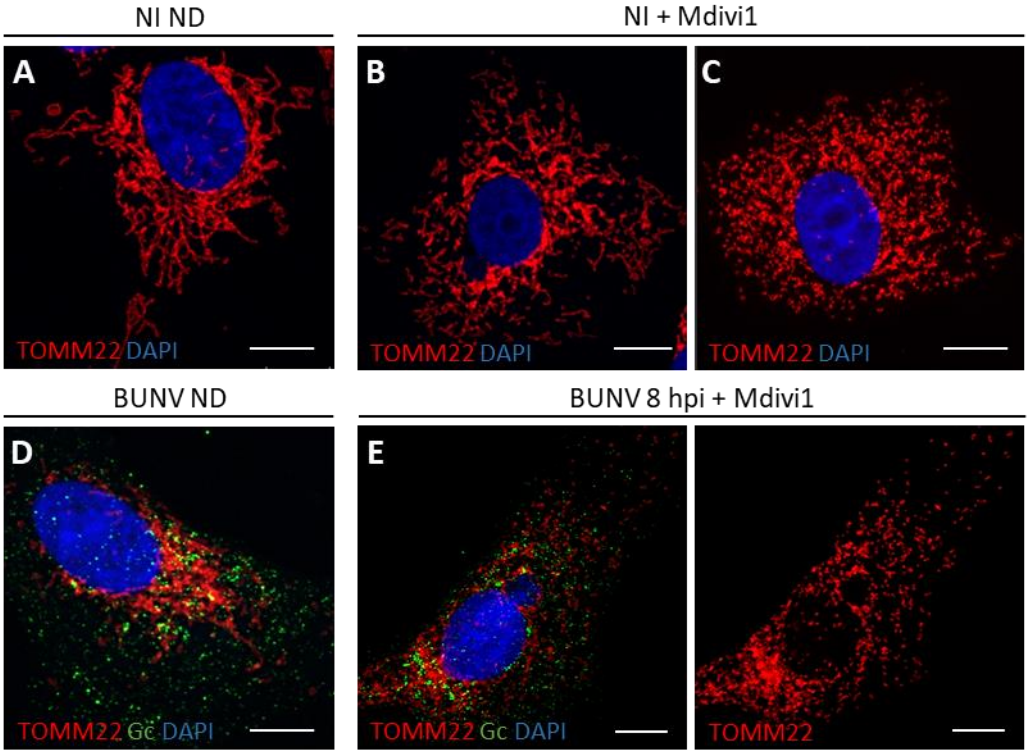


Figura 57. Microscopía de fluorescencia del network mitocondrial de células Vero control e infectadas con BUNV en presencia de Mdivi-1. *Se infectaron células Vero con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula. Después de la hora de adsorción viral, se añadió Mdivi-1 20 µM al medio de cultivo. A las 8 hpi, las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia. El network mitocondrial se marcó con un anticuerpo policlonal anti-TOMM22 (rojo), las factorías virales se marcaron con un anticuerpo primario monoclonal anti-Gc (verde), y los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barras de escala: 10 µm.*

Adicionalmente, mediante microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo anti-gigantina para marcar el compartimento *cis*-Golgi, se observó que Mdivi-1 inducía alteraciones en la morfología de este orgánulo, independientemente de la infección del BUNV. El tratamiento con Mdivi-1 20 µM producía la fragmentación del Golgi y su dispersión por todo el citoplasma (Figura 58A). Este efecto no se había descrito previamente en la literatura, por lo que se decidimos estudiar las alteraciones en el aparato de Golgi mediante microscopía electrónica. El tratamiento con Mdivi-1 produjo la fragmentación del Golgi en múltiples unidades estructurales independientes de longitud menor de 1 µm. No obstante, a pesar de la fragmentación, los '*mini-Golgis*' presentaban membranas intactas y se encontraban formados por apilamiento de distintas cisternas por lo que, a pesar de su tamaño, podrían seguir siendo funcionales (Figura 58D). La presencia de estructuras virales, complejos replicativos y virus intracelulares se redujo con el tratamiento de Mdivi-1. Respecto a la ultraestructura de las mitocondrias, el tratamiento con Mdivi-1 no parecía

producir alteraciones significativas en la electrodensidad del espacio intermembrana ni en la morfología de las crestas. Sin embargo, en células infectadas con el BUNV y tratadas con Mdivi-1, aunque el espacio intermembrana era más electrodenso, no se apreciaron los defectos en la ultraestructura de las mitocondrias que se habían descrito previamente durante la infección con el BUNV, lo que implicaba que el tratamiento con Mdivi-1 estaría atenuando el daño mitocondrial (Figura 58G).

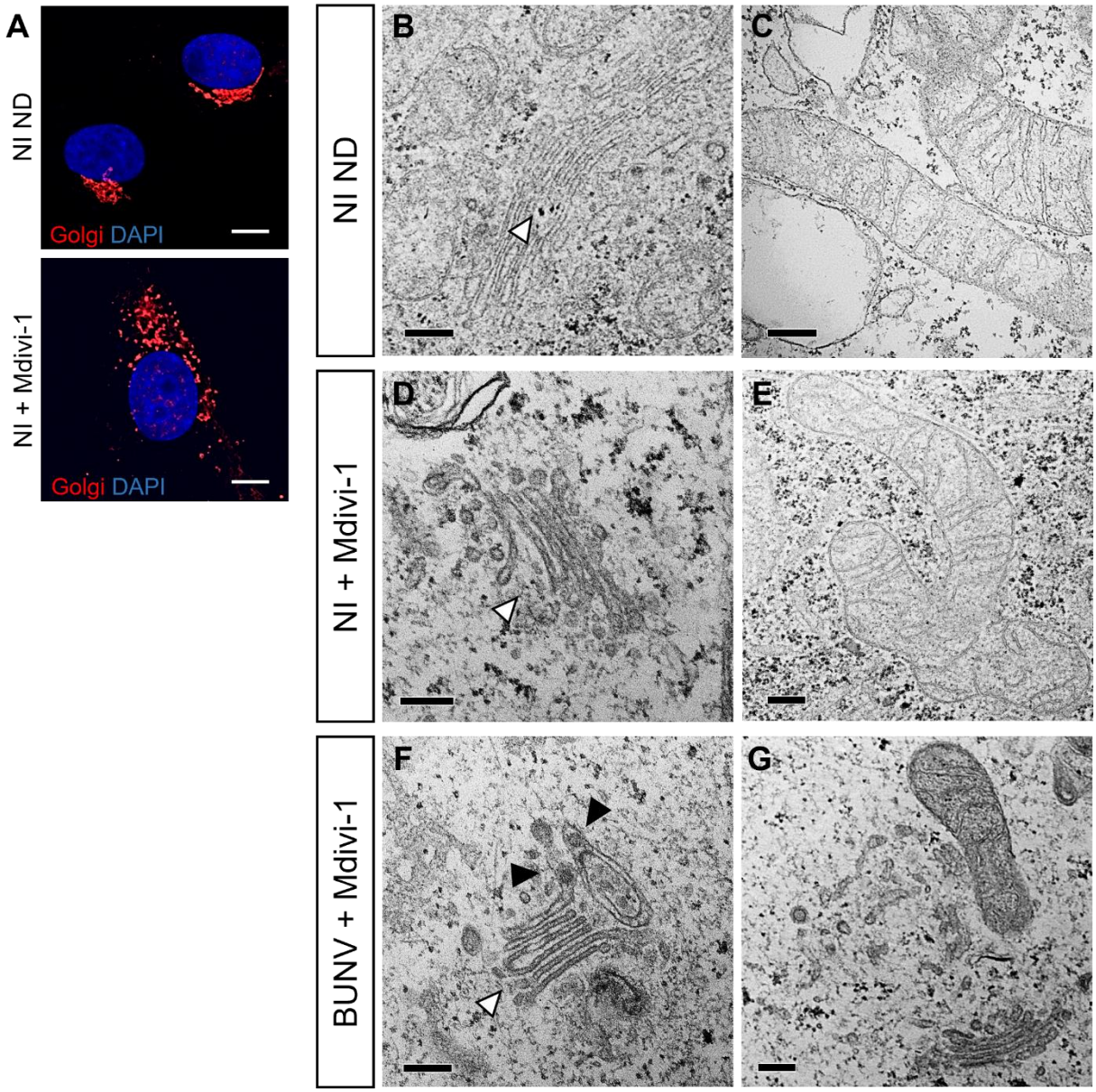


Figura 58. Estudio del aparato de Golgi y mitocondrias de células Vero control e infectadas por el BUNV en presencia o ausencia de Mdivi-1. *(A) Imágenes de microscopía confocal de células Vero no infectadas en ausencia o presencia de Mdivi-1 20 µM (8h). Se utilizó un anticuerpo primario anti-gigantina para marcar el aparato de Golgi (rojo), y DAPI para marcar el núcleo celular(azul). (B-G) Imágenes de TEM de secciones ultrafinas procedentes de células Vero control e infectadas (MOI: 1 PFU/célula, y 8 hpi) en ausencia o presencia de Mdivi-1 µM.Las puntas de flecha blancas señalan los cisternas del Golgi. Las puntas de flecha negras señalan las estructuras virales. Barras de escala: 10 µm en A; 500 nm en B; y 200 nm en C-G.*

4.6. Efecto del silenciamiento de mitofusina 2 en la infección

Tras observar el potencial antiviral de Mdivi-1 contra el BUNV a través de la inhibición de la división mitocondrial, quisimos evaluar el efecto del proceso contrario: la inhibición de la fusión mitocondrial. En la actualidad no se ha desarrollado ningún compuesto químico que inhiba específicamente la fusión de mitocondrias. Por este motivo, se decidió bloquear este proceso a través del silenciamiento de una de las proteínas clave implicadas en la fusión mitocondrial, la mitofusina 2 (mfn2).

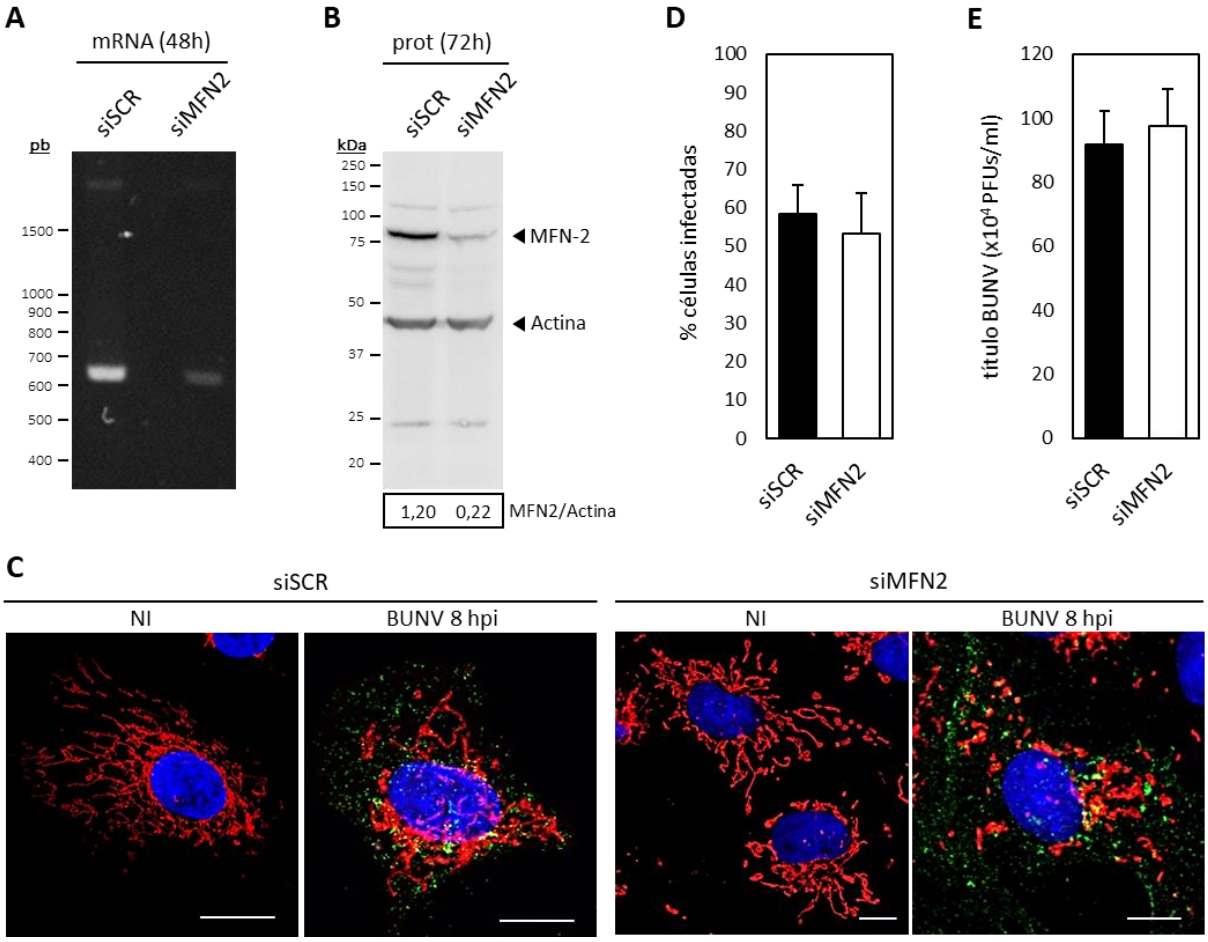


Figura 59. Efecto del silenciamiento de la proteína de fusión mitocondrial mfn2 en infección por BUNV en células Vero. *Se transfectaron células Vero con una mezcla de tres dupletes siRNA de 27 mer específicos dirigidos contra el mRNA de mfn2 (siMFN2) o con un siRNA SCRAMBLE (siSCR) como control de transfección. Se evaluó el rendimiento del silenciamiento a nivel de mRNA a las 48 horas post-transfección (hpt) mediante PCR (A) y a nivel de proteína a las 72 hpt mediante western blot e inmunodetección con un anticuerpo anti-mfn2 específico (B). Para estudiar el efecto del silenciamiento en la infección, a las 72 hpt, las células se infectaron con BUNV a una MOI de 1 PFU/célula y 8 hpi. Se estudiaron las células transfectadas y/o infectadas (según se indica) mediante microscopía confocal marcando el network mitocondrial con un anticuerpo anti-TOMM22 (rojo), las factorías virales con un anticuerpo anti-Gc (verde) y el núcleo con DAPI (azul) (C). A partir de las imágenes de microscopía de fluorescencia se cuantificó el porcentaje de células infectadas (D). Adicionalmente, se cuantificó el título viral extracelular mediante ensayo de placa (E). Barras de escala en A: 10 µm. Las barras de error en D y E representan la desviación estándar.*

Para conseguir el silenciamiento, se transfectaron células Vero con una mezcla de tres dupletes de siRNA de 27 pb diseñados contra el mRNA de MFN2 (siMFN2, OriGene®). Como

control negativo de silenciamiento, se transfectaron las células con un duplete de siRNA control universal *scrambled* (siSCR). Se monitorizó la eficiencia del proceso de silenciamiento a nivel de mRNA mediante RT-PCR con *primers* específicos, y a nivel de proteína mediante *western blot* con un anticuerpo específico anti-Mfn2 a las 48 y 72 horas post-transfección (hpt) respectivamente (Figura 59A-B). Se obtuvo un rendimiento elevado, con porcentajes de silenciamiento del 79,5% a nivel de mRNA a las 48 hpt, y del 81,7% a nivel de proteína a las 72 hpt.

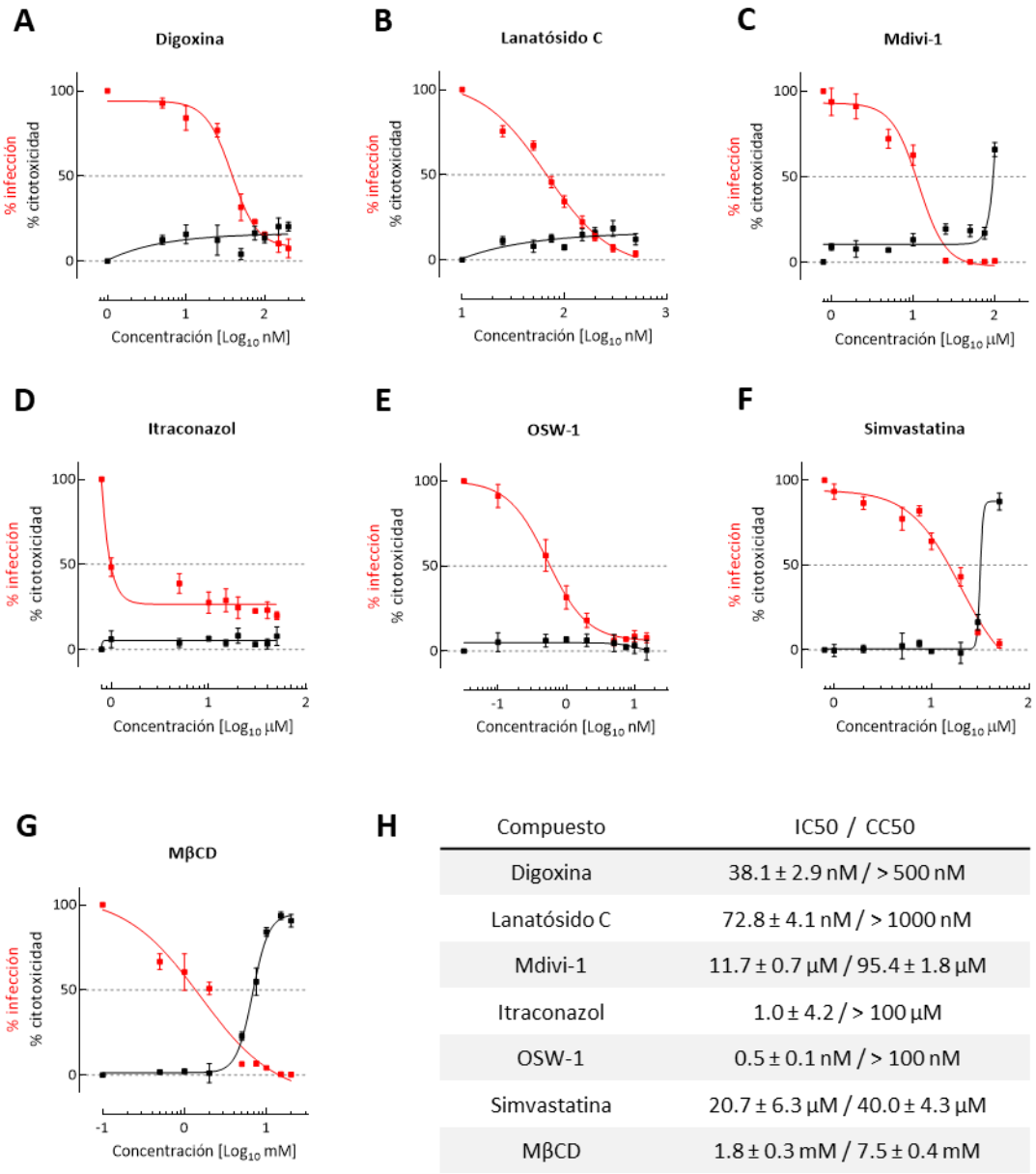
A continuación, las células Vero transfectadas con siMFN2 durante 72 h se infectaron con virus BUNV a una MOI de 1 PFU/célula, dejando progresar la infección durante 8 h. Se estudió el *network* mitocondrial mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-TOMM22. El *network* mitocondrial se vio ligeramente alterado tras la transfección con el siMFN2, las mitocondrias seguían teniendo una morfología alargada, pero se encontraban menos interconectadas. Durante la infección con el virus BUNV, el *network* mitocondrial se encontraba fragmentado y agregado en torno a las factorías virales en ambas condiciones de transfección, con el siSRC control o con siMFN2 (Figura 59C). Adicionalmente, se calculó el porcentaje de células infectadas por microscopía de fluorescencia con un anticuerpo anti-Gc (Figura 59D), y se cuantificó el título viral del medio extracelular mediante ensayo de placa (Figura 59E).

No se observaron diferencias significativas al comparar las células control y las células transfectadas con el siMFN2, ni en el porcentaje de infección ni en el título viral obtenidos a un tiempo de infección de 8hpi. Este resultado implicaría que la desregulación de la dinámica mitocondrial por el bloqueo de una de las principales proteínas implicadas en la fusión de mitocondrias, la mfn2, no altera el ciclo vital del BUNV.

5. Validación de la capacidad antiviral contra coronavirus de las moléculas estudiadas previamente en bunyavirus

A raíz de la emergencia sanitaria producida por la aparición del coronavirus SARS-CoV-2, causante de la pandemia de la COVID-19, se hizo necesaria la investigación tanto de vacunas como de nuevos fármacos antivirales que pudieran frenar el avance de este virus. Por este motivo decidimos estudiar en coronavirus los compuestos con actividad antiviral testados en el BUNV, debido a que se dirigían contra dianas celulares, esperábamos que algunos de estos compuestos pudiesen inhibir también la infección por coronavirus.

Para este objetivo, se utilizó como modelo la infección de células MRC5 con el coronavirus humano HCoV-229E, que pertenece al género *alphacoronavirus* y tiene un genoma RNA monocatenario de polaridad positiva. Este virus se encuentra entre los agentes causales del resfriado común, y tenía la ventaja de poder ser manipulado en una instalación de nivel de bioseguridad 2.



H

Compuesto	IC50 / CC50
Digoxina	38.1 ± 2.9 nM / > 500 nM
Lanatósido C	72.8 ± 4.1 nM / > 1000 nM
Mdivi-1	11.7 ± 0.7 µM / 95.4 ± 1.8 µM
Itraconazol	1.0 ± 4.2 / > 100 µM
OSW-1	0.5 ± 0.1 nM / > 100 nM
Simvastatina	20.7 ± 6.3 µM / 40.0 ± 4.3 µM
MβCD	1.8 ± 0.3 mM / 7.5 ± 0.4 mM

Figura 60. Actividad antiviral contra el coronavirus HCoV-229E de las diferentes drogas relacionadas con el metabolismo y flujo lipídico y el network mitocondrial. *Porcentaje de infección de células MRC5 (líneas rojas) expuestas a una concentración fija de virus HCoV-229E (0,1 TCID50/célula y 16 hpi) en presencia de concentraciones crecientes de digoxina (A), lanatósido C (B), Mdivi-1 (C), itraconazol (D), OSW-1 (E), simvastatina (F) o metil-β-ciclodextrina (G). Efecto citotóxico en las células MRC5 (líneas negras) expuestas a concentraciones crecientes de las mismas drogas y en ausencia de virus. Resultado de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar. (H) Tabla resumen con los valores de IC50 y CC50 calculados con el software IC50 Calculator (ATT Bioquest).*

Para estudiar la capacidad de las diferentes drogas para inhibir la infección del HCoV-229E se sembraron células MRC5 en placas de 96 pocillos, se infectaron con el virus HCoV-229E a una MOI de 0,1 $TCID_{50}$/célula y se incubaron 16 horas en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos a testar. Se calculó el porcentaje de células infectadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo específico contra la proteína de la nucleocápside del virus, anti-N_{229E} (Figura 60A-G). Paralelamente, se testó la citotoxicidad de todos los compuestos en células no infectadas mediante un ensayo de viabilidad basado en MTT. Todos los compuestos fueron capaces de inhibir la infección del virus HCoV-229E en la línea celular MRC5 con los valores de IC50 indicados en la tabla de la Figura 60H. Aunque todos los valores de IC50 se correspondían con dosis no tóxicas, en el caso de simvastatina, metil-β-ciclodextrina y Mdivi-1, las IC50 se encontraban próximas a la concentración a partir de la cual empezaba a observarse toxicidad celular por lo que, en caso de continuar su estudio en modelos animales, probablemente no representarían una alternativa segura.

5

Discusión

La aparición y diseminación de virus emergentes y reemergentes con capacidad para generar brotes epidémicos son un problema de salud pública global, cuya investigación ha sido reconocida como prioritaria por la OMS. Por este motivo, en la actualidad existe un creciente interés por el estudio de las interacciones entre los virus y diferentes factores de la célula huésped para identificar dianas que permitan desarrollar nuevos antivirales de amplio espectro.

En la presente tesis doctoral se han estudiado tres aspectos de la biología celular durante la infección de bunyavirus: (1) los cambios en la composición lipídica de las membranas celulares y la composición lipídica que adquiere la envuelta viral; (2) el transporte de lípidos mediado por las LTPs en los sitios de contacto entre membranas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, con especial atención a la proteína de unión a oxiesterol (OSBP); y (3) la dinámica y función del *network* mitocondrial. Para ello se ha utilizado el virus Bunaymwera como modelo; y una amplia variedad de técnicas de bioquímica, biología celular y microscopía.

Los resultados obtenidos nos han permitido seleccionar un grupo de moléculas, algunas de ellas aprobadas para el tratamiento de otras patologías, que a través de la interferencia sobre dianas celulares han demostrado ser inhibidores de la infección del BUNV en cultivos celulares. Además, se ha comprobado que estos mismos compuestos pueden inhibir la infección de otro virus RNA no relacionado, el coronavirus humano HCoV-229E. Todo ello hace que las moléculas seleccionadas sean buenas candidatas para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales y abre las puertas para su estudio en modelos animales y ensayos clínicos.

1. La composición lipídica celular durante la infección y el lipidoma viral

La estructura, morfología y propiedades biofísicas de las membranas biológicas como son la carga, la curvatura, el espesor, y la fluidez, dependen en gran medida de su composición lipídica (Holthuis y Menon, 2014).

Los virus RNA inducen la síntesis de nuevas membranas y reorganizan la arquitectura de los orgánulos de la célula infectada para construir las factorías virales (Altan-Bonet, 2017; Fernández de Castro *et al.,* 2016; Toledo y Benach, 2015; van der Schaar, 2016). Además, alteran el metabolismo de la célula huésped, especialmente el metabolismo de los lípidos (Fernández-Oliva *et al.*, 2019; Heaton y Randall, 2011), dando lugar a membranas con unas características determinadas que favorecen la replicación y el ensamblaje de la progenie viral.

Utilizando técnicas de espectrometría de masas, en este trabajo hemos identificado una serie de cambios en la composición lipídica celular durante la infección de bunyavirus. Las principales diferencias encontradas en células 293T infectadas por el BUNV han sido: (1) una reducción del 10% en la composición molar de PC y aumento del 40% en los niveles de PS durante la infección; (2) un incremento significativo en los niveles totales de esfingolípidos en las células infectadas por el BUNV; y (3) un incremento en la concentración del colesterol total intracelular. El aumento de colesterol intracelular durante la infección por el BUNV se confirmó mediante ensayo enzimático con AmplexRed®, observando que la concentración de colesterol era incluso mayor a tiempos tempranos de infección (4 hpi), lo que podría indicar una reprogramación rápida del metabolismo celular dirigida hacia la captación de colesterol del medio extracelular o hacia la síntesis *de novo* de colesterol.

El análisis de las rutas metabólicas alteradas durante la infección realizado mediante la herramienta bioinformática BioPAN® ha sido especialmente relevante desde el punto de vista de la aplicabilidad al desarrollo de antivirales, ya que nos ha permitido identificar una serie de enzimas del metabolismo lipídico que se encontrarían desreguladas durante la infección por el BUNV: las esfingomielina-sintasas 1 y 2 (SMS1 y SMS2), la esfingomielina-fosfodiesterasa 1 (SMPD1), las esfingolípido-delta-4-desaturasas 1 y 2 (DEGS1 y DEGS2) y el transportador de ceramidas (CERT). Estas enzimas podrían ser potenciales dianas para la selección y desarrollo de moléculas con capacidad antiviral. En la actualidad existen inhibidores sintéticos de las SMS como el D609 (Li *et al.,* 2007), y de CERT como el HPA-12 (Saied *et al.,* 2014) que podrían ser buenos candidatos para inhibir la infección por el BUNV y otros bunyavirus emergentes. De hecho, se ha visto que la inhibición de las SMS reduce la infectividad de los flavivirus HCV (Khan *et al.,* 2014), WNV y USUV (Martin-Acebes *et al.*, 2014); y el bloqueo de CERT con la molécula HPA-12 disminuye drásticamente la salida del HCV de la célula huésped (Aizaki *et al.,* 2008; Yasuda *et al.,* 2001).

En los virus con envuelta como el BUNV, los lípidos son elementos estructurales de las propias partículas virales. Por este motivo, estudiamos la composición de la envuelta del virus Bunyamwera a partir de extractos lipídicos de virus purificados. En este trabajo hemos determinado por primera vez el lipidoma de un virus del orden *Bunyavirales*. El lípido mayoritario de las partículas virales del BUNV resultó ser el colesterol, que representa un porcentaje molar del 62%. Mientras que el resto de los lípidos que formaban la envuelta viral eran PC (21,4%), O-PC (7,5%), PS (4,8%), PE (1,4%), SM (2,8%) y HexCer (1,6%).

El retículo endoplásmico (RE) es el orgánulo celular en el que tiene lugar la biosíntesis de la mayor parte de los lípidos de la célula, incluyendo ácidos grasos, triacilglicéridos, fosfolípidos, ceramidas y colesterol (Jacquemyn *et al.,* 2017). Aunque en el

aparato de Golgi se completa la síntesis de ciertos esfingolípidos como las esfingomielinas, las glucosil- y lactosil-ceramidas, y los gangliósidos complejos (Futerman y Riezman, 2005). Además, el Golgi es el orgánulo central de la vía secretora: recibe los cargos (lípidos y proteínas) sintetizados en el RE, los procesa y los clasifica para ser transportados al compartimento intracelular de destino a través del transporte vesicular. Como consecuencia de este flujo, la composición lipídica de las membranas de los diferentes orgánulos varía. Además, se establece un gradiente creciente en la concentración de colesterol desde el RE hasta la membrana plasmática (vanMeer *et al.,* 2008).

Para el aparato de Golgi, la composición en porcentaje molar de los fosfolípidos de membrana es de: 45% de PC; 17% de PE; 12% de SM; 9% de PI; 5% de PS y el 12% restante lo forman la suma de otros fosfolípidos minoritarios (Yang *et al.,* 2018b). Mientras que la relación colesterol/fosfolípidos (Chol/PLs) en las membranas del Golgi es aproximadamente de 0,2 (vanMeer *et al.,* 2008). Aunque el porcentaje de colesterol varía entre las propias cisternas del Golgi, produciéndose un incremento en la cantidad de colesterol desde la región *cis*- hasta la región *trans*-Golgi (Blanchette-Mackie y Pentchev, 1998).

A pesar de que el BUNV utiliza el aparato de Golgi para establecer su factoría viral y adquiere su envuelta lipídica por *budding* o gemación a partir de las membranas de este orgánulo (Fontana *et al.,* 2008; Salanueva *et al.,* 2003), la envuelta del BUNV posee una composición lipídica que no coincide con la descrita para las membranas de este orgánulo. Llama la atención especialmente la diferencia en la relación Chol/PLs, que en el caso de la envuelta viral es aproximadamente de 1,4; siete veces superior a la relación Chol/PLs en el Golgi. La composición característica de la envuelta lipídica del BUNV con un alto contenido en colesterol, enriquecida en esfingolípidos, y con un porcentaje menor en PC, apuntaría a que la envuelta viral se podría originar por gemación en dominios lipídicos de tipo *lipid raft* en las membranas del Golgi. Los *lipid rafts* son microdominios dinámicos de membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos. Debido a la presencia de colesterol en una alta proporción, estas regiones presentan menos fluidez. Además, los *lipid rafts* actúan como plataformas donde se agrupan determinadas proteínas y componentes implicados en una misma vía de señalización. Esta agrupación evitaría la interacción inespecífica de moléculas implicadas en diferentes rutas y permitiría una rápida ejecución de la respuesta ante la llegada de una señal (Pike, 2003). Por otro lado, los *rafts* también pueden crear un micro-entorno en la membrana capaz de modificar la actividad de determinadas proteínas (Lucero y Robbins, 2004).

Por tanto, para adquirir una envuelta con una composición tan característica, el *budding* o gemación viral del BUNV no se produciría de forma pasiva y aleatoria, sino que tendría lugar selectivamente en determinadas regiones del Golgi enriquecidas en colesterol. Las proteínas Gc y Gn se podrían acumular en *clusters* o microdominios en las membranas del en asociación con colesterol y SPLs, y estas plataformas servirían de sitios de nucleación a los que se dirigen las vRNPs del BUNV para el ensamblaje y *budding*.

A nivel celular, mediante la sonda fluorescente filipina III observamos que durante la infección se acumulaba el colesterol en torno a las factorías virales. En su conjunto, el resultado de los experimentos llevados a cabo apunta a que el virus BUNV se replica y se ensambla en membranas enriquecidas en colesterol. Además, debido a que se observó un incremento en la concentración de colesterol intracelular desde tempos tempranos de infección y a que a tiempo más tardío se observaba un retículo endoplásmico cargado de colesterol, el BUNV podría promover la síntesis *de novo* de colesterol para generar un microambiente intracelular enriquecido en este lípido, que favorecería la replicación y el ensamblaje de nuevos virus.

En la bibliografía, se ha descrito que un gran número de virus utilizan los *lipid rafts* para infectar la célula huésped, como el virus de la influenza (Scheiffele *et al.,* 1999), el HIV-1 (Ali *et al.,* 2000), el virus del sarampión (Manie et al., 2000), el virus respiratorio sincitial (Werling *et al.,* 1999), los virus Ébola y Marburg (Empig y Golgsmith, 2002), *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (Gilbert y Benjamin, 2000), o el virus de Epstein-Barr (Dykstra et al., 2001). Se ha estudiado la depleción de colesterol como estrategia para bloquear diferentes etapas específicas del ciclo de replicación viral de un gran número de virus con envuelta. Por ejemplo, en el caso del virus del bosque Semliki (SFV), perteneciente a la familia *Togaviridae*, el poliovirus SV40 o el virus de la influenza, el colesterol tiene un papel importante en las primeras etapas del ciclo de replicación viral, en la fusión de la envuelta viral a la membrana celular o porque entran mediante endocitosis a través de caveolas que se originan a partir de *lipid rafts* enriquecidos en colesterol (Pelkmans *et al.,* 2001; Phalen y Kielian, 1991; Sun y Whittaker, 2003). En el caso del flavivirus WNV, la depleción del colesterol celular restringe la replicación del virus (Medigeshi *et al.,* 2008), y el HCV también es sensible a los cambios en la acumulación del colesterol celular, pero durante las etapas de ensamblaje y salida del virus de la célula (Elgner *et al.,* 2016).

Un estudio previo realizado con los bunyavirus BUNV y HAZV, determinó que la depleción de colesterol no tenía efecto en las etapas iniciales de adhesión y penetración de los virus en la célula huésped. Por el contrario, interfería en un punto posterior, interfiriendo sobre el mecanismo de escape de la ruta endocítica. Posiblemente debido a

que la depleción de colesterol influencia la fluidez de membrana e impide la fusión entre la envuelta viral y la membrana de los endosomas (Charlton *et al.,* 2019). Adicionalmente, la replicación del virus Andes (ANDV), un hantavirus patogénico del orden *Bunyavirales*, se bloqueó mediante la desregulación de la ruta biosintética del colesterol tanto genéticamente como farmacológicamente utilizando mevastatina (Kleinfelter *et al.,* 2015). Muchos virus son sensibles a las estatinas, fármacos inhibidores específicos de la HMGCR. Por ejemplo, el WNV y el DENV son inhibidos por lovastatina (Mackenzie *et al.,* 2007; Rothwell *et al.,* 2009; Sharma *et al.,* 2010; Soto-Acosta *et al.,* 2017), y el DENV y el HIV-1 por la simvastatina (Bryan-Marrugo *et al.,* 2016; DeLucia *et al.,* 2018). El HCV también es sensible a diferentes estatinas (Amemiya *et al.,* 2008; Kim *et al.,* 2007; Rao y Pandya, 2011).

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral son coherentes con los estudios previos en otros bunyavirus: la infección del BUNV se ha inhibido tanto a través de la depleción de colesterol utilizando MβCD, como mediante la inhibición de la síntesis endógena de colesterol con simvastatina. En particular, se obtuvieron valores de IC50 de 25,53 μM para la MβCD y de 5,77 mM para la simvastatina. El colesterol podría tener un papel clave en varios puntos del ciclo vital del BUNV. El efecto de la depleción del colesterol con MβCD era mayor para la condición de pretratamiento, lo que podría indicar la necesidad del colesterol en la superficie celular para se produzca la entrada del virus en la célula huésped; mientras que la simvastatina inhibía la infección cuando se añadía junto al inóculo viral pero no tenía efecto si se añadía a tiempos posteriores (3 o 6 hpi) ni en pretratamiento, lo que apuntaría a un efecto más tardío en la infección, probablemente durante la replicación o morfogénesis de la factoría viral.

2. Transporte de lípidos mediado por LTPs en los sitios de contacto entre membranas retículo-Golgi durante la infección por el BUNV

Con anterioridad al presente estudio, se había hipotetizado que los virus podrían influir sobre el flujo intracelular de lípidos a través de la modulación de determinadas proteínas transportadoras de lípidos o LTPs (Fernández de Castro y Risco, 2014; Fernández-Oliva *et al.,* 2019). En concreto, para este trabajo, se seleccionaron tres LTPs localizadas en el MCS entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi: OSBP, CERT y FAPP2, puesto que podrían suponer una alternativa rápida para el transporte de lípidos desde su lugar de síntesis, el retículo endoplásmico, hasta la factoría viral del BUNV, establecida a partir de las membranas del Golgi. Y se estudió el cargo lipídico que transportaban durante la infección por el BUNV.

Para la proteína CERT, el cargo lipídico principal y mayoritario que hemos identificado durante la infección por el BUNV ha sido el colesterol sulfato. Previamente, no se había descrito que este lípido pudiera ser transportado por la proteína CERT. Los principales lípidos identificados previamente como cargos de esta LTP habían sido las ceramidas de cadena larga y, minoritariamente, ceramidas-1-fosfato y PI4P (Chiapparino *et al.,* 2016). El colesterol sulfato es el esterol sulfato más abundante en humanos, y se sintetiza principalmente por la acción de la sulfotransferasa 2 (SULT2) a partir del colesterol (Javitt *et al.,* 2001). A nivel fisiológico tiene diferentes funciones: como componente de las membranas celulares tiene un papel estabilizador e inhibe la fusión de membranas; está implicado en la regulación de la actividad de las serinproteasas involucradas en la coagulación, fibrinolisis y adhesión; y también participa en la transducción de señales mediante la regulación de las quinasas PKC y PI3K (Diaz-Sanchez *et al.,* 2020). La adición de colesterol sulfato a cultivos celulares se ha visto que regula el metabolismo lipídico, inhibiendo la síntesis de colesterol por la HMGR, y estimulando la síntesis de ácidos grasos (Strott y Higashi, 2003). Además, se ha descrito que este lípido puede bloquear la fusión del virus Sendai a las membranas celulares (Cheetham, 1990) e inhibir la actividad de la helicasa NS3 del HCV (Furuta, 2014). No obstante, no se han obtenido datos suficientes para poder caracterizar el posible efecto positivo o negativo del colesterol sulfato sobre la infección por el BUNV. Sería necesario realizar una investigación en profundidad sobre la posible implicación de este lípido en la infección.

Con respecto a OSBP, el principal cargo lipídico encontrado tanto en células 293T control como en células infectadas por el BUNV fue el colesterol. En la bibliografía el colesterol ya se había descrito como uno de los cargos fundamentales de esta LTP junto con el PI4P. No obstante, durante la infección por el BUNV pudimos observar que la relación entre el colesterol transportado y la cantidad de proteína OSBP (relación Chol/Prot) se duplicaba. Este resultado podría indicar una sobre-activación de la función de OSBP, cuya función estaría derivada hacia el transporte de colesterol desde el RE al aparato de Golgi, favoreciendo el incremento de este lípido en el Golgi. Esto se corresponde con nuestros resultados previos de acumulación de colesterol en torno a las factorías virales. Apoyando la hipótesis del papel positivo de OSBP durante la infección, con nuestro modelo de sobreexpresión de OSBP inducible por tetraciclina pudimos observar que aumentaba la cantidad de proteína viral acumulada durante la infección en células que sobreexpresaban OSBP, así como el título viral intra y extracelular.

Adicionalmente, mediante microscopía óptica de fluorescencia, observamos un reclutamiento de OSBP hacia las factorías virales. Aunque se ha visto que OSBP es

importante durante la biogénesis de los orgánulos de replicación que se forman en la interfaz ER-Golgi de enterovirus, poliovirus y picornavirus (Arita, 2014; Dorobantu *et al.,* 2015; Nchoutmboube *et al.,* 2015), hasta la fecha no se había descrito que esta u otra LTP se localizara en el interior de las propias esférulas u orgánulos de replicación de ningún virus, como pudimos determinar para la infección por el BUNV mediante inmunomarcaje de criosecciones por el método Tokuyasu.

Una característica común de CERT y OSBP es que ambas se encuentran reguladas por la proteína quinasa D (PKD) de modo que, cuando se encuentran en su estado fosforilado, están inactivadas (Amako *et al.,* 2011). Por este motivo, el tratamiento con fármacos que inhiben la PKD de la célula huésped, como la molécula pequeña CRT0066101 (Harikumar *et al.,* 2010), podrían representar una estrategia antiviral eficaz frente al BUNV.

A pesar de que el abordaje metodológico para el estudio del cargo lipídico de las LTPs que hemos utilizado en este trabajo supone una gran evolución técnica, hemos visto que presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, se debe tener en cuenta que los principales lípidos que transportan OSBP y FAPP2 son el colesterol y los fosfatidilinositol-fosfatos, y estos compuestos no son detectables mediante los protocolos convencionales de análisis por espectrometría de masas, sino que requieren un paso previo de derivación química, y la puesta a punto de protocolos de detección por espectrometría de masas a los que solo tienen acceso unos pocos laboratorios especializados. Además, el protocolo experimental llevado a cabo y el análisis posterior son complejos a nivel técnico, y consumen mucho tiempo y recursos. Por este motivo, solo pudo introducirse una réplica experimental para cada muestra y sería necesario validar los resultados obtenidos con experimentos complementarios adicionales.

3. Estructura del *network* mitocondrial durante la infección por el BUNV

Muchos virus RNA movilizan las mitocondrias hacia las factorías virales desde el comienzo de la infección, siendo una característica extendida durante el ensamblaje de las factorías virales de diferentes virus RNA (Risco, 2014). Aunque el papel específico de las mitocondrias en las infecciones virales no se ha dilucidado por completo, se conoce que muchos virus interactúan con estos orgánulos en diferentes momentos del ciclo de replicación viral (Fernandez de Castro, 2021; Li *et al.,* 2021; Novoa, 2005a; Ren, 2020). Estudios previos de nuestro grupo de investigación habían descrito que la infección por el BUNV producía un reclutamiento de las mitocondrias en torno a la factoría viral en células BHK21 y Vero (Fontana *et al.,* 2008; García-Serradilla y Risco, 2021). No obstante, no se

había realizado un estudio pormenorizado y sistemático de las alteraciones a nivel estructural y funcional del *network* mitocondrial durante la infección por bunyavirus. En la Figura 61 se recoge un resumen de los cambios estructurales y funcionales encontrados durante la infección por el BUNV.

En este trabajo hemos descrito que el BUNV induce una alteración de la dinámica mitocondrial, haciendo que la homeostasis del *network* se desequilibre hacia la fisión. A nivel estructural, se produce una fragmentación significativa del *network* desde tiempos tempranos de infección, seguida de un reclutamiento y agregación de las mitocondrias en una zona yuxtanuclear, alrededor de las factorías virales.

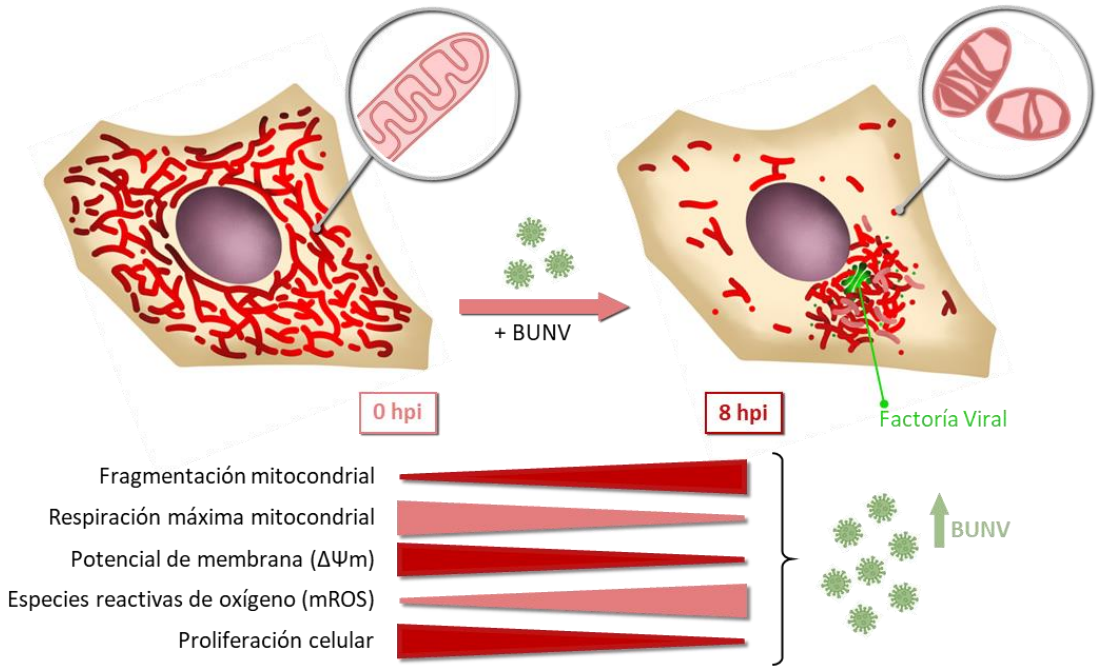


Figura 61. Esquema de los eventos que tienen lugar en el network mitocondrial durante la infección por el BUNV en células Vero. *A nivel estructural, la infección induce una fragmentación del network mitocondrial, reclutamiento de las mitocondrias en una región yuxtanuclear alrededor de las factorías virales y defectos en las crestas mitocondriales. Estos cambios se encuentran asociados a alteraciones funcionales: disminución de la capacidad de respiración mitocondrial, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, generación de mROS y reducción de la proliferación celular. Todo ello podría generar un ambiente intracelular que favorecería la replicación viral.*

En general, un *network* mitocondrial formado por mitocondrias elongadas, tubulares y altamente interconectadas se ha relacionado con un estado bioenergético activo (con altas tasas de consumo de oxígeno y producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa), y con una correcta función de la respuesta antiviral dependiente de mitocondrias, mientras que la fragmentación se asocia a procesos de reparación de daño mitocondrial, mitofagia e inducción de apoptosis (Khan *et al.*, 2015). El virus respiratorio sincitial (RSV), un virus con genoma (-)ssRNA no relacionado con los bunyavirus, produce una fragmentación del

network mitocondrial y un reclutamiento en la zona perinuclear (Hu *et al.,* 2019) similar al fenotipo observado durante la infección por BUNV.

Otros virus también inducen la fragmentación del network mitocondrial, como el HIV-1 (Avdoshina *et al.,* 2016) o el HCV (Kim *et al.,* 2014), que promueve la fisión mitocondrial como estrategia para inducir la mitofagia e inhibir la apoptosis. La proteína no estructural NSs se ha relacionado con la apoptosis de células infectadas por algunos Orthobunyavirus como el virus de la encefalitis de California y el virus de La Crosse (Elliot, 2014; Colón-Ramos et al., 2003; Vasudevan y Ryoo, 2015). No obstante, en otro estudio se determinó que la proteína NSs del BUNV cumplía una función opuesta; inhibía la apoptosis mediada por IRF3 y la señalización antiviral mediada por INF α/β (Kohl et al., 2003). En el presente trabajo, hemos visto que la fragmentación del *network* mitocondrial se produce desde tiempos tempranos de la infección (4 hpi). A este tiempo post-infección, no se observaron signos de apoptosis celular, por lo que la fisión mitocondrial no se encontraría directamente relacionada con una inducción de la apoptosis durante la infección por el BUNV. Además, no se ha reportado previamente en estudios del laboratorio o en la bibliografía que la infección por el BUNV induzca mitofagia

Mediante microscopía electrónica, se observaron una serie de cambios en la ultraestructura de las mitocondrias de células infectadas: el espacio intermembrana se tornaba más denso a los electrones, se pierde la periodicidad característica entre las crestas mitocondriales, y se observan zonas huecas en el interior de la matriz mitocondrial. Previamente, ya se habían reportado alteraciones morfológicas similares en patologías neurodegenerativas (Siegmund *et al.,* 2018), miopatías (Da Costa *et al.,* 2018) y durante la infección por el ZIKV (Garcez *et al.,* 2016). Estos cambios en la estructura de las crestas mitocondriales se han relacionado con una distribución incorrecta de la ATP sintasa y otras enzimas de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna (Siegmund *et al.,* 2018), que conlleva una disfunción a nivel bioenergético.

Precisamente en este estudio hemos descrito que la alteración de la estructura de las mitocondrias a consecuencia de la infección por el BUNV se encuentra acompañada de una pérdida de funcionalidad. Durante la infección por el BUNV, la tasa de consumo de oxígeno disminuye y se reduce la producción energética en forma ATP. Además, durante la infección por el BUNV se veían alterados dos parámetros frecuentemente estudiados como marcadores de función mitocondrial: se reducía el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), mientras que aumentaba la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS).

Muchos virus que tienen como diana las mitocondrias, alteran el metabolismo energético (Ren, 2020), y bloquean la respuesta antiviral asociada a mitocondrias mediada por las proteínas MAVS (Li, 2021). Precisamente, se ha visto que a través de la fusión mitocondrial se incrementan las interacciones de MAVS con las siguientes moléculas en la cascada de señalización, mientras que la fisión mitocondrial bloquea la señalización posterior de MAVS, reduciendo la respuesta por interferón (Castanier *et al.,* 2010). Habiendo descartado que durante la infección por el BUNV la fragmentación del *network* se encuentra relacionada con la apoptosis o la mitofagia, una posible hipótesis podría ser que la fisión mitocondrial obstaculiza el mecanismo de señalización antiviral asociado a las mitocondrias. La señalización antiviral mitocondrial se produce a través de mitofusinas que interactúan con MAVS para iniciar una inmunidad antiviral eficaz (Koshiba *et al.,* 2011). El bloqueo de las mitofusinas resulta en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm), y produce una respuesta inmunitaria antiviral defectuosa, lo que sugiere que la integridad mitocondrial es esencial para la inmunidad innata antiviral. De manera similar, el aumento de ΔΨm induce la apoptosis, mientras que la disminución de ΔΨm previene la apoptosis. Algunos virus, como el citomegalovirus humano (HCMV), disminuyen ΔΨm para prevenir la muerte celular y promover su replicación (Anand y Tikoo, 2013).

Ciertas proteínas no estructurales de los virus HCV, WNV, DENV y ZIKV, han sido descritas como las responsables de la modulación de la función mitocondrial durante la infección (Li *et al.,* 2005; Piccoli *et al.,* 2006; Ramanathan *et al.,* 2006; Aguirre *et al.,* 2017; Sun *et al.,* 2017; Yang *et al.,* 2020). En el caso del BUNV, la proteína no estructural NSs se había localizado previamente asociada a la membrana de mitocondrias en células Vero mediante inmunohistoquímica (García-Serradilla y Risco, 2021). Además, en el presente trabajo hemos mostrado que la infección de células Vero con el virus recombinante rBUN-delNSs no inducía cambios en la estructura general del *network* mitocondrial. La evidencia conjunta de ambos resultados apuntaría a que la proteína NSs podría estar implicada en la regulación de la dinámica mitocondrial y la inducción de la fragmentación del *network*, ya sea a través de la interacción directa con factores mitocondriales o de un mecanismo indirecto alternativo.

No obstante, sería necesario estudiar en mayor profundidad el papel de la proteína NSs en el control de la dinámica mitocondrial durante la infección. Por ejemplo, sería interesante expresar la proteína NSs en células Vero mediante transfección transitoria para correlacionar el posible efecto de esta proteína viral sobre la estructura del *network* mitocondrial.

4. Actividad antiviral de moléculas que inhiben OSBP o interfieren en la dinámica mitocondrial

4.1. La inhibición de OSBP con itraconazol y OSW-1 como estrategia antiviral

Durante la infección, habíamos observado un reclutamiento de la proteína OSBP en torno a las factorías virales del BUNV, junto con una acumulación de colesterol en las mismas regiones. La proteína OSBP es la principal LTP transportadora de colesterol desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi. Se estudió la inhibición de OSBP con itraconazol y OSW-1 como estrategia antiviral contra el BUNV, y se obtuvieron valores de IC50 de 31,19 μM y 2,62 nM, respectivamente. Además, observamos que el tratamiento con itraconazol y OSW-1 tenía un impacto mayor sobre la expresión de la proteína viral Gc que sobre la proteína N. Dado que la nucleoproteína N se sintetiza desde tiempos tempranos de infección, mientras que la glicoproteína de la envuelta Gc se sintetiza en una etapa más tardía. Los resultados de nuestro estudio son compatibles con la hipótesis de que tanto el itraconazol como la OSW-1 podrían inhibir la infección a un tiempo temprano de infección, ya que disminuyen más drásticamente la expresión de proteínas virales tardías. Sin embargo, lo harían posteriormente a la entrada del virus en la célula huésped, ya que no se observó que el pretratamiento con ambas drogas tuviera algún efecto sobre la infección. Por tanto, ambas drogas posiblemente bloquearían la etapa de replicación del BUNV y/o la biogénesis de las factorías virales.

Mientras que OSW-1 es una molécula de origen natural que se encuentra en fase de investigación preclínica, el itraconazol se encuentra aprobado para el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos, tanto de la piel y uñas como del tracto respiratorio. La concentración profiláctica en sangre del itraconazol es de 0,25 mg/L (0,35 μM), mientras que la concentración efectiva para el tratamiento de infecciones fúngicas es de 0,50 mg/L (0,70 μM). Además, a partir de una concentración de 1,0 mg/L (1,42 μM) se empieza a observar hepatotoxicidad (Zhang, 2018). Esta concentración es considerablemente inferior a la necesaria para inhibir la infección de bunyavirus. Por este motivo, la aplicación directa del itraconazol como antiviral en la práctica clínica real no sería viable. Dos posibles alternativas para su uso podrían ser el desarrollo de moléculas derivadas con menor toxicidad, o bien, incluir el itraconazol a dosis por debajo de la IC50, pero en combinación con otros fármacos antivirales. Esta última estrategia es especialmente interesante, ya que se ha observado que los tratamientos combinados suelen presentar sinergias entre los diferentes compuestos que forman la combinación, aumentando la eficacia y previniendo la aparición de cepas virales resistentes (Ianevski, 2020).

En los últimos años, se ha incrementado notablemente el estudio de la proteína OSBP como diana celular para inhibir la infección de un elevado número de virus, incluyendo diferentes especies del género *Enterovirus* (Albulescu *et al.,* 2015; Strating *et al.,* 2015; Baggen *et al.,* 2018), el HCV (Amako *et al.,* 2009; Amako *et al.,* 2011), el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (Dorobantu *et al.,* 2016), el DENV y el ZIKV (Meutiawati *et al.,* 2018) o el virus de la peste porcina africana o ASFV (Galindo *et al.,* 2019).

Aunque se ha descrito que la inhibición de la infección de enterovirus por itraconazol sucede por interacción directa con OSBP (Strating *et al.,* 2015; Bauer *et al.,* 2018), esta no es su única diana celular. También se ha reportado que el itraconazol es capaz de unirse a otros factores celulares como el receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF2 (Chong *et al.,* 2007; Nacev *et al.,* 2011), el canal selectivo de aniones dependiente de voltaje VDAC1, y la proteína transportara de lípidos NPC1 (Head *et al.,* 2017). Sin embargo, para OSW-1 la única diana celular descrita es OSBP (Roberts, 2019a). Respecto a su mecanismo de acción, también se han observado diferencias entre los dos compuestos. OSW-1 reduce los niveles de expresión de OSBP en más de un 90%, de forma estable y mantenida durante días (Burgett *et al.,* 2011), sin que esta reducción tenga un efecto en detrimento de la proliferación, viabilidad o morfología celulares (Roberts *et al.,* 2019a); mientras que el itraconazol no reduce los niveles de expresión de OSBP intracelular. Además, se ha determinado que OSW-1 es capaz de inhibir la unión de 25-hidroxicolesterol a OSBP, pero el itraconazol no produce este efecto (Roberts *et al.,* 2019b). Por este motivo, se ha hipotetizado que OSW-1 competiría por la unión al dominio de transporte de colesterol mientras que el itraconazol interaccionaría con OSBP a través de un dominio diferente. En este mismo estudio, también se describió un efecto distinto en la localización intracelular de OSBP tras el tratamiento con itraconazol u OSW-1.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las diferencias observadas en nuestro estudio con respecto a la localización de OSBP y el colesterol intracelular cuando tratamos los cultivos celulares con itraconazol o con OSW-1, podrían deberse a las diferencias descritas en cuanto al mecanismo de acción de ambas moléculas sobre OSBP o al efecto del itraconazol sobre otras dianas celulares secundarias.

Por último, cabe analizar la aparente contradicción observada cuando comparamos el efecto sobre la infección del BUNV que tiene la inhibición farmacológica de OSBP con itraconazol u OSW-1, y el bloqueo de OSBP utilizando siRNAs. Tanto el itraconazol como la OSW-1 habían demostrado una fuerte capacidad como antivirales contra el BUNV, mientras que el silenciamiento de OSBP a nivel citoplásmico post-transcripcional no tuvo efecto en la infección. Esto puede explicarse debido a que encontramos LTPs celulares que tienen una

función redundante. Es decir, a menudo nos encontramos diferentes LTPs que son capaces de transportar los mismos cargos lipídicos y desempeñar la misma función. En particular, encontramos 3 proteínas transportadoras de oxiesteroles asociadas al aparato de Golgi: OSBP, OSBPL9 y OSBPL11 (Chiapparino *et al.,* 2016). Mientras que el siRNA utilizado solo bloquea la traducción de OSBP debido al diseño de la secuencia de los dupletes de los siRNAs, el tratamiento con itraconazol y OSW-1 potencialmente sí podría inhibir las tres LTPs. Este hecho implicaría que exclusivamente el bloqueo de la proteína OSBP no sería suficiente para inhibir la infección del BUNV y que, en ausencia de OSBP, otra LTP relacionada (como pueden ser OSBPL9 y OSBPL11) podría suplir su función de transportar colesterol hacía las membranas del Golgi y las factorías virales.

4.2. El tratamiento con glucósidos cardíacos como estrategia antiviral

En resultados preliminares del laboratorio, habíamos observado que el tratamiento con digoxina tenía un efecto dramático sobre la morfología del *network* mitocondrial que podría interferir sobre la infección. Por este motivo, seleccionamos este compuesto y un derivado, el lanatósido C, para estudiar su capacidad para inhibir el BUNV. Ambas moléculas pertenecen a la familia terapéutica de los glucósidos cardíacos, y se encuentran aprobadas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y arritmias supraventriculares.

La infección del BUNV se inhibió en células Vero mediante el tratamiento con digoxina y lanatósido C, obteniéndose valores de IC50 de 78,34 nM y 102,08 nM, respectivamente. La capacidad antiviral de la digoxina se había descrito para la infección de otros virus RNA en cultivos celulares, observándose valores de IC50 similares al obtenido para el BUNV. Este es el caso de los virus CHIKV (IC50 = 67 nM; Ashbrook, 2016), HCV (IC50 = 36 nM; Kapoor, 2012), HIV-1 (IC50 = 45 nM; Laird, 2014; Wong, 2013) y SARS-CoV-2 (IC50 = 43 y 190 nM; Cho, 2020; Jeon, 2020). No obstante, la concentración terapéutica de la digoxina en sangre utilizada en clínica para el tratamiento de pacientes con enfermedad cardíaca se encuentra en el rango de 0,8-2,0 ng/ml (1,0-2,6 nM), considerándose tóxica una concentración por encima de 2,5 ng/ml (3,1 nM) (Pagana *et al.,* 2019). Al igual que sucedía con el itraconazol, debido a que la dosis tóxica de la digoxina es inferior al valor de IC50, no sería viable el uso directo de la digoxina como antiviral en la práctica clínica real. Aunque sí podría servir de base para el desarrollo de nuevas moléculas derivadas con menor toxicidad o incluirla en estrategias de terapia combinada, como se ha discutido previamente.

Mediante microscopía de fluorescencia, estudiamos la alteración estructural del *network* mitocondrial inducida por el tratamiento con digoxina independientemente de la infección, un efecto que no se había reportado anteriormente en la bibliografía. Además,

hemos visto que los cambios inducidos por digoxina son reversibles una vez que se retira la droga del medio de cultivo. Mediante microscopía electrónica en nuestro laboratorio también se había comprobado que la digoxina: (1) impide el ensamblaje de las esférulas de replicación y de las partículas virales del BUNV en el aparato de Golgi; y (2) evita la fragmentación característica de este orgánulo descrita para células Vero infectadas por el BUNV, lo que apuntaría a que la digoxina podría tener un efecto temprano en la infección, impidiendo el ensamblaje y morfogénesis de la factoría viral (Pacheco *et al.,* 2022)

La diana primaria de los glucósidos cardíacos es el dominio extracelular de la subunidad alfa de la bomba de sodio-potasio dependiente de ATP o Na^+/K^+-ATPasa, localizada en la membrana plasmática (Diederich *et al.,* 2017). Las mutaciones Q118R y N129D encontradas en la subunidad alfa de la Na^+/K^+-ATPasa de hámster (Figura 49) coinciden con mutaciones asociadas a la pérdida de sensibilidad a ouabaína descritas con anterioridad en otro estudio realizado en células de rata (Keenan *et al.,* 2005). Este hecho podría ser suficiente para explicar por qué las células BHK21 no son sensibles al tratamiento con digoxina, y por qué los glucósidos cardíacos no inhiben la infección en esta línea celular. Además, apoyaría la hipótesis de que el efecto antiviral contra BUNV de la digoxina y el lanatósido C no se debe a una interacción directa de las drogas con el propio virus o con estructuras virales, sino que la unión de los glucósidos cardíacos a la Na^+/K^+-ATPasa de la superficie celular se traduciría en la activación de mecanismos intracelulares que finalmente serían los responsables del bloqueo de la replicación del BUNV. Estudios previos han demostrado que la inhibición de la Na^+/K^+-ATPasa produce un incremento en la concentración de Na^+ en el citosol que, a su vez, se traduce en una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En presencia de digoxina, para regular la concentración citosólica de Na^+ se induce la activación del intercambiador de Na^+/Ca^{2+}, que bombea iones Na^+ al medio extracelular a costa de incrementar la concentración de Ca^{2+} en el citosol (Li *et al.,* 2014). El mecanismo de compensación a nivel celular consiste en la captación de Ca^{2+} por el RE y las mitocondrias. Debido al incremento en la concentración interna de Ca^{2+}, la función de la cadena de transporte de electrones y la producción de ATP mitocondrial se ven comprometidas (Liu *et al.,* 2011). Este efecto podría explicar las alteraciones estructurales que se observan en la red mitocondrial tras el tratamiento con digoxina, ya que el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular se ha relacionado con la remodelación reversible del *network* mitocondrial y con la presencia de alteraciones e hinchamiento de las crestas mitocondriales (Kaasik *et al.*, 2007; Shalbuyeva *et al.*, 2006).

Sumado a lo anterior, mediante microscopía confocal observamos que la polimerasa viral L y la nucleoproteína N formaban agregados en el citoplasma de células infectadas por

el BUNV y tratadas con digoxina (Figura 56). Estos agregados de N y L son independientes de la glicoproteína Gc, cuya localización no se altera con el tratamiento de digoxina. El patrón de localización de las proteínas virales L y N en grandes agregados en el citoplasma no se había descrito previamente durante la infección de células de mamífero por el BUNV, pero sí durante la infección de células del mosquito vector (López-Montero y Risco, 2011). En este trabajo se describió que la formación de estos agregados de proteínas virales o *N-bodies* en células de mosquito se encontraba asociada al establecimiento de una fase de latencia; y se propuso que a través de este mecanismo las células del mosquito vector quedaban protegidas de la infección. El tratamiento con digoxina podría estar activando una respuesta similar en células de mamífero, favoreciendo de algún modo la respuesta antiviral dependiente de mitocondrias, aunque deberían realizarse estudios adicionales para probar esta hipótesis.

4.3. Antivirales contra coronavirus

Debido a la situación de emergencia sanitaria a raíz de la aparición del nuevo coronavirus SARS-CoV-2, nos propusimos participar activamente en la búsqueda de nuevos tratamientos antivirales contra coronavirus. Utilizando como modelo de estudio la infección por el virus HCoV-229E en células MRC5, validamos las moléculas previamente estudiadas como antivirales contra el BUNV. Todas las moléculas: simvastatina, MβCD, itraconazol, OSW-1, digoxina, lanatósido C y Mdivi-1, demostraron capacidad de inhibir la infección del HCoV-229E en cultivos celulares. No obstante, los virus HCoV-229E y SARS-CoV2 son miembros de la familia *Coronaviridae* y, aunque comparten muchas características genéticas, morfológicas y funcionales, pertenecen a géneros distintos: *alpha* y *betacoronavirus*, respectivamente. Debido a las diferencias entre ambos géneros, los resultados de inhibición obtenidos con el virus HCoV-229E no debían ser extrapolados directamente al SARS-CoV-2.

La carrera en la búsqueda de nuevas terapias frente al SARS-CoV2 ha dado como resultado la publicación de numerosos trabajos de investigación, *screenings* masivos e incluso ensayos clínicos con el objetivo de desarrollar antivirales frente a coronavirus. En la actualidad, ya se han publicado datos de la capacidad inhibitoria del SARS-CoV-2 por itraconazol (Liesenborgh *et al.,* 2021; Van Damme *et al.,* 2021; Buyck et al., 2021) y por glucósidos cardíacos (Cho *et al.,* 2020; Ginex *et al*., 2021). Por este motivo, y habiendo descartado la simvastatina y la MβCD por tener valores IC50 cercanos a sus respectivas dosis tóxicas, propusimos la molécula OSW-1 como una buena candidata para ser estudiada como antiviral contra el SARS-CoV2.

Existen aproximaciones *in silico* que permiten estudiar las interacciones entre las estructuras de moléculas almacenadas en bases de datos y de proteínas virales o celulares, para identificar y seleccionar compuestos con potencial interés farmacológico. Estas estrategias de cálculo computacional y bioinformática han demostrado ser una herramienta de gran valor para realizar cribados masivos de moléculas antivirales (Morgnanesi *et al.,* 2015; Kirchmair *et al.,* 2011; Abdellatiif *et al.,* 2021). A través de una colaboración con el Dr. José Pedro Cerón Carrasco (Universidad Católica de Murcia), se llevó a cabo un análisis de acoplamiento e interacción molecular enfrentando la estructura molecular de OSW-1 con las estructuras de las diferentes proteínas del SARS-CoV-2 resueltas mediante cristalografía y en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*). Sorprendentemente, la molécula OSW-1 presentaba una elevada afinidad de unión a la proteasa del SARS-CoV2 (M_{pro}). Debido a este hallazgo, se cree que OSW-1 podría bloquear la infección del SARS-CoV2 actuando sobre dos dianas diferentes: por una parte, a nivel celular inhibiendo OSBP y el transporte de colesterol y, por otra parte, podría inhibir la proteína viral M_{pro} (Ceron *et al.,* 2022; *en preparación*).

Adicionalmente, gracias a nuestra colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Nuria Izquierdo del Instituto de Investigación IrsiCaixa (Barcelona), se ha demostrado que OSW-1 inhibe la replicación *in vitro* de diferentes variantes del SARS-CoV-2 con una eficacia similar a la ofrecida por el inhibidor control remdesivir (Ceron *et al.,* 2022; *en preparación*).

En resumen, las aproximaciones utilizadas en esta tesis doctoral han permitido abordar la biología celular de la infección por el BUNV desde diferentes perspectivas, permitiendo seleccionar un conjunto de moléculas que inhiben la infección en base a actuar sobre dianas celulares: el metabolismo y flujo del colesterol (simvastatina y MβCD); el bloqueo de la proteína transportadora de lípidos OSBP (itraconazol y OSW-1); y la alteración del *network* mitocondrial de una forma directa (mdivi-1) o a través de un mecanismo indirecto mediado por los iones Na^+ y Ca^{2+} (glucósidos cardíacos: digoxina y lanatósido C). Estas moléculas identificadas podrían abrir la puerta a futuros estudios en modelos animales y ensayos clínicos. Además, se han obtenido datos que constituyen un buen punto de partida para el análisis de nuevas rutas celulares implicadas en la infección del BUNV, y una lista de candidatos adicionales para ser estudiados como antivirales.

Este trabajo pone de manifiesto que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en las propias células huésped puede ser una estrategia potente tanto para el desarrollo de

nuevos antivirales, como para el reposicionamiento de fármacos originalmente aprobados para otras patologías. Además, gracias a que los mismos mecanismos celulares son comúnmente utilizados durante la infección de virus no relacionados entre sí, las moléculas propuestas podrían no solo inhibir la infección de bunyavirus, sino que también podrían actuar bloqueando el ciclo vital de otros virus emergentes y reemergentes. Esto podría traducirse en una traslación rápida a la práctica clínica real para combatir futuros brotes epidémicos y pandemias.

6

Conclusiones

1) La infección por el BUNV produce una alteración en la composición lipídica celular, que sugiere que las especies lipídicas desreguladas podrían cumplir un papel funcional durante la infección. En particular, se encuentran alteradas las rutas de síntesis de esfingolípidos y fosfatidilserina. Además, también se produce un incremento en la síntesis de colesterol desde tiempos tempranos de infección.

2) La composición lipídica de la envuelta de las partículas virales del BUNV destaca por su elevado porcentaje molar en colesterol (62%), mientras que el resto de los lípidos identificados en la envuelta viral han sido PC (21,4%), O-PC (7,5%), PS (4,8%), PE (1,4%), SM (2,8%) y HexCer (1,6%). Se trata de una composición característica que se diferencia de la composición descrita para las membranas del aparato de Golgi, orgánulo a partir del cual se establecen las factorías virales y en cuyas membranas se ensamblan los virus nacientes. El BUNV se replicaría y ensamblaría en dominios de membrana de tipo *lipid raft*, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos.

3) La interferencia sobre el flujo del colesterol celular ya sea a través de la inhibición de la síntesis *de novo* de este lípido con simvastatina, o bien mediante la depleción del colesterol de membranas con MβCD, son estrategias eficaces para bloquear la infección del BUNV en cultivos celulares.

4) Durante la infección por el BUNV, la proteína transportadora de lípidos OSBP se recluta a la zona de las factorías virales, habiéndose localizado en el interior de las esférulas de replicación. Asimismo, la sobreexpresión de OSBP favorece la acumulación de proteínas virales en el citoplasma e incrementa el título viral intra y extracelular. Además, la inhibición de OSBP con itraconazol o con OSW-1 bloquea la replicación viral.

5) La infección por el BUNV interfiere sobre la estructura y función del *network* mitocondrial de la célula huésped desde una etapa temprana de la infección. El BUNV induce la fragmentación del *network* mitocondrial, la agregación de las mitocondrias en una región yuxtanuclear alrededor de las factorías virales, y una alteración morfológica de la ultraestructura de las crestas mitocondriales. Estos cambios conllevan una alteración de la función bioenergética asociada a una disminución en el consumo de oxígeno, la producción de ATP y el potencial de membrana mitocondrial, mientras que se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

6) Los glucósidos cardíacos digoxina y lanatósido C inducen reversiblemente la fragmentación del *network* mitocondrial y posterior agregación en una región yuxtanuclear. Ambos compuestos inhiben la infección del BUNV en células Vero a través de la inhibición de la bomba sodio-potasio. Además, la digoxina induce la formación de grandes agregados de las proteínas virales N y L en el citosol, que recuerdan a los N-*bodies* descritos durante la fase de latencia de la infección del BUNV en células de mosquito.

7) La molécula pequeña Mdivi-1 inhibe la infección del BUNV en células Vero. Independientemente de su efecto como inhibidor de la división mitocondrial, el tratamiento con Mdivi-1 en células Vero produce una fragmentación del aparato de Golgi que también podría contribuir al bloqueo de la infección.

8) La interferencia sobre el metabolismo y flujo de colesterol con simvastatina o MβCD, la inhibición de OSBP con itraconazol u OSW-1, la inhibición de la división mitocondrial con Mdivi-1 y el tratamiento con glucósidos cardíacos también han demostrado ser eficaces para bloquear la infección en cultivos celulares del coronavirus humano HCoV-229E, un virus RNA no relacionado con bunyavirus,

9) El estudio de los factores y mecanismos celulares que intervienen en la infección viral es una potente estrategia para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de antivirales de amplio espectro.

Bibliografía

Abdellatiif, M., Ali, A. y Hussien, M. (2021). Computational studies by molecular docking of some antiviral drugs with COVID-19 receptors are an approach to medication for COVID-19. *Open Chemistry,* **19(1):**245-264. doi:10.1515/chem-2021-0024.

Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, MT., Maestre, AM., Patel, J., Lamothe, F., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat. Microbiol.,* **2:**17037. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.37.

Aitken, TH., Tesh, RB., Beaty, BJ. y Rosen, L. (1979). Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (Aedes aegypti). *Am J Trop Med Hyg,* **28(1):**119-121.

Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Nishijima M., Hanada K., Matsuura Y., Lai MM., Miyamura T., Wakita T. y Suzuki T. (2008). *J. Virol.* **82:**5715–5724.

Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Suzuki, T. (2008). Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, **82:** 5715–5724. https://doi.org/10.1128/JVI.02530-07.

Akira, S., Uematsu, S. y Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell,* **124:**783–801.

Aktepe, TE., Pham, H. y Mackenzie, JM. (2015). Differential utilisation of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology*, **484:** 241–250. doi: 10.1016/j. virol.2015.06.015.

Albulescu, L., Bigay, J., Biswas, B., Weber-Boyvat, M., Dorobantu, CM., Delang, L., Strating, JRPM. (2017). Uncovering oxysterol- binding protein (OSBP) as a target of the anti-enteroviral compound TTP-8307. *Antiviral Research,* **140:** 37–44. doi: 10.1016/j. antiviral.2017.01.008

Albulescu, L., Strating, JRPM., Thibaut, HJ., van der Linden, L., Shair, MD., Neyts, J., y van Kuppeveld, FJM. (2015). Broad-Range Inhibition of Enterovirus Replication by OSW-1, a Natural Compound Targeting OSBP. *Antiviral Res.,* **117:**110–114. doi: 10.1016/j. antiviral.2015.02.013.

Ali, A., Avalos, RT., Ponimaskin, E., y Nayak, DP. (2000). Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.*, **74:**8709-8719.

Altan-Bonnet, N. (2017). Lipid tales of viral replication and transmission. *Trends in Cell Biology*, **27:**201–213. doi.: 10.1016/j.tcb.2016.09.011.

Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., y Siddiqui, A. (2009). Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.,* **83(18):**9237–9246.

Amako, Y., Syed, GH., y Siddiqui, A. (2011). Protein Kinase D Negatively Regulates Hepatitis C Virus Secretion through Phosphorylation of Oxysterol-Binding Protein and Ceramide Transfer Protein*. J. Biol. Chem.,* **286(13):**11265-11274.

Amara, A. y Mercer, J. (2015). Viral apoptotic mimicry. Nature Reviews. *Microbiology,* **13:** 461–469. doi:10.1038/nrmicro3469.

Amemiya, F., Maekawa, S., Itakura, Y., Kanayama, A., Matsui, A., Takano, S., Enomoto, N. (2008). Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases,* **197(3):** 361–370. doi: 10.1086/525287.

Anand S.K., y Tikoo S.K. (2013). Viruses as modulators of mitochondrial functions. *Adv. Virol.*, **2013:**738794.

Arita, M. (2014). Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol- binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus- induced membrane structure. *Microbiology and Immunology,* **58:** 239–256. doi: 10.1111/1348-0421.12144.

Arita, M., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Wakita, T. y Shimizu, H. (2011). Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *Journal of Virology,* **85:** 2364–2372. doi: 10.1128/JVI.02249-10.

Assefa, Y., Gilks, CF., Reid, S. *et al*. (2012). Analysis of the COVID-19 pandemic: lessons towards a more effective response to public health emergencies. *Global Health*, **18:** 10. doi: 10.1186/s12992-022-00805-9.

Avdoshina, V., Fields, JA., Castellano, P., Dedoni, S., Palchik, G., Trejo, M., *et al.* (2016). The HIV protein gp120 alters mitochondrial dynamics in neurons. *Neurotox. Res.*, **29:** 583–593. doi: 10.1007/s12640-016-9608-6.

Baggen, J., Thibaut, HJ., Strating, JRPM., y van Kuppeveld, FJM. (2018). The Life Cycle of Non-Polio Enteroviruses and How to Target It. *Nat. Rev. Microbiol.,* **16(6):**368–381.

Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, AL. y Medin, CL. (2017). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology,* **500:**149–160. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.022.

Barnwal, B., Karlberg, H., Mirazimi, A. y Tan, YJ. (2016). The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **291(2):**582-592.

Barry, G., Varela, M., Ratinier, M., Blomstrom, AL., Caporale, M., Seehusen, F., Hahn, K., Schnettler, E., Baumgartner, W., Kohl, A. y Palmarini, M. (2014). NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery*. J. Gen. Virol.,* **95(Pt 8):**1640-1646.

Bauer, L., Ferla, S., Head, SA., Bhat, S., Pasunooti, KK., Shi, WQ., Albulescu, L., Liu, JO., Brancale, A., van Kuppeveld, FJM. Y Starting, JRPM. (2018). Structure-Activity Relationship Study of Itraconazole, a Broad-Range Inhibitor of Picornavirus Replication That Targets Oxysterol-Binding Protein (OSBP). *Antiviral Res.,* **156:**55–63.

Beaty, BJ. y Bishop, DH. (1988). Bunyavirus-vector interactions. *Virus Research,* **10(4):**289-301.

Berg, JM., Tymoczko, JL. y Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5th edition. New York. Freeman, WH. Section 26.2: Cholesterol Is Synthesized from Acetyl Coenzyme A in Three Stages. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22350/

Birge, RB., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death and Differentiation*, **23:** 962–978. doi: 10.1038/cdd. 2016.11.

Bishe, B., Syed, G. y Siddiqui, A. (2012). Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses,* **4:** 2340–2358. doi: 10.3390/ v4102340.

Blakqori, G., van Knippenberg, I., y Elliot RM. (2009). Bunyamwera Orthobunyavirus S-Segment Untranslated Regions Mediate Poly(A) Tail-Independent Translation. *J. Virol.* **83(8):** 3637-3646.

Blanchette-Mackie, EJ. y Pentchev, PG. (1998) en Intracellular Cholesterol Trafficking (Eds: Chang, TY., y Freeman, DH.) pp. 53–73, Kluwer Academic Publishers, Boston.

Blitvich, BJ., Beaty, BJ., Blair, CD., Brault, AC., Dobler, G., Drebot, MA., Haddow, AD., Kramer, LD., LaBeaud, AD., Monath, TP., Mossel, EC., Plante, K., Powers, AM., Tesh, RB., Turell, MJ., Vasilakis, N. y Weaver, SC. (2018). Bunyavirus Taxonomy: Limitations and Misconceptions Associated with the Current ICTV Criteria Used for Species Demarcation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* **99(1):** 11-16.

Bowden, TA., Bitto, D., McLees, A., Yeromonahos, C., Elliott, RM. *et al.* (2013) Orthobunyavirus Ultrastructure and the Curious Tripodal Glycoprotein Spike. *PLOS Pathogens,* **9(5):** e1003374. doi: 10.1371/journal.ppat.1003374.

Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, JK. y Elliott, RM. (2001). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **98:**664–669.

Brillo, V., Chieregato, L., Leanza, L., Muccioli, S. y Costa, R. (2021). Mitochondrial Dynamics, ROS, and Cell Signaling: A Blended Overview. *Life,* **11:**332. doi: 10.3390/ life11040332.

Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, FT. y Kräusslich, HG. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103(8):** 2641-6.

Bruss, V. (2004). Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.,* **106(2):**199-209. doi:10.1016/j.virusres.2004.08.016.

Bryan-Marrugo, OL., Arellanos-Soto, D., Rojas-Martinez, A., Barrera- Saldana, H., Ramos-Jimenez, J., Vidaltamayo, R. y Rivas-Estilla, AM. (2016). The antidengue virus properties of statins may be associated with alterations in the cellular antiviral profile expression. *Molecular Medicine Reports,* **14:** 2155–2163. doi: 10.3892/ mmr. 2016.5519.

Burgett, AW., Poulsen, TB., Wangkanont, K., Anderson, DR., Kikuchi, C., Shimada, K., Okubo, S., Fortner, KC., Mimaki, Y., Kuroda, M., Murphy, JP., Schwalb, DJ., Petrella, EC., Cornella-Taracido, I., Schirle, M., Tallarico, JA. y Shair, MD. (2011). Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat. Chem. Biol.,* **7(9):** 639-647.

Burt, FJ, Rolph, MS., Rulli, NE., Mahalingam, S. y Heise, MT. (2012). Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*, **379(9816):**662-671.

Burté, F., Carelli, V., Chinnery, PF. y Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.*, **11(1):**11-24. doi: 10.1038/nrneurol.2014.228.

Buyck, C., Neyts, J., Van Loock, M. (2021). In vitro activity on itraconazole against SARS-CoV-2. Journal of Medical Virology, 93(7):4454-4460.

Carette, JE., Raaben, M., Wong, AC., Herbert, AS., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Brummelkamp, T. R. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature,* **477:** 340–343. doi: 10.1038/nature10348.

Carlson, CJ., Dougherty, ER. y Getz, W. (2016). An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis,* **10(8):**e0004968.

Castanho, MARB., Coutinho, A., y Prieto, MJE. (1992). Absorption and Fluorescence Spectra of Polyene Antibiotics in the Presence of Cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry,* **267(1):** 204-209.

Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A. y Arnoult, D. (2010). Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep.*, **11:**133–138.

Castorena, KM., Stapleford, KA. y Miller, DJ. (2010). Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured Drosophila cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication*. BMC Genomics,* **11:**183. doi:10.1186/1471-2164-11-183.

Cenciarelli, O., Pietropaoli, S., Malizia, A., Carestia, M., D'Amico, F., Sassolini, A. *et al.* (2015). Ebola virus disease 2013-2014 outbreak in West Africa: an analysis of the epidemic spread and response. *Int J Microbiol.* **2015:** 769121. doi: 10.1155/2015/769121.

Cerón, JP., Raich, D., Tenorio; R., Fernández de Castro, I., Sachse, M., Pérez-Zsolt, D., Ortega, P., Fernández-Oliva, A., Muñoz-Basagoiti, J., Izquierdo-Useros, N., y Risco, C. (2022). Identification of four repurposed drugs as potent inhibitors of SARS-CoV-2. *[En preparación].*

Chan, DC. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.*, **46:**265–287.

Chan, R., Uchil, PD., Jin, J., Shui, G., Ott, DE., Mothes, W. y Wenk, MR. (2008). Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol.,* **82(22):**11228-38.

Charlton, FW., Hover, S., Fuller, J., Hewson, R., Fontana, J., Barr, JN. y Mankouri, J. (2019). Cellular cholesterol abundance regulates potassium accumulation within endosomes and is an important determinant in bunyavirus entry. *J Biol Chem.*, **294(18):**7335-7347. doi: 10.1074/jbc.RA119.007618.

Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, CJ., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A. y Bartenschlager, R. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe*, **20(3):**342–356. doi: 10.1016/j.chom. 2016.07.008.

Chen, H. y Chan, DC. (2009). Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.*, **18:**169–176.

Chen, H., Detmer, SA., Ewald, AJ., Griffin, EE., Fraser, SE. y Chan DC. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.*, **160:**189–200.

Cheetham, JJ., Epand, RM., Andrews, M., y Flanagan, TD. (1990). Cholesterol sulfate inhibits the fusion of Sendai virus to biological and model membranes. *Journal of Biological Chemistry,* **265(21):**12404-12409. doi: 10.1016/S0021-9258(19)38361-9.

Chiapparino, A., Maedaa, K., Turei, D., Saez-Rodriguez, J., Gavin, AC. (2016). The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling. *Progress in Lipid Research,* **61:** 30-39.

Cho, J., Lee, Y.J., Kim, J., Kim, S., Kim, SS., Choi, BS. y Choi, JH. (2020). Antiviral activity of digoxin and ouabain against SARS-CoV-2 infection and its implication for COVID-19. *Sci. Rep.,* **10:**e16200.

Chong, CR., Xu, J., Lu, J., Bhat, S., Sullivan, DJ. y Liu, JO. (2007). Inhibition of Angiogenesis by the Antifungal Drug Itraconazole. *ACS Chem. Biol.,* **2(4):**263–270.

Chowell, G., Echevarría-Zuno, S., Viboud, C., Simonsen, L., Tamerius, J., Miller, MA., *et al.* (2011). Characterizing the epidemiology of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in Mexico. *PLoS Med,* **8:** e1000436. doi: 10.1371/journal.pmed.1000436.

Church, DL. (2004). Major factors affecting the emergence and re-emergence of infectious diseases. *Clin Lab Med*, **24:** 559–86. doi: 10.1016/j.cll.2004.05.008.

Churchward, AM., Brandman, DM., Rogasevskaia, T., Coorssen, JR. (2008). Copper (II) sulfate charring for high sensitivity on-plate fluorescent detection of lipids and sterols: quantitative analyses on the composition of functional secretory vesicles. *J Chem Biol.,* **1:** 79-87.

Cifuentes-Munoz, N., Salazar-Quiroz, N. y Tischler, ND. (2014). Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses*, **6(4):**1801-1822.

Colón-Ramos, DA., Irusta, PM., Gan, EC., Olson, MR., Song, J., Morimoto, RI., Elliott, RM., Lombard, M., Hollingsworth, R., Hardwick, JM., Smith, GK. y Kornbluth, S. (2003). Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol. Biol. Cell.,* **14(10):**4162-72.

Da Costa, RM., Karmirian, K. y Rehen, SK. (2018). Deformation of Mitochondrial Cristae in Human Neural Progenitor Cells Exposed to Valproic Acid. *Annals of the Brazilian Academy*, **90(2):** 2223-2232.

DeLucia, DC., Rinaldo, CR. y Rappocciolo, G. (2018). Inefficient HIV-1 trans infection of CD4+ T cells by macrophages from HIV-1 nonprogressors is associated with altered membrane cholesterol and DC-SIGN. *Journal of Virology,* **92.** doi: 10.1128/ JVI.00092- 18.

Deng, Y., Almsherqi, ZA., Ng, MM. y Kohlwein, SD. (2010). Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends in Cell Biology,* **20:** 371–379.

Diaz-Sanchez, L., Pontini, L., Marinozzi, M., Sanchez-Aranguren, LC., Reis, A. y Días, IHK. (2020). Cholesterol and oxysterol sulfates: Pathophysiological roles and analytical challenges. *British Journal of Pharmacology*, **178(16):**3327-3341. doi: 10.1111/ bph.15227.

Diederich, M., Muller, F. y Cerella, C. (2017). Cardiac glycosides: from molecular targets to immunogenic cell death. *Biochemical Pharmacology*, **125:** 1–11.

Dorobantu, CM., Albulescu, L., Harak, C., Feng, Q., van Kampen, M., Strating, JRPM., Gorbalenya, AE., Lohmann, V., van der Schaar, HM., y van Kuppeveld, FJM. (2015). Modulation of the Host Lipid Landscape to Promote RNA Virus Replication: The Picornavirus Encephalomyocarditis Virus Converges on the Pathway Used by Hepatitis C Virus. *PLOS Pathog.,* **11(9):**e1005185. doi: 10.1371/journal.ppat. 1005185.

Dorobantu, CM., Albulescu, L., Lyoo, H., van Kampen, M., De Francesco, R., Lohmann, V., Harak, C., van der Schaar, HM., Strating, JRPM., Gorbalenya, AE. *et al.* (2016). Mutations in Encephalomyocarditis Virus 3A Protein Uncouple the Dependency of Genome Replication on Host Factors Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIα and Oxysterol Binding Protein. *mSpher,* **1(3):** e00068-16.

Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, HR., Becker, S., *et al.* (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.*, **348:** 1967–76. doi: 10.1056/NEJMoa030747.

Dykstra, ML., Longnecker, R., y Pierce, SK. (2001). Epstein-Barr virus co-opts lipid rafts to block the signalling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity.* **14:**57-67.

Eifan, SA. y Elliott, RM. (2009). Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J Virol,* **83(21):** 11307-11317.

Elgner, F., Ren, H., Medvedev, R., Ploen, D., Himmelsbach, K., Boller, K. y Hildt, E. (2016). The intracellular cholesterol transport inhibitor U18666A inhibits the exosome-dependent release of mature hepatitis C virus. *Journal of Virology,* **90(24):** 11181–11196. doi: 10.1128/JVI.01053-16.

Elliott, RM. (1990). Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol,* **71(3):**501522.

Elliott, RM. (2014). Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol.,* **12(10):**673-85.

Elliott, RM. y Blakqori G. (2011). Molecular biology of Orthobunyaviruses. En Bunyaviridae, molecular and cellular biology. Plyusnin A, Elliott RM., eds. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido. 1-40.

Empig, CJ. y Goldsmith, MA. (2002). Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J. Virol.,* **76:**5266-5270.

Fan, Y., Sanyal, S. y Bruzzone, R. (2018). Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle. *Front Cell Infect Microbiol*, **8:** 396.

Fernandez de Castro I. y Risco, C. (2014). Imaging RNA virus replication assemblies: bunyaviruses and reoviruses. *Future Virology,* **9(12):**1089-1104.

Fernandez de Castro, I., Tenorio, R. y Risco, C. (2016). Virus assembly factories in a lipid world. *Curr. Op. Virol.,* **18:**20-26. doi: 10.1016/j.coviro.2016.02.009.

Fernández de Castro, I., Tenorio, R., Risco, C. (2021). Virus Factories. In: Bamford, D.H. and Zuckerman, M. (eds.) Encyclopedia of Virology, 4th Edition, vol. 1, pp. 495–500. Oxford: Academic Press.

Fernández-Oliva, A., Ortega-González, P., y Risco, C. (2019). Targeting host lipid flows: Exploring new antiviral and antibiotic strategies. *Cellular microbiology*, **21(3):** e12996. doi:10.1111/cmi.12996.

Folch, J., Lees, M., Stanley, GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem,* **1:** 497–509.

Fontana, J., Lopez-Montero, N., Elliott, RN, Fernandez, JJ., y Risco, C. (2008). The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol*, **10(10):** 2012-2028.

Friedman, JR., Lackner, LL., West, M., DiBenedetto, JR., Nunnari, J. y Voeltz, GK. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science,* **334:**358–362.

Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography – A review of the current state. *Journal of Chromatography,* **1218(19):** 2754-2774.

Furuta, A., Salam, KA., Akimitsu, N., Tanaka, J., Tani, H., Yamashita, A., Moriishi, K., Nakakoshi, M., Tsubuki, M., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S., y Noda, N. (2014). Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase*. J Enzyme Inhib Med Chem.* **29(2):**223-9. doi: 10.3109/14756366.2013.766607.

Futerman, AH. y Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.*, **15:**312–318.

Galindo, I., Cuesta-Geijo, MA., Del Puerto, A., Soriano, E., y Alonso, C. (2019). Lipid Exchange Factors at Membrane Contact Sites in African Swine Fever Virus Infection. *Viruses,* **11(3):**199. doi: 10.3390/v11030199.

Garcez, PP., Loiola, EC., Madeiro da Costa, R., Higa, LM., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, JM., Brindeiro, R., Tanuri, A. y Rehen, SK. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. Science, **352:**816–818. doi: 10.1126/science.aaf6116

García-Serradilla, M. y Risco, C. (2021). Light and electron microscopy imaging unveils new aspects of the antiviral capacity of silver nanoparticles in bunyavirus-infected cells. *Virus Research*, **302:** 198444. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198444.

Garcia-Serradilla, M., Risco, C. y Pacheco, B. (2019). Drug repurposing for new, efficient, broad-spectrum antivirals. *Virus Res.,* **264:**22-31.

Geraghty, RJ., Aliota, MT. y Bonnac. L.F., (2021). Broad-spectrum antiviral strategies and nucleoside analogues. *Viruses*, **13:**667.

Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C. y Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,* **21:**204–224. doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.

Gilbert, JM. y Benjamin, TL. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.*, **74:**8582-8588.

Gilkerson, RW., Selker, JML. y Capaldi, RA. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.,* **546(2-3):** 355–358. doi: 10.1016/s00145793(03)00633-1.

Ginex, T., Garaigorta, U., Ramírez, D., Castro, V., Nozal, V., Maestro, I., García-Cárceles, J., Campillo, NE., Martinez, A., Gastaminza, P., y Gil, C. (2021). Host-Directed FDA-Approved Drugs with Antiviral Activity against SARS-CoV-2 Identified by Hierarchical *In Silico/In Vitro* Screening Methods. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland),* **14(4):**332.

Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, DR., Kular, GS., *et al.* (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nature Cell Biology*, **6:**393–404.

Gottlieb, E., Armour, SM., Harris, MH. y Thompson, CB. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ,* **10(6):**709-17.

Gratz, NG. (2004). Critical review of the vector status of Aedes albopictus. *Med Vet Entomol,* **18(3):**215-227.

Gullberg, RC., Steel, JJ., Pujari, V., Rovnak, J., Crick, DC. y Perera, R. (2018). Stearoly-CoA desaturase 1 differentiates early and advanced dengue virus infections and determines virus particle infectivity. *PLoS Pathogens,* **14(8):** e1007261. doi: 10.1371/journal.ppat.1007261.

Hafiz, MY., Mahmood, SU., Shoaib, M. y Yusuf, FH. (2016). Concern over Zika virus outbreak: another alarming global threat. *Infect Drug Resist,* **9:**149–151.

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. y Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature,* **426:** 803–809. doi: 10.1038/ nature02188.

Hannun, YA. y Obeid, LM. (2008). Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9:** 139–5.

Harikumar, KB., Kunnumakkara, AB., Ochi, N., Tong, Z., Deorukhkar, A., Sung, B., Guha, S. (2010). A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, **9:** 1136–1146. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1145.

Head, SA., Shi, WQ., Yang, EJ., Nacev, BA., Hong, SY., Pasunooti, KK., Li, RJ., Shim, JS. y Liu, JO. (2017). Simultaneous Targeting of NPC1 and VDAC1 by Itraconazole Leads to Synergistic Inhibition of MTOR Signaling and Angiogenesis. *ACS Chem. Biol.,* **12(1):**174–182.

Heffernan, C. (2018). Climate change and multiple emerging infectious diseases. *Vet J.* **234:** 43–7. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.021.

Herrmann, JM. y Riemer, J. (2010). The Intermembrane Space of Mitochondria. *Antioxid. Redox Signaling,* **13(9):** 1341–1358. doi: 10.1089/ars.2009.3063.

Holthuis, JC. y Menon, AK. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, **510(7503):**48-57. doi: 10.1038/nature13474.

Hong, Y., Bai, M., Qi, X., Li, C., Liang, M., Li, D., Cardona, CJ. y Xing, Z. (2019). Suppression of the IFN-α and -β Induction through Sequestering IRF7 into Viral Inclusion Bodies by Nonstructural Protein NSs in Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus Infection. *The Journal of Immunology*, **202(3):**841-856.

Howard, CR. y and Fletcher, NF. (2012). Emerging virus diseases: can we ever expect the unexpected? *Emerging microbes & infections*, **1(12):**e46.

Hsu, NY., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, YH., Takvorian, PM., Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell,* **141:**799–811. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.050.

Hu, M., Schulze, KE., Ghildyal, R., Henstridge, DC., Kolanowski, JL., New, EJ., Hong, Y., Hsu, A. C., Hansbro, PM., Wark, PA., Bogoyevitch, MA. y Jans, DA. (2019). Respiratory syncytial virus co-opts host mitochondrial function to favour infectious virus production. *eLife,* **8:**e42448. doi:10.7554/eLife.42448.

Ilnytska, O., Santiana, M., Hsu, NY., Du, WL., Chen, YH., Viktorova, EG., *et al.* (2013). Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. *Cell Host & Microbe*, **14:**281–293. doi:10.1016/j. chom.2013.08.002.

Ioannou, YA. (2000). The structure and function of the Niemann–Pick C1 protein. *Molecular Genetics and Metabolism,* **71:** 175–181. doi: 10.1006/mgme.2000.3061.

Ivanova, P. T., Myers, D. S., Milne, S. B., McClaren, J. L., Thomas, P. G., & Brown, H. A. (2015). Lipid composition of viral envelope of three strains of influenza virus - not all viruses are created equal. *ACS infectious diseases*, **1(9):**399–452.

Jacquemyn, J., Cascalho, A., y Goodchild, RE. (2017). The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO reports,* **18(11):**1905–1921. doi:10.15252/embr.201643426.

Jansen, CC. y Beebe, NW. (2010). The dengue vector Aedes aegypti: what comes next. *Microbes Infect,* **12(4):** 272-279.

Javitt, NB., Lee, YC., Shimizu, C., Funda, H. y Strott, CA. (2001). Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferasas: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology*, **142:** 2978-2984.

Jin, H. y Elliott, RM. (1993). Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol,* **67(3):**1396-1404.

Kaasik, A., Safiulina, D., Zharkovsky, A., y Veksler, K. (2007). Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am. J. Cell Physiol.,* **292(1)**: C157-63.

Kafetzopoulou, LE., Pullan, ST., Lemey, P., Suchard, MA., Ehichioya, DU., Pahlmann, M. *et al.* (2019). Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*, **363:** 74–7. doi: 10.1126/science.aau9343.

Kalvodova, L., Sampaio, JL., Cordo, S., Ejsing, CS., Shevchenko, A. y Simons, K. (2009). The lipidomes of vesicular stomatitis virus, Semliki Forest virus, and the host plasma membrane analysed by quantitative shotgun mass spectrometry. *J. Virol.*, **83(16):**7996-8003.

Kang, J., Park, S., Lee, P. y Ahn, B. (1999). Apoptosis Is Induced by Hantaviruses in Cultured Cells. *Virology*, **264:**99-105. doi: 10.1006/viro.1999.9896.

Kapadia, SB., Barth, H., Baumert, T., McKeating, JA. y Chisari, FV. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type. *Journal of Virology*, **81(1):** 374-383. doi: 10.1128/JVI.01134-06.

Karber, G. (1931). Beitrag zar Kollktiven Behandlung Pharmakologischer Reiherersuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol,* **162:** 480–483.

Keenan, SM., DeLisle, RK., Welsh, WJ., Paula, S., Ball, WJJr. (2005). Elucidation of the Na^+, K^+-ATPase digitalis binding site. *Journal of Molecular Graphics and Modelling,* **23(6):** 465-475.

Khan, I., Katikaneni, DS., Han, Q., Sanchez-Felipe, L., Hanada, K., Ambrose, RL., Konan, KV. (2014). Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *Journal of Virology,* **88:** 12276–12295. doi: 10.1128/JVI.00970-14.

Khan, M., Syed, G. H., Kim, S. J., Siddiqui, A. (2015). Mitochondrial dynamics and viral infections: A close nexus. *Biochimica et biophysica acta*, **1853(10B):** 2822–2833. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.040.

Kim, SJ., Syed, GH., Khan, M., Chiu, WW., Sohail, MA., Gish, RG. *et al.* (2014). Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111(17):** 6413–6418. doi:10.1073/pnas. 1321114111.

Kim, SS., Peng, LF., Lin, W., Choe, WH., Sakamoto, N., Schreiber, SL. y Chung, RT. (2007). A cell-based, high-throughtput screen for small molecule regulators of hepatits C virus. *Gastroenterology,* **132(1):** 311–320. doi:10.1053/j.gastro.2006.10.032.

Kirchmair, J., Distinto, S., Liedl, KR., Markt, P., Rollinger, JM., Schuster, D., Spitzer, GM. y Wolber, G. (2011). Development of anti-viral agents using molecular modeling and

virtual screening techniques. *Infect Disord Drug Targets.*, **11(1):** 64-93. doi: 10.2174/187152611794407782.

Kleinfelter LM, Jangra RK, Jae LT, Herbert AS, Mittler E, Stiles KM, Wirchnianski AS, Kielian M, Brummelkamp TR, Dye JM, Chandran K. (2015). Haploid Genetic Screen Reveals a Profound and Direct Dependence on Cholesterol for Hantavirus Membrane Fusion. *mBio.,* **6(4):**e00801.

Kluge, MA., Fetterman, JL. y Vita, JA. (2013). Mitochondria and Endothelial Function. *Circ. Res.* **112 (8):**1171–1188. doi: 10.1161/circresaha.111.300233.

Kohl, A., Clayton, RF., Weber, F., Bridgen, A., Randall, RE. y Elliott, RM. (2003). Bunyamwera virus non-structural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J. Virol.,* **77(14):**7999-8008.

Koshiba T., Yasukawa K., Yanagi Y., y Kawabata S. (2011). Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci. Signal.* **4:**ra7.

Kraemer, MUG, Reiner, RC. Jr., Brady, OJ., Messina, JP., Gilbert, M., Pigott, DM., Yi, D., Johnson, K. *et al.* (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Aedes albopictus*. Nat Microbiol,* **4(5):** 854-863.

Lambert, F., Jacomy, H., Marceau, G., Talbot, PJ. (2008). Titration of human coronaviruses, HcoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol Biol*. **454:** 93-102.

Lappin, DF., Nakitare, GW., Palfreyman, JW., y Elliott, RM. (1994). Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J. Gen. Virol.* **75(12):** 3441-3451.

Leonard, VH., A. Kohl, A., Hart, TJ. y Elliott, RM. (2006). Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J Virol,* **80(19):**9667-9675.

Leventhal, S. S., Wilson, D., Feldmann, H., & Hawman, D. W. (2021). A Look into Bunyavirales Genomes: Functions of Non-Structural (NS) Proteins. *Viruses,* **13(2):** 314. doi: 10.3390/v13020314.

Li, L., Yu, L. y Hou, X. (2017). Cholesterol-rich lipid rafts play a critical role in bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) infection. *Research in Veterinary Science*, **114:** 341–347. doi: 10.1016/j. rvsc.2017.04.009.

Li, Q., Pogwizd, SM., Prabhu, SD. Y Zhou, L. (2014). Inhibiting Na+/K+ ATPase can impair mitochondrial energetics and induce abnormal Ca2+ cycling and automaticity in guinea pig cardiomyocytes. *PLoS One,* **9(4):** e93928.

Li, X., Wu, K., Zeng, S., Zhao, F., Fan, J., Li, Z., Yi, L., Ding, H., Zhao, M., Fan, S. y Chen, J. (2021). Viral Infection Modulates Mitochondrial Function. *Int. J. Mol. Sci.* **22:** 4260.

Li, XD., Sun, L., Seth, RB., Pineda, G., y Chen, ZJ. (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102:**17717–17722. doi: 10.1073/ pnas.0508531102

Li, Z., Hailemariam, TK., Zhou, H., Li, Y., Duckworth, DC., Peake, DA., Zhang, Y., Kuo, MS., Cao, G., y Jiang, XC. (2007). Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1771(9):**1186–1194. doi:10.1016/j.bbalip.2007.05.007.

Liesenborghs, L., Spriet, I., Jochmans, D., Belmans, A., Gyselinck, I., Teuwen, LA., et al. (2021). Itraconazole for COVID-19: preclinical studies and a proof-of-concept randomized clinical trial. EBioMedicine, 66, 103288

Lin, K. y Gallay, P. (2013). Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res,* **99(1):**68-77.

Liu, T., Brown, DA., y O'Rourke, B. (2010). Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *Journal of molecular and cellular cardiology,* **49(5),** 728–736.

Lopez-Montero, N. y Risco, C. (2011). Self-protection and survival of arbovirus infected mosquito cells. *Cell Microbiol,* **13(2):**300-315.

Loson, OC., Song, Z., Chen, H. y Chan DC. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell.,* **24:**659–667.

Lozach, PY., Mancini, R., Bitto, D., Meier, R., Oestereich, L., Overby, AK., Pettersson, RF. y Helenius, A. (2010). Entry of Bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe*, **7(6):**488-99.

Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., De Brabander, JK., Goldstein, JL. y Brown, MS. (2015). Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *eLife,* **4.** doi: 10.7554/eLife.12177.

Lucero, H. y Robbins, P. (2004). Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **426:**208–224.

Ludwig, GV., Christensen, BM., Yuill, TM., y Schultz, KT. (1989). Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virol.* **171:**108-113.

Ludwig, GV., Israel, BA., Christensen, BM., Yuill, TM., y Schultz, KT. (1991). Monoclonal antibodies directed against the envelope glycoproteins of La Crosse virus. *Microb Pathog.* **11:** 411-421.

Ma, S., Mao, Q., Chen, W., Zhao, M., Wu, K., Song, D., Li, X., Zhu, E., Fan, S., Yi, L., Ding, H., Zhao, M. y Chen J. (2019). Serum Lipidomics Analysis of Classical Swine Fever Virus Infection in Piglets and Emerging Role of Free Fatty Acids in Virus Replication in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* **9:**410.

Mackenzie, JM., Khromykh, AA. y Parton, RG. (2007). Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host & Microbe*, **2:**229–239. doi: 10.1016/j. chom.2007.09.003.

Maltezou, HC. y Papa, A. (2010). Crimean-Congo hemorrhagic fever: risk for emergence of new endemic foci in Europe? *Travel Med Infect Dis,* **8(3):**139-143.

Manie, SN., Debreyne, S., Vincent, S., y Gerlier, D. (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J. Virol.*, **74:**305-311.

Martin, JJ., Holguera, J., Sanchez-Felipe, L., Villar, E. y Munoz-Barroso, I. (2012). Cholesterol dependence of Newcastle disease virus entry. *Biochimica et Biophysica Acta,* **1818:** 753–761. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.12.004.

Martin-Acebes, MA., Gabande-Rodriguez, E., Garcia-Cabrero, AM., Sanchez, MP., Ledesma, MD., Sobrino, F. y Saiz, JC. (2016). Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo. *Journal of Lipid Research*, **57:** 422–432. doi: 10.1194/jlr.M064212.

Martin-Acebes, MA., Merino-Ramos, T., Blázquez, AB., Casas, J., Escribano-Romero, E., Sobrino, F., y Saiz, JC. (2014). The composition of West Nile virus lipid envelope unveils a role of sphingolipid metabolism in flavivirus biogenesis. *Journal of Virology*, **88(20):**12041–12054.

Mattenberger, Y., James, DI. y Martinou, JC. (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.,* **538:**53– 59.

Mazzon, M. y Mercer, J. (2014). Lipid interactions during virus entry and infection. *Cell Microbiol.,* **16(10):** 1493-1502. doi: 10.1111/cmi.12340.

Medigeshi, GR., Hirsch, AJ., Streblow, DN., Nikolich-Zugich, J., y Nelson, JA. (2008) West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J. Virol.*, **82:**5212–9.

Mercorelli, B., Palu, G. y Loregian, A. (2018). Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? *Trends Microbiol,* **26(10):**865-876.

Merz, A., Long, G., Hiet, MS., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., y Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *The Journal of biological chemistry,* **286(4):**3018–3032. doi:10.1074/jbc.M110.175018.

Meutiawati, F., Bezemer, B., Strating, JRPM., Overheul, GJ., Žusinaite, E., van Kuppeveld, FJM., van Cleef, KWR., y van Rij, RP. (2018). Posaconazole Inhibits Dengue Virus Replication by Targeting Oxysterol-Binding Protein. *Antiviral Res.,* **157:**68–79.

Miller, S. y Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol.* **6:** 363-374.

Misaka, T., Miyashita, T. y Kubo, Y. (2002). Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.,* **277:**15834–15842

Mohl, BP. y Barr, JN. (2009). Investigating the specificity and stoichiometry of RNA binding by the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. *RNA.,* **15:**391-399.

Morgnanesi, D., Heinrichs, EJ., Mele, AR., Wilkinson, S., Zhou, S. y Kulp, JL. (2015). A computational chemistry perspective on the current status and future direction of hepatitis B antiviral drug discovery. *Antiviral Res.,* 123:204-15. **doi:** 10.1016/ j.antiviral.2015.10.014.

Mouhid, L., Gómez de Cedrón, M., García-Carrascosa, E., Reglero, G., Fornari, T. y Ramírez de Molina, A. (2019). Yarrow supercritical extract exerts antitumoral properties by targeting lipid metabolism in pancreatic cancer. *PLoS ONE,* **14(3):** e0214294. doi: 10.1371/journal. pone.0214294.

Nacev, BA., Grassi, P., Dell, A., Haslam, SM. y Liu, JO. (2011). The Antifungal Drug Itraconazole Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) Glycosylation, Trafficking, and Signaling in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.,* **286(51):**44045–44056.

Nakitare, GW. y Elliott, RM. (1993). Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm. *Virology*, **195(2):**511-520.

Nchoutmboube, J., Ford-Siltz, LA., y Belov, GA. (2015). Enterovirus Replication: GO with the (Counter) Flow. *Trends Microbiol.,* **23(4):**183–84.

Nguyen, LN., Lim, YS., Pham, LV., Shin, HY., Kim, YS. y Hwang, S. B. (2014). Stearoyl coenzyme A desaturase I is associated with hepatitis C virus replication complex and regulates viral replication. *Journal of Virology*, **88(21):**12311–12325. doi: 10.1128/ JVI.01678-14.

Nii-Trebi, NI. (2017). Emerging and neglected infectious diseases: insights, advances, and challenges. *Biomed Res Int,* **2017:** 5245021. doi: 10.1155/2017/5245021.

Novoa, RR., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H. y Risco, C. (2005a). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell,* **97(2):**147-172.

Novoa, RR., Calderita, G., Cabezas, P., Elliott, RM., y Risco, C. (2005b). Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol*. **79:**10852-10863.

Ong, SB., Subrayan, S., Lim, SY., Yellon, DM., Davidson, SM. y Hausenloy, DJ. (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation,* **121:** 2012-2022.

Ortega-Gonzalez, P., Taylor, G., Jangra, RK., Tenorio, R., Fernandez de Castro, I., Mainou, BA., Orchard, RC., Wilen, CB., Brigleb, PH., Sojati, J., Chandran, K., Sachse, M., Risco, C., y Dermody, TS. (2022). Reovirus infection is regulated by NPC1 and endosomal cholesterol homeostasis. *PLOS Pathogens,* **18(3):** e1010322.

Overby, AK., Pettersson, RF., Grunewald, K. y Huiskonen, JT. (2008). Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci USA,* **105(7):**2375-2379.

Pacheco, B., Fernández-Oliva, A., García-Serradilla, M., y Risco, C. (2022). Examination of four repurposed drugs demonstrates that digoxin is a potent inhibitor of Bunyamwera virus infection in cell culture. *Virus Research. [en revisión].*

Pagana, KD., Pagana, TJ. y Pagana, TN. (2019). Mosby's Diagnostic & Laboratory Test Reference. 14th ed. St. Louis, Mo: Elsevier.

Palmer, CS., Osellame, LD., Laine, D., Koutsopoulos, OS., Frazier, AE., y Ryan MT. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.,* **12:**565–573.

Pekosz, A., J. Phillips, D. Pleasure, D. Merry and F. Gonzalez-Scarano (1996). "Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention." J Virol 70(8): 5329-5335.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., y Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.,* **3:**473–483.

Phalen, T. y Kielian, M. (1991) Cholesterol is required for infection by Semliki Forest virus. *J. Cell Biol.,* **112:**615–623.

Piccoli, C., Scrima, R., D'Aprile, A., Ripoli, M., Lecce, L., Boffoli, D. y Capitanio, N. (2006). Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection. *Biochim. Biophys. Acta,* **1757:**1429– 1437. doi: 10.1016/j.bbabio.2006.05.018

Pike, L. (2003). Lipid rafts: bringing Order to Chaos*. Journal of Lipid Research*, **44(4):**655-67.

Pila-Castellanos, I., Molino, D., McKellar, J., Lines, L., Da Graca, J. *et al.* (2021) Mitochondrial morphodynamics alteration induced by influenza virus infection as a new antiviral strategy. *PLOS Pathogens*, **17(2):**e1009340.

Plassmeyer, ML., Soldan, SS., Stachelek, KM., Martin-Garcia, J., y Gonzalez-Scarano, F. (2005). California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virol.* **338:**121-132.

Poh, MK., Shui, G., Xie, X., Shi, PY., Wenk, MR. y Gu, F. (2012). U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Research,* **93:** 191–198. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.11.014.

Priya, G., Saranya, IH., Kiran, T. y Marc, G. (2020). Mitochondria Targeted Viral Replication and Survival Strategies—Prospective on SARS-CoV-2. *Frontiers in Pharmacology,* **11.** doi: 10.3389/fphar.2020.578599.

Ramanathan, MP., Chambers, JA., Pankhong, P., Chattergoon, M., Attatippaholkun, W., Dang, K., Shah, N. y Weiner, DB. (2006). Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology,* **345:**56–72. doi: 10.1016/j.virol.2005.08.043

Rao, GA. y Pandya, PK. (2011). Statin therapy improves sustained virologic response among diabetic patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology,* **140(1):** 144–152. doi:10.1053/j. gastro.2010.08.055.

Rappold, PM., Cui, M., Grima, JC., Fan, RZ., de Mesy-Bentley, KL., Chen, L., Zhuang, X., Bowers, WJ. y Tieu, K. (2014). Drp1 inhibition attenuates neurotoxicity and dopamine release deficits *in vivo. Nat. Commun.,* **5:** 5244.

Ren, Z., Zhang, X., Ding, T., Zhong, Z., Hu, H., Xu, Z., y Deng, J. (2020). Mitochondrial dynamics imbalance: a strategy for promoting viral infection. *Front. Microbiol.* **11:**1992.

Risco C., Fernández de Castro, I., Sanz-Sánchez, L., Narayan, K., Grandinetti, G., y Subramaniam, S. (2014). Three-Dimensional Imaging of Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.,* **1:**453-473.

Roberts, BL., Severance, ZC., Bensen, RC., Le, AT., Kothapalli, NR., Nuñez, JI., Ma, H., Wu, S., Standke, SJ., Yang, Z., Reddig, WJ., Blewett, EL. Y Burgett, AWG. (2019a). Transient Compound Treatment Induces a Multigenerational Reduction of Oxysterol-Binding Protein (OSBP) Levels and Prophylactic Antiviral Activity. *ACS Chem. Biol.* **14(2):**276-287. doi:10.1021.acschembio.8b00984.

Roberts, BL., Severance, ZC., Bensen, RC., Le, AT., Malinky, CA., Mettenbrink, EM., Nuñez, JI., Reddig, WJ., Blewett, EL., y Burgett, AWG. (2019b). Differing activities of oxysterol-binding protein (OSBP) targeting anti-viral compounds. *Antiviral Research,* **170:** 104548. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104548.

Rothwell, C., Lebreton, A., Young Ng, C., Lim, JY., Liu, W., Vasudevan, S., *et al.* (2009). Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*, **389:**8–19. doi: 10.1016/j. virol.2009.03.025.

Roulin, PS., Lotzerich, M., Torta, F., Tanner, LB., van Kuppeveld, FJ., Wenk, MR. y Greber, UF. (2014). Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER–Golgi interface. *Cell Host & Microbe,* **16:**677–690. doi: 10.1016/j. chom.2014.10.003.

Rozzi, SJ., Avdoshina, V., Fields, JA. y Mocchetti, I. (2018). Human immunodeficiency virus tat impairs mitochondrial fission in neurons. *Cell Death Dis.,* **4:**8. doi: 10.1038/ s41420-017-0013-6.

Rustin, P. (2002). Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nat Genet*, **30:**352–353 doi: 10.1038/ng0402-352.

Sachse, M., Fernandez de Castro, I., Fournier, G., Naffakh, N. y Risco, C. (2018). Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy and Immunogold Labeling on Tokuyasu Cryosections to Image Influenza A Virus Ribonucleoprotein Transport and Packaging. *Methods Mol Biol,* **1836:** 281-301.

Saied, EM., Diederich, S., y Arenz, C. (2014). Facile synthesis of the CERT inhibitor HPA-12 and some novel derivatives. *Chem. Asian. J.,* **9(8):**2092-4. doi: 10.1002/ asia.201402241.

Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Sudoh, M. (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature Chemical Biology,* **1:** 333–337. doi: 10.1038/nchembio742.

Salanueva, IJ., Novoa, RR., Cabezas, R., López-Iglesias, C., Carrascosa, JL., Elliott, RM., Risco, C. (2003). Polymorphism and structural maturation of Bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J. Virol.,* **77(2):** 1368-1381.

Sánchez-Martínez, R., Cruz-Gil, S., Gómez de Cedrón, M., Álvarez-Fernández, M., Vargas, T., Molina, S., García, B., Herranz, J., Moreno-Rubio, J., Reglero, G., Pérez-Moreno, M., Feliu, J., Malumbres, M. y Ramírez de Molina, A. (2015). A link between lipid metabolism and epithelial-mesenchymal transition provides a target for colon cancer therapy. *Oncotarget,* **6(36):** 38719–38736. doi:10.18632/oncotarget.5340.

Santel, A. y Fuller, MT. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci*, **114:**867–874.

Santos, RI., Rodrigues, AH., Silva, ML., Mortara, RA., Rossi, MA., Jamur, MC., Oliver, C. y Arruda, E. (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res,* **138:**139-143.

Sanz-Sanchez, L., y Risco, C. (2013). Multilamellar Structures and Filament Bundles Are Found on the Cell Surface during Bunyavirus Egress. PLOS ONE, 8(6): e65526.

Satoh, O., Umeda, M., Imai, H., Tunoo, H.y Inoue, K. (1990). Lipid composition of hepatitis B virus surface antigen particles and the particle-producing human hepatoma cell lines. *J. Lipid Res.*, **31(7):**1293-300.

Schaar, HM., Strating, JRPM., Gorbalenya, AE. et al. (2016). Mutations in Encephalomyocarditis Virus 3A Protein Uncouple the Dependency of Genome Replication on Host Factors Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIα and Oxysterol Binding Protein. mSpher, **1(3):**e00068-16

Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., y Simons, K. (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.,* **274:**2038-2044.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, **9(7):** 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.

Schlesinger, HR., Wells, HJ. y Hummeler, K. (1973). Comparison of the lipids of intracellular and extracellular rabies viruses. *J. Virol.,* **12(5):** 1028-30. doi: 10.1128/ JVI.12.5.1028-1030.1973.

Schmaljohn, CS. y Nichol, ST. (2007). Bunyaviridae, en: Fields Virology, 5ª edición. Editores: Knipe, DH. y Howley, PH. Lippincott, Williams y Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Filadelfia, Estados Unidos, 1741-1789.

Seth, RB., Sun, L., Ea, CK. y Chen, ZJ. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, **122:**669–682.

Shalvuyeva, N., Brustovetsky, T., Bolshakov, A., y Brutovetsky, N. (2006). Calcium-dependent spontaneously reversible remodeling of brain mitochondria. *J. Biol. Chem.,* **281:**37547-37558.

Sharma, M., Sasvari, Z. y Nagy, PD. (2010). Inhibition of sterol biosynthesis reduces tombusvirus replication in yeast and plants. *Journal of Virology,* **84:**2270–2281. doi:10.1128/JVI.02003-09.

Shi, CS., Qi, HY., Boularan, C., Huang, NN., Abu-Asab, M., Shelhamer, JH. y Kehrl, JH. (2014). SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *Journal of immunology,* **193(6):**3080–3089. Doi:10.4049/jimmunol.1303196.

Shi, X., Brauburger, K. y Elliott, RM. (2005). Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol,* **79:**13725-13734.

Shi, X., Elliott, RM. (2009). Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *J Gen Virol,* **90:** 297-306.

Shi, X., Kohl, A., Leonard, VH., Li, P., McLees, A. y Elliott, RM. (2006). Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol,* **80(16):**8089-8099.

Shi, X., Kohl, A., Li, P. y Elliott, RM. (2007). Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J Virol*, **81(18):** 10151-10160.

Shi, X., Mierlo, JT., French, A., y Elliott, RM. (2010). Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein tagged Gc glycoprotein. *J Virol,* **84(17):** 8460-8469.

Shoemaker, CJ., Schornberg, KL., Delos, SE., Scully, C., Pajouhesh, H., Olinger, GG., White, JM. (2013). Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann–Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection. *PLoS One,* **8:** e56265. doi: 10.1371/journal. pone.0056265.

Sidwell, RW. y Smee, DF. (2003). Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res,* **57(1-2):** 101-111.

Siegmund, SE., Grassucci, R., Carter, SD., Barca, E., Farino, ZJ., Juanola-Falgarona, M., Zhang, P., Tanji, K., Hirano, M., Schon, EA., Frank, J. y Freyberg, Z. (2018). Three-Dimensional Analysis of Mitochondrial Cristae Ultrastructure in a Patient with Leigh Syndrome by In Situ Cryoelectron Tomography. *iScience,* **6:** 83-91.

Smith, KM., Machalaba, CC., Seifman, R., Feferholtz, Y. y Karesh, WB. (2019). Infectious disease and economics: the case for considering multi-sectoral impacts. *One Health*, **7:**100080. doi: 10.1016/j.onehlt.2018.100080.

Smithburn, KC., Haddow, AJ. y Mahaffy, AF. (1946). A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki Forest. *Am J Trop Med Hyg,* **26:**189-208.

Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, JM., Frey, TG. y Chan, DC. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell,* **20(15):** 3525– 3532. doi: 10.1091/mbc.E09-03-0252.

Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel- Ambrocio, AH. y del Angel, RM. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathogens*, **13:** e1006257. doi: 10.1371/journal.ppat.1006257.

Spinelli, JB. y Haigis, MC. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.,* **20 (7):**745–754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1.

Strating JR., van der Linden, L., Albulescu, L., Bigay, J., Arita, M., Delang, L., Leyssen, P., van der Schaar, HM., Lanke, KH., Thibaut, HJ., Ulferts, R., Drin, G., Schlinck, N., Wubbolts, RW., Sever, N., Head, SA., Liu, JO., Beachy, PA., De Matteis, MA., Shair, MD., Olkkonen, VM., Neyts, J. y van Kuppeveld, FK. (2015). Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep,* **10:** 600-615.

Strott, CA. y Higashi, Y. (2003). Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *Journal of lipid research*, **44(7):** 1268-1278.

Suen, DF., Narendra, DP., Tanaka, A., Manfredi, G. y Youle, RJ. (2010). Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107:**11835– 11840.

Suen, DF., Norris, KL., y Youle, RJ. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.,* **22:**1577–1590. doi: 10.1101/gad.1658508.

Sun, B., Sundstrom, KB., Chew, JJ., Bist, P., Gan, ES., Tan, HC., et al. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci. Rep.,* **7:**3594. doi: 10.1038/s41598-017-03932-1.

Sun, X. y Whittaker, GR. (2003). Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *J. Virol.,* **77:**12543–51

Tatematsu, K., Tanaka, Y., Sugiyama, M., Sudoh, M. y Mizokami, M. (2011). Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *Journal of Medical Virology*, **83:** 587–593. doi: 10.1002/jmv.21970.

Ter Horst, S., Conceição-Neto, N., Neyts, J., Rocha-Pereira, J. (2019). Structural and functional similarities in bunyaviruses: Perspectives for pan-bunya antivirals. *Rev. Med. Virol.* **29:** e2039.

Thangamani, S., Huang, J., Hart, CE., Guzman, H. y Tesh, RB. (2016). Vertical Transmission of Zika Virus in Aedes aegypti Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg,* **95(5):**1169-1173.

Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, RM., Haller, O. y Weber, F. (2004). Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem,* **279(30):**31471-7.

Tiku, V., Tan, MW., Dikic, I. (2020). Mitochondrial Functions in Infection and Immunity. *Trends Cell Biol.*, **30:**263–275. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.006.

To, KK., Zhou, J., Chan, JF. y Yuen, KY. (2015). Host genes and influenza pathogenesis in humans: an emerging paradigm. *Curr Opin Virol,* **14:**7-15.

Tokuyasu, KT. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol,* **57(2):** 551-65. doi: 10.1083/jcb.57.2.551.

Toledo, A., y Benach, JL. (2015). Hijacking and use of host lipids by intracellular pathogens. *Microbiology Spectrum*, **3(6).** doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0001-2014.

Tolosa, L., Donato, MT., Gómez-Lechón, MJ. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **1250:** 333-348.

Trovato, M., Sartorius, R., D'Apice, L., Manco, R., De Berardinis, P. (2020). Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. *Frontiers in Immunology,* **11.** doi: 10.3389/fimmu.2020.02130.

Twig, G. y Shirihai, OS. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid. Redox Signal*, **14:**1939–1951.

Van Damme, E., De Meyers, S., Bojkova, D., Ciesek, S., Cinatl, J., De Jonghe, S., Jochmans, D., Leyssen, P., Buyck, C., Neyts, J., Van Loock, M. (2021). In vitro activity on itraconazole against SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology,* **93(7):**4454-4460.

van der Schaar, HM., Dorobantu, CM., Albulescu, L., Strating, J. y van Kuppeveld, F.JM. (2016). Fat(al) attraction: Picornaviruses usurp lipid transfer at membrane contact sites to create replication organelles. *Trends in Microbiology,* **24:**535–546. doi: 10.1016/ j.tim.2016.02.017.

Vance, DE., Trip, EM. y Paddon, HB. (1980). Poliovirus increases phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells by stimulation of the rate- limiting reaction catalyzed by CTP: Phosphocholine cytidylyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry,* **255:** 1064–1069.

vanMeer, G., Voelker, DR., y Feigenson, GW. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews*, **9:**112-124.

Vasudevan, D. y Ryoo, HD. (2015). Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Curr Top Dev Biol.,* **114:**185-208.

Vincent, A., Ng, YS., White, K., Davey, T., Mannella, C., Falkous, G., Feeney, C., Schaefer, AM., McFarland, R., Gorman, GS., Taylor, RW., Turnbull, DM. y Picard, M. (2016). The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Scientific Reports,* **6:** 30610. doi:10.1038/srep30610.

Walter, CT. y Barr, JN. (2011). Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol,* **92(11):** 2467-2484.

Wang, H., Perry, JW., Lauring, AS., Neddermann, P., De Francesco, R. y Tai, AW. (2014). Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4- kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology,* **146(1373-1385):** e1371–e1311.

Watret, GE., Pringle, CR. y Elliott, RM. (1985). Synthesis of bunyavirus-specific proteins in a continuous cell line (XTC-2) derived from Xenopus laevis. *J. Gen. Virol.* **66:** 473–482.

Weber, F., Dunn, EF., Bridgen, A. y Elliott, RM. (2001). The Bunyamwera virus non-structural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virol,* **281:**67-74.

Weerheim, AM., Kolb, AM., Sturk, A., Nieuwland, R. (2002). Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry,* **302:** 191-198.

Weng, L., Hirata, Y., Arai, M., Kohara, M., Wakita, T., Watashi, K., Toyoda, T. (2010). Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *Journal of Virology*, **84:** 11761–11770. doi: 10.1128/JVI.00638-10.

Werling, D., Hope, JC., Chaplin, P., Collins, RA., Taylor, G. y Howard, CJ. (1999). Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.,* **66:**50-58.

Wong, LH., Copic, A. y Levine, TP. (2017). Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends in Biochemical Sciences,* **42:** 516–530. doi: 10.1016/ j.tibs.2017.05.001.

Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B. y Song, Z. (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*, **8(4):**379. doi: 10.3390/cells8040379

Yang, S., Gorshkov, K., Lee, EM., Xu, M., Cheng, YS., Sun, N., Soheilian, F., de Val, N., Ming, G., Song, H., Tang, H., y Zheng, W. (2020). Zika Virus-Induced Neuronal Apoptosis via Increased Mitochondrial Fragmentation. *Front. Microbiol.,* **11:**598203. doi: 10.3389/fmicb.2020.598203

Yang, S., Xu, M., Lee, EM., Gorshkov, K., Shiryaev, SA., He, S., *et al.* (2018). Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry. *Cell Discov.,* **4:**31. doi: 10.1038/s41421-018-0034-1.

Yang, Y., Lee, M. y Fairn, GD. (2018). Phospholipid subcellular localization and dynamics. *Journal of Biological Chemistry,* **293(17):**6230-6240.

Yasuda, S., Kitagawa, H., Ueno, M., Ishitani, H., Fukasawa, M., Nishijima, M., Hanada, K. (2001). A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **276:** 43994–44002. doi: 10.1074/jbc.M104884200.

Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y. y Feng, Z. (2016). Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses. *Journal of Virology*, **90:** 4232–4242. doi: 10.1128/ JVI.02804-15.

Zeisel, MB., Lupberger, J., Fofana, I. y Baumert, TF. (2013). Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J Hepatol*, **58(2):**375-384.

Zhang, J., Liu, Y., Nie, X., Yu, Y., Gu, J. y Zhao, L. (2018). Trough concentration of itraconazole and its relationship with efficacy and safety: a systematic review and meta-analysis. *Infection and drug resistance,* **11:**1283–1297. doi: 10.2147/IDR.S170706.

Zhang, J., Zhang, Z., Chukkapalli, V., Nchoutmboube, JA., Li, J., Randall, G., Wang, X. (2016). Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **113:**1064–1073. doi:10.1073/pnas. 1519730113.

Zorova, LD., Popkov, VA., Plotnikov, EY., Silachev, DN., Pevzner, IB. y Jankauskas, SS. *et al.* (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **552:** 50–59. doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.

Anexo

Received: 28 September 2018 | Revised: 4 December 2018 | Accepted: 17 December 2018

DOI: 10.1111/cmi.12996

MICROREVIEW

WILEY

Targeting host lipid flows: Exploring new antiviral and antibiotic strategies

Alberto Fernández-Oliva* | Paula Ortega-González* | Cristina Risco

Cell Structure Lab, National Centre for Biotechnology, CNB-CSIC, Madrid, Spain

Correspondence
Cristina Risco, Cell Structure Lab, National Centre for Biotechnology, CNB-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain.
Email: crisco@cnb.csic.es

Funding information
Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain, Grant/Award Numbers: BIO2015-68758-R and BES-2016-078317

Abstract

Bacteria and viruses pose serious challenges for humans because they evolve continuously. Despite ongoing efforts, antiviral drugs to treat many of the most troubling viruses have not been approved yet. The recent launch of new antimicrobials is generating hope as more and more pathogens around the world become resistant to available drugs. But extra effort is still needed. One of the current strategies for antiviral and antibiotic drug development is the search for host cellular pathways used by many different pathogens. For example, many viruses and bacteria alter lipid synthesis and transport to build their own organelles inside infected cells. The characterization of these interactions will be fundamental to identify new targets for antiviral and antibiotic drug development. This review discusses how viruses and bacteria subvert cell machineries for lipid synthesis and transport and summarises the most promising compounds that interfere with these pathways.

1 | INTRODUCTION

Emerging viruses and multidrug-resistant bacteria constitute a serious public health problem, which will likely become a global safety challenge over the next decades. Faced with this situation, the need for searching new broad-spectrum antivirals and antibiotics has emerged. Most antibiotics in late-stage clinical development belong to existing antibiotic classes, and a few are new compounds directed against novel targets (Fernandes & Martens, 2017). Blocking cellular pathways used by pathogens in combined therapies against several targets is an interesting strategy to treat viral and bacterial infections while avoiding antiviral or antibiotic resistance.

Classically, the study of pathogen–host interactions had been focused on proteins and nucleic acids from the pathogen and the host. However, in recent years, lipidomics has gained importance in virology and bacteriology. Lipids are much more than structural components of membranes or molecules for energy storage, and they also play important roles in cellular signalling and regulatory processes in both healthy and infected cells.

The lipid composition of membranes affects their morphology and biophysical properties such as charge, curvature, width, packing defects, and fluidity. The study of changes in lipid biosynthesis pathways and transport in infected cells is a promising research field because many viruses and bacteria manipulate host membranes and lipid flows (Altan-Bonnet, 2017; Toledo & Benach, 2015; van der Schaar, Dorobantu, Albulescu, Strating, & van Kuppeveld, 2016). In this review, we summarise the main pathways of lipid synthesis and transport hijacked by viruses and bacteria and the drugs that interfere with these general processes.

2 | VIRUSES

Viruses are obligate intracellular pathogens that require the host cell machinery to replicate. Both DNA and RNA viruses usurp and take advantage of cellular membranes at different steps of their replication cycle. Viruses are able to induce the synthesis of new membranes and reorganise membranes of cell compartments to generate new organelles known as replication organelles or viral factories, which support viral genome replication and assembly of virus progeny. The use of membranes from organelles of the secretory pathway is quite widespread among RNA viruses. For instance, flaviviruses such as dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), and hepatitis C virus (HCV; Gillespie, Hoenen, Morgan, & Mackenzie, 2010; Romero-Brey et al., 2012; Welsch et al., 2009), reoviruses (Tenorio et al., 2018), and severe acute respiratory syndrome coronavirus (Knoops et al., 2008)

*These two authors are equal contributors.

 © 2018 John Wiley & Sons Ltd

exploit endoplasmic reticulum (ER) membranes. The Golgi apparatus is used by Bunyaviruses (Fontana, Lopez-Montero, Elliott, Fernandez, & Risco, 2008) and enteroviruses (Limpens et al., 2011). Flock House virus (FHV) builds factories in mitochondria (Kopek, Perkins, Miller, Ellisman, & Ahlquist, 2007), tomato bushy stunt virus (TBSV) uses peroxisomes (Fernandez de Castro, Fernandez, Barajas, Nagy, & Risco, 2017), rubella virus uses lysosomes (Fontana et al., 2010), and Sindbis virus assembles replication complexes at the plasma membrane, endosomes, and lysosomes (Frolova, Gorchakov, Pereboeva, Atasheva, & Frolov, 2010).

Viral genome replication in cell membranes has important advantages (Altan-Bonnet, 2017): (a) restricting movement on the two-dimensional plane concentrates viral replicases and saves time during replication; (b) activation of viral polymerases that depend on binding to specific membrane lipids; and (c) the assembly of viral replication complexes (VRCs) in pocket-like structures protects the viral machinery from detection by the host cell innate immune defences.

Membrane-associated viral replication is closely related to lipid synthesis and transport. Viruses generally subvert lipid flows by three different mechanisms: the translocation and/or regulation of lipid biosynthesis enzymes, the interference with lipid-mediated signalling through the regulation of phosphatidylinositol (PI) kinases, and the regulation of lipid trafficking at membrane contact sites (MCSs) between adjacent organelles. Here, we present the current knowledge on these pathways and a list of drugs that interfere with them and have been identified to exhibit antiviral capacity (summarised in Figures 1 and 2).

2.1 | Translocation and regulation of lipid biosynthesis enzymes

The development of metabolomics and lipidomics based on liquid chromatography and mass spectrometry techniques has contributed to characterize and monitor changes in the amount of different membrane and signalling lipids during viral infections. For instance, HCV infection has been discovered to increase cellular levels of cholesterol and sphingolipids (SLs) and to modify the phospholipid metabolism leading to an accumulation of phosphatidylcholine (PC) and triglyceride with longer and polyunsaturated fatty acid (FA) chains (Diamond et al., 2010; Gullberg et al., 2018; Hofmann et al., 2018; Roe, Kensicki, Mohney, & Hall, 2011). Lipidomics analysis of cells infected with other related flaviviruses such as DENV and WNV has revealed a marked increase in FAs, glycerophospholipids (GPLs), and SL content (Chotiwan et al., 2018; Perera et al., 2012) and has allowed to identify specific markers of infection, for example, lysophosphatidylcholine (Liebscher et al., 2018).

These techniques have also allowed the characterization of the lipidome of enveloped viruses. By this way, human immunodeficiency virus-1 lipid envelope has been observed to be different from the producer cell plasma membrane, suggesting that viruses bud from specialised membrane subdomains, which are enriched in particular lipids (Lorizate et al., 2012).

Taken together, all these data prove the complex remodelling of the host lipid metabolism induced by viral infection.

2.1.1 | Regulation of glycerophospholipid synthesis

GPLs are the major components of biological membranes. Their structure is based on a polar group head, which defines their charge and shape properties and allows the interaction with water and molecules near the external leaflet of the membrane, and a pair of FA hydrophobic tails.

The rate-limiting step of GPLs biosynthesis relies on FA availability. In order to generate a larger pool of FA, HCV directly induces the overexpression of FA synthase (FASN), the key multienzyme complex for FA synthesis and therefore GPLs. This is a possible mechanism by which HCV infection alters the cellular lipid profile in liver and causes diseases such as steatosis (Yang et al., 2008). DENV nonstructural protein 3 (NS3) is responsible for FASN recruitment to replication factories (Heaton et al., 2010). After infection, cellular membranes showed a FASN-dependent enrichment in unsaturated phospholipids and lipid signalling molecules such as sphingomyelin (SM; Perera et al., 2012). Two related flaviviruses, WNV and Usutu virus (USUV; Martin-Acebes, Blazquez, Jimenez de Oya, Escribano-Romero, & Saiz, 2011), and the nonrelated alphanodavirus FHV (Kampmueller & Miller, 2005) also showed an RNA replication dependency on FA synthesis. Thus, modulating FA synthesis can be an effective antiviral strategy.

DENV, WNV, USUV, and FHV viruses are sensitive to the inhibitory effect of cerulenin and C75, two specific inhibitors of FASN. Cerulenin is a natural product of the fungus *Cephalosporium caerulens*, which only inactivates the β-ketoacyl synthase activity of FASN. C75 is a synthetic inhibitor that also inactivates the enoyl reductase and thioesterase partial activities of FASN with about the same rates as for inactivation of the β-ketoacyl synthase (Rendina & Cheng, 2005). C75 was designed to be less reactive and safer than the classical inhibitor, cerulenin.

Appropriate membrane packing and fluidity are essential for viral RNA replication. These membrane properties mostly depend on the saturation grade and length of the FA hydrophobic tales. The stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of monounsaturated FAs from their saturated FA precursors. It catalyses the formation of a *cis*-double bond at the Δ9 position of stearoyl and palmitoyl-CoA. Brome mosaic virus (BMV) requires unsaturated FAs, and mutations in the host FA desaturases inhibit BMV replication (Lee, Ishikawa, & Ahlquist, 2001). Synthetic piperidine–aryl urea-based inhibitors such as A939572 have been developed to specifically block SCD1, and they have been proven to impair HCV and DENV infection in cell culture (Gullberg et al., 2018; Nguyen et al., 2014). SCD1 inhibitors are claimed to be promising candidates to treat various diseases including cancer, Alzheimer's disease, and viral infections, so recently, novel SCD1 inhibitors have been developed and reported (reviewed by Uto, 2016).

PC and phosphatidylethanolamine (PE) are the most abundant GPLs in the cell. They are synthesized by two different metabolic routes, from a choline or ethanolamine polar head and a diacylglycerol backbone through the so-called Kennedy pathways, which are the most exploited ways by most mammalian cells, and through the CDP–DAG pathway that is the main PC source for yeast. This alternative pathway consists of a lineal route by which PE suffers three

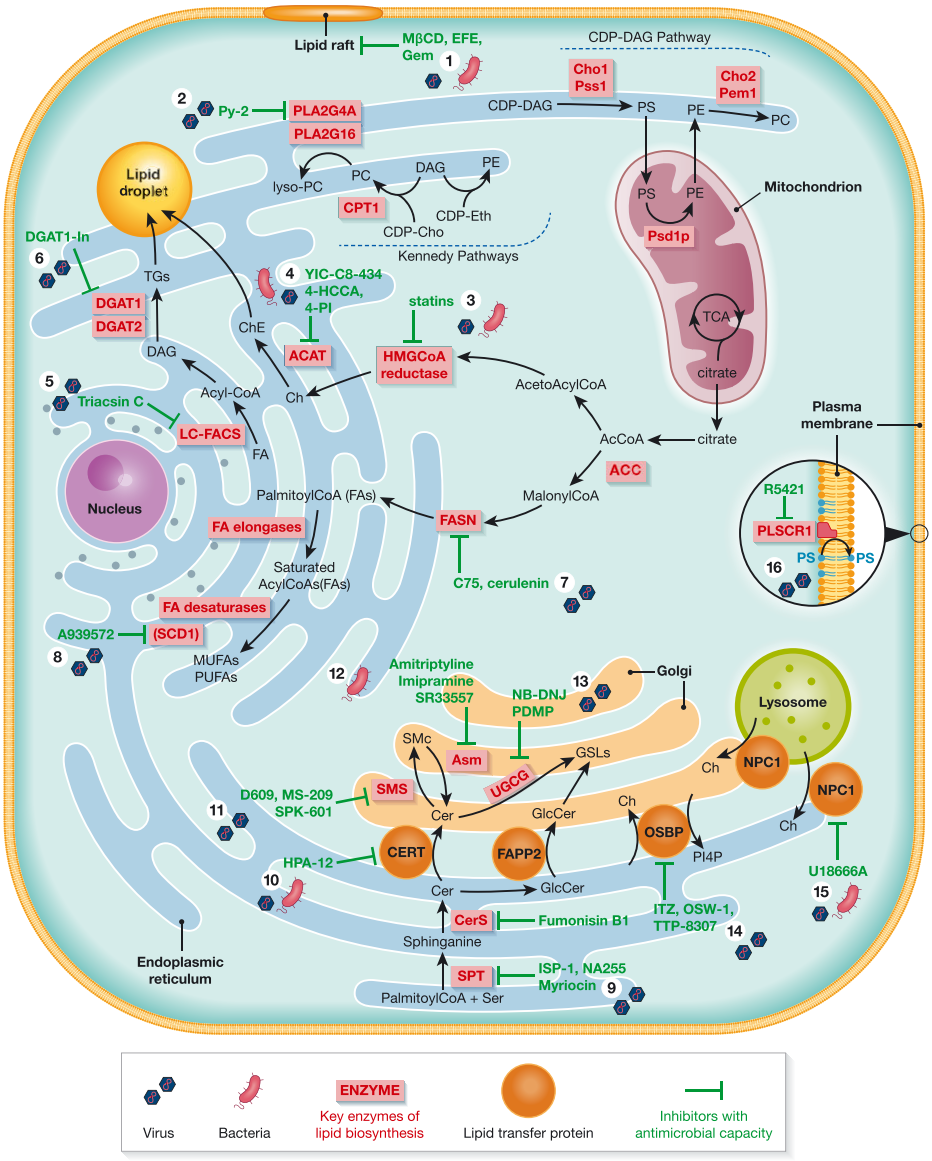


FIGURE 1 Schematic summary of host lipid synthesis and transport pathways used by viruses and bacteria. Compounds that interfere with these pathways and have antiviral or antibiotic activity are indicated. (1) Disruption of lipid rafts affects West Nile virus, Newcastle disease virus, human immunodeficiency virus-1, and influenza A, bovine parainfluenza, and syncytial viruses and *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *and Chlamydia trachomatis* infection. (2) Inhibition of phospholipase PLA2G4A impairs hepatitis C virus (HCV) replication. (3) Inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase by statins interferes with infection of many viruses and bacteria such as West Nile virus (WNV), dengue virus (DENV), tomato bushy stunt virus, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Coxiella burnetii*. (4) Inhibition of acyl-CoA:cholesterol (Ch) acyltransferase (ACAT) blocks infection of HCV and *C. trachomatis*. (5 and 6) Inhibition of two different steps of triglyceride (TG) synthesis impairs HCV assembly. (7) When fatty acid (FA) synthase (FASN) is inhibited by C75 or cerulenin, replication of WNV, Usutu virus, DENV, and Flock House virus is blocked. (8) Inhibition of FA-desaturase stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) decreases HCV and DENV infectivity. (9) Blockage of ceramide (Cer) synthesis at two different steps impairs replication of viruses such as WNV, HCV, and hepatitis B virus. (10) Inhibition of the lipid transfer protein Cer transfer protein (CERT) impairs HCV particle release and *C. trachomatis* infection. (11) Inhibition of sphingomyelin (SM) synthase alters HCV viral cycle. (12) Inhibition of sphingomyelinase (Asm) acts as an antibiotic against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *E. coli*, and *C. burnetii*. (13) HCV replication decreases when treating with uridine diphosphate–glucose Cer synthase (UGCG) synthetic inhibitors. (14) Inhibition of oxysterol-binding protein (OSBP) impairs replication of enterovirus, encephalomyocarditis virus, and HCV. (15) Inhibition of Niemann–Pick type C1 protein (NPC1) impedes the entry of Ebola virus and other filoviruses because NPC1 is the specific cell receptor for these viruses; inhibition of NPC1-mediated Ch transport impairs the replication of DENV, HEV, and HCV viruses and reduces the infection of *C. trachomatis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *C. burnetii*. (16) Inhibition of scramblase phospholipid scramblase-1 (PLSCR1) reduces herpes simplex virus infection. Biosynthetic processes are compartmentalised in different subcellular locations or organelles. EFE: elder fruit extract; MβCD: methyl-β-cyclodextrin; PS: phosphatidylserine; PE: phosphatidylethanolamine; PC: phosphatidylcholine; TCA: tricarboxylic acid cycle; ACC: acetyl-CoA carboxylase; ChE: cholesterol ester; DGAT1: diacylglycerol acyltransferase 1; DGAT2: diacylglycerol acyltransferase 2; LC-FACS: long-chain acyl-CoA synthetase; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; SMS: sphingomyelin synthase; CerS: ceramide synthase; SPT: serine palmitoyltransferase; FAPP2: four-phosphate adaptor protein 2; GlcCer: glucosylceramide; GSLs: glycosphingolipids; ITZ: itraconazole; PI4P: phosphatidylinositol 4-phosphate

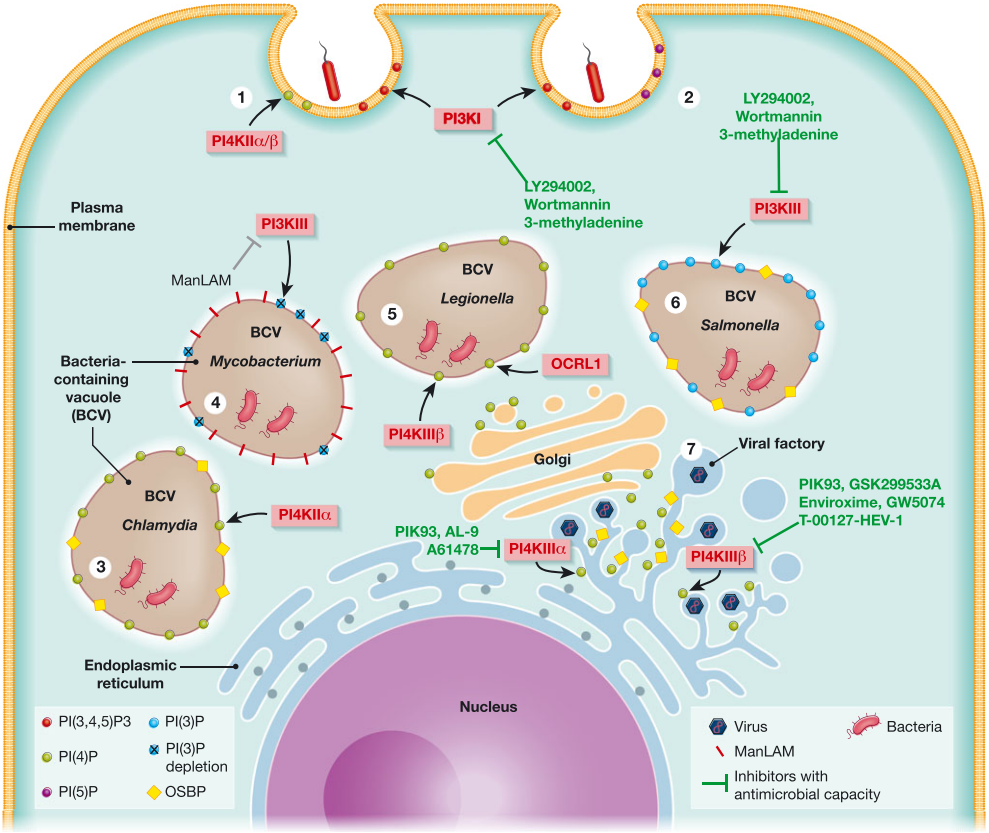


FIGURE 2 Schematic summary of phosphatidylinositol (PI)-derived signalling pathways triggered by bacteria and viruses. Compounds that interfere with these pathways and have antiviral or antibiotic activity are indicated. (1) *Listeria* uses the InlB effector, which engages with host receptor Met and stimulates the recruitment of PI3KI to the bacterial entry sites. PI3K activation produces PI(3,4,5)P3, resulting in the reorganisation of cytoskeleton favouring the entry of *Listeria*. Both *Listeria* and *Chlamydia* additionally recruit PI4KIIα/β to the plasma membrane, where it produces PI(4)P also promoting uptake. (2) *Brucella* and *Salmonella* require PI3KI recruitment and activity for entering the cell. Alternately, *Anaplasma phagocytophilum* and *Shigella* need the subsequent PI3K–AKT pathway to delay apoptosis. Moreover, *Shigella*'s entry site requires an enrichment of PI(5)P stimulated by IpgD. (3) After entry, *Chlamydia* recruits PI4KIIα to the inclusion, generating PI(4)P and leading to the recruitment of the lipid transfer protein oxysterol-binding protein (OSBP). (4) *Mycobacterium* produces the mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM) to interfere with PI3KIII activity. Disruption of PI3KIII reduces the amounts of PI(3)P on the inclusion surface and avoids phagosomal maturation. (5) Recruitment of PI4KIIIβ and OCRL1 together with the hijacking of the secretory pathway enriches *Legionella* inclusion in PI(4)P. (6) The *Salmonella* effector SopB recruits PI3KIII to the inclusion surface to maintain high levels of PI(3)P. The SseL effector binds to OSBP, which is recruited to the inclusion periphery. (7) Many different viruses recruit and exploit host PI4KIII kinases to build viral factories within reorganised cell membranes. Hepatitis C virus and encephalomyocarditis virus remodel endoplasmic reticulum membranes to build replication organelles with the assistance of PI4KIIIα that generates PI(4)P at the replication sites. In a similar manner, PI4KIIIβ is used by other viruses such as picornaviruses, enteroviruses, Coxsackievirus B3, and human rhinoviruses

consecutive methylations mediated by the choline-requiring protein 2 (cho2) to become PC (reviewed by Henry, Kohlwein, & Carman, 2012).

Global PC synthesis is significantly enhanced during infection of many (+)ssRNA viruses such as DENV, FHV, poliovirus, and HCV (Castorena, Stapleford, & Miller, 2010; Vance, Trip, & Paddon, 1980; Zhang et al., 2016). Moreover, BMV replication protein 1a interacts with and recruits cho2 to the site of viral replication. In CHO2 deletion yeast mutants, BMV replication was inhibited up to 30-fold (Zhang et al., 2016).

On the other hand, the plant tombusviruses TBSV, cucumber necrosis virus, and Carnation Italian ringspot virus and the unrelated insect Nodamura virus require high levels of PE at the viral replication sites. All these viruses take advantage of the increased PE level in cho2Δ yeast cells, whereas depletion of the PE levels reduces viral replication (Xu & Nagy, 2015). As PE has a small head resulting in a conical shape, it has been proposed to contribute to the induction of the characteristic negative curvature of single-membrane vesicles or spherules with VRCs (Altan-Bonnet, 2017). In addition, at the replication complex, the TBSV RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) is stimulated upon PE binding (Xu & Nagy, 2015) but inhibited by phosphatidylglycerol.

Although further investigation is needed to identify the particular PC and PE synthesis pathways used by different viruses, the fact that one pathway could supply the physiological function of the other provides the opportunity to develop antivirals targeting the enzymes subverted by viruses, for example, cho2.

Enteroviruses and other enveloped viruses accumulate phosphatidylserine (PS) at VRC subdomains (Amara & Mercer, 2015). PS accumulation has been usually associated to PS receptor-dependent uptake or "apoptotic mimicry," as we discuss below.

2.1.2 | Regulation of lipid rafts and cholesterol synthesis

The cholesterol and SL content in biological membranes defines important physical and biological properties. These lipids do not homogeneously distribute in membranes but together constitute detergent-resistant domains or lipid rafts, which are involved in membrane trafficking and cell signalling.

Cholesterol is a critical membrane component that determines membrane fluidity, helps to stabilise the curvature and packing defects of membranes, and regulates the formation and function of membrane-bound complexes of lipids and proteins. Viruses take advantage of these properties to make specialised membrane platforms for RNA replication and virus assembly.

Lipid rafts have been proven to participate in key steps of the life of viruses, such as entry, RNA translation, virus progeny assembly, and egress (Shahsavandi, Ebrahimi, & Hasaninejad Farahani, 2017). For some arboviruses, cholesterol plays an important role in the process of virus entry into cells. For example, the Gc structural protein of Rift Valley fever virus directly recognises and binds to GPLs at the plasma membrane. Insertion of Gc is followed by accumulation of cholesterol and local membrane reorganisation (Guardado-Calvo et al., 2017). Depletion of cholesterol and consequent disruption of lipid rafts by methyl-β-cyclodextrin (MβCD) decreased the infectivity of Newcastle disease virus, WNV, HCV, and bovine parainfluenza virus, mainly through blocking virus entry into cells (Kapadia, Barth, Baumert, McKeating, & Chisari, 2007; Li, Yu, & Hou, 2017; Mackenzie, Khromykh, & Parton, 2007; Martin, Holguera, Sanchez-Felipe, Villar, & Munoz-Barroso, 2012). During influenza A and syncitial virus infections, a similar effect has been observed after treatment with gemfribrozil (Bajimaya, Frankl, Hayashi, & Takimoto, 2017) and with a natural elder fruit extract (Shahsavandi et al., 2017).

Cholesterol, PI 4-phosphate (PI4P), and PE concentrate also in membranes of VRCs. VRCs of poliovirus, rhinovirus, and Coxsackievirus B3 accumulate cholesterol (Hsu et al., 2010; Ilnytska et al., 2013; Roulin et al., 2014). To facilitate viral genome replication, WNV modulates host cholesterol homeostasis by redistributing cholesterol-synthesizing enzymes and cellular cholesterol to replication sites (Mackenzie et al., 2007). Moreover, characteristic highly curved nanoperiodic cubic membranes imaged by electron microscopy in cells infected by several (+)ssRNA viruses belonging to the *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, and *Flaviviridae* families are thought to be linked to changes in cell cholesterol metabolism through activation of cellular 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase or HMGCR; Deng, Almsherqi, Ng, & Kohlwein, 2010).

In fact, many viruses are sensitive to inhibitors of HMGCR, the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis. This is the case of statins used for treating hypercholesterolaemia in humans. Statins act by competitively inhibiting HMGCR. Because their molecular structure is similar to HMG-CoA, statins fit into the catalytic active site of the enzyme and compete with the native substrate. This competition reduces the rate by which HMGCR produces mevalonate, the next molecule in the cascade that eventually generates cholesterol (Stancu & Sima, 2001). Thus, statins deplete cholesterol and disrupt lipid rafts. For example, WNV, DENV, and TBSV are inhibited by lovastatin (Mackenzie et al., 2007; Rothwell et al., 2009; Sharma, Sasvari, & Nagy, 2010; Soto-Acosta, Bautista-Carbajal, Cervantes-Salazar, Angel-Ambrocio, & Del Angel, 2017), and DENV and human immunodeficiency virus-1 are inhibited by simvastatin (Bryan-Marrugo et al., 2016; DeLucia, Rinaldo, & Rappocciolo, 2018). HCV is also sensitive to different statins (Amemiya et al., 2008; Kim et al., 2007; Rao & Pandya, 2011).

2.1.3 | Regulation of sphingolipid synthesis

Lipidomics studies have shown an increase in the content of ceramide (Cer) and SM in flavivirus-infected cells. Cer has specifically been associated with WNV replication and viral particle biogenesis. SM is enriched in VRC membranes of viruses phylogenetically related to WNV, such as DENV and HCV (Martin-Acebes et al., 2016).

HCV RdRp is activated by SM binding. Twenty SM molecules interact with a specific binding domain in the structure of HCV RdRp and change the conformation of its catalytic pocket leading to RNA recruitment and replication (Weng et al., 2010).

Inhibition of different enzymes that mediate SL biosynthesis decreases infectivity of different viruses. De novo synthesis of SLs initiates at the ER with the synthesis of sphinganine from palmitoyl-CoA and serine by the enzyme serine palmitoyltransferase. Three inhibitors of serine palmitoyltransferase have been described to present antiviral activity against HCV, hepatitis B virus, and WNV: ISP-1, myriocin, and NA255 (Aizaki et al., 2008; Aktepe, Pham, & Mackenzie, 2015; Amemiya et al., 2008; Sakamoto et al., 2005; Tatematsu, Tanaka, Sugiyama, Sudoh, & Mizokami, 2011; Weng et al., 2010). Then, sphinganine is acylated and transformed into Cer by the Cer synthase. Cer is then delivered to the Golgi complex, where it is converted into SM by the SM synthase or into complex glycosphingolipids by the uridine diphosphate–glucose Cer synthase. Pharmacological inhibition of SM synthase with D609, SPK-601, and MS-209 or inhibition of uridine diphosphate–glucose Cer synthase by N-Butyldeoxynojirimycin (NB-DMJ) and D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP), respectively, reduced the infectivity of HCV and WNV (Khan et al., 2014; Martin-Acebes et al., 2016). Inhibition of Cer synthase by fumonisin B1 also impairs WNV replication (Aktepe et al., 2015). As observed, viruses of the *Flaviviridae* have been found to be the most sensitive to SL biosynthesis blockage.

Other lipid biosynthetic enzymes have been associated with viral infections. For example, HCV takes advantage of three lipid synthesis enzymes, which are related to the biogenesis and maintenance of cellular lipid droplets (LDs). LDs are dynamic organelles enriched in triglycerides and cholesterol esters that regulate the storage and hydrolysis of neutral lipids and participate in lipid energy balance and signalling, cell immunity, protein storage, and trafficking (Welte, 2015). After replication, HCV proteins are targeted to LD, where virus assembly takes place. Pharmacological inhibition of long-chain acyl-CoA synthetase, diacylglycerol acyltransferase 1, and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase results in the blockade of virion assembly and egress (Herker et al., 2010; Liefhebber, Hague, Zhang, Wakelam, & McLauchlan, 2014). Targeting synthesis of lipids stored at LDs

might be an alternative for therapeutic treatment of chronic HCV infection. Other host factor involved in the recruitment of HCV to LD is the lipid-modifying phospholipase PLA2G4A (Menzel, 2012). Picornaviruses have also been shown to utilise a different A2 phospholipase, the PLA2G16. In this case, the enzyme assists in genome delivery from virions into the cytoplasm after entry in cells (Staring et al., 2017).

2.2 | Interfering with lipid-mediated signalling

PI-related lipids have recently emerged as signalling molecules involved in nearly all aspects of cellular regulation. The production of PI4P has been described to play a key regulatory role for a wide range of cellular activities, including membrane trafficking and biogenesis, via the recruitment of effector proteins related to lipid biosynthesis and transport.

The major pool of PI4P is synthesized in Golgi membranes by PI 4-kinases type 3 (PI4KIII), distinguishing two different isoforms PI4PIIIα and PI4PIIIβ. Many different viruses exploit host PI4KIII kinases. For example, HCV, some enteroviruses, and picornaviruses stimulate PI4 kinases to generate PI4P in situ at replication sites. This local increase of PI4P has significant impact on membrane remodelling, assembly of VRCs, and viral genome replication. HCV nonstructural protein NS5A and encephalomyocarditis virus (EMCV) nonstructural protein 3A recruit and activate PI4KIIIα (Dorobantu et al., 2015; Reiss et al., 2011). However, enteroviruses use their 3A nonstructural protein to recruit PI4KIIIβ to VRCs (Hsu et al., 2010).

PI4KIIIβ is a specific target of protein kinase inhibitors such as enviroxime-like compounds. Enviroxime, GW5074, and T-00127-HEV are used as antipoliovirus compounds (Arita et al., 2011), and other synthetic enviroxime-related compounds as GSK2998533A and BF738735 (Arita et al., 2011; Roulin et al., 2014) are broad-spectrum antivirals against different enteroviruses.

On the other hand, pharmacological inhibition of PI4KIIIα by AL-9 decreases infectivity of Saffold virus 3, EMCV, and HCV (Dorobantu et al., 2015). Tyrphostin AG1478, a known epidermal growth factor receptor inhibitor and an anticancer chemotherapy agent, also inhibits PI4KIIIα activity in both in vitro and cell cultures and impairs replication of EMCV and HCV (Dorobantu et al., 2016).

In contrast, PIK93 inhibits both PI4KIIIβ and PI4PIIIα isoforms. This compound is efficient against enteroviruses, including poliovirus and Coxsackievirus B3, human rhinoviruses (Arita, 2014; Arita et al., 2011; Roulin et al., 2014), and HCV (Hsu et al., 2010). The PIK93 lack of specificity for PI4KIII isoforms and the fact that it inhibits PI3Ks at high concentrations raise concern about its use as an antiviral agent (Bishe, Syed, & Siddiqui, 2012). Although in vitro studies have not found significant problems with cellular viability, some in vivo studies have shown that animals treated with PIK93 and other related small PI4Ks inhibitors suffered from adverse effects. However, given that PI4KIII kinases are used by many different viruses, they are attractive targets for the development of broad-spectrum antivirals. PI4KIII inhibitors with less toxicity and cross-reactivity with other cellular kinases are currently under consideration (Rutaganira et al., 2016; van der Schaar et al., 2013).

2.3 | Interfering with lipid trafficking at membrane contact sites

In most instances, proteins are delivered to their final destination in particular membranes by vesicular shuttles that originate at the ER and follow the secretory pathway. However, for many lipids, there are nonvesicular modes of transport. These are faster than vesicular trafficking and produce local lipid enrichment and considerable asymmetries in the lipid composition of membranes. Nonvesicular transport also ensures the supply of lipids to organelles out of the secretory pathway, such as mitochondria. Because lipids are insoluble in water, during nonvesicular transport, they are shielded from the water-rich cytoplasm by proteins that hold them in an internal hydrophobic pocket. Such lipid transfer proteins (LTPs) often act in regions in which one organelle comes ~30 nm away from another membrane, the so-called MCSs (Wong, Copic, & Levine, 2017). Plants induce LTPs' expression and secretion as a defence mechanism against pathogens (Kushwaha, Singh, Basu, & Chakraborty, 2015; Ooi et al., 2008; Park et al., 2002; Sohal, Pallas, & Jenkins, 1999). On the other hand, animal viruses hijack LTPs that mobilise cholesterol and SLs to build their replication neo-organelles. The best documented cases are described in the next sections.

2.3.1 | Oxysterol-binding protein

Oxysterol-binding protein (OSBP) exchanges PI4P and cholesterol at MCSs between Golgi apparatus and ER. Transport of cholesterol by OSBP is highly dependent on PI4KIII activity and PI4P levels at Golgi membranes. PI4KIIIs synthesize PI4P on the surface of Golgi membranes, and PI4P lipids serve as an anchor for OSBP, which drives transport and accumulation of cholesterol.

Different viruses belonging to the *Picornaviridae* family such as enterovirus, poliovirus, and EMCV, as well as HCV, another positive stranded nonrelated virus, use the so-called PI4KIII–PI4P–OSBP pathway (Arita, 2014; van der Schaar et al., 2016).

Due to the observation that deleting OSBP does not compromise cellular viability, most probably because other redundant LTPs could make up for its function, the interest in studying OSBP as a target for broad-spectrum antivirals has grown. To date, three different drugs have been developed for specifically inhibiting OSBP. Itraconazole, OSW-1, and TTP-8307 bind to the OSBP hydrophobic pocket and compete with cholesterol. They have been successfully tested against enterovirus, EMCV, and HCV (Albulescu et al., 2015; Albulescu et al., 2017; Strating et al., 2015; Wang et al., 2014).

2.3.2 | Ceramide transfer protein and four-phosphate adaptor protein 2

Both Cer transfer protein (CERT) and four-phosphate adaptor protein 2 (FAPP2) mediate the traffic of SL precursors. Because these LTPs accumulate SLs at the replication sites, they are good targets to interfere with flaviviruses. CERT is responsible for transferring Cer from ER to Golgi where synthesis of complex SLs takes place (Hanada et al., 2003). CERT is necessary for HCV egress (Bishe et al., 2012), and its pharmacological inhibition with the synthetic compound HPA-12

dramatically impairs HCV release (Aizaki et al., 2008; Yasuda et al., 2001). Moreover, CERT and OSBP are regulated by protein kinase D, so that phosphorylated forms of both LTPs are inactive (Amako, Syed, & Siddiqui, 2011). Drugs interfering with host protein kinase D such as CRT0066101, a PKD-specific small-molecule inhibitor (Harikumar et al., 2010), might become efficient antivirals.

The FAPP2 docks the Golgi through PI4P and shuttles glucosylceramide (Godi et al., 2004), a substrate of a subset of complex glycosphingolipids. FAPP2 localizes to HCV replication sites and mediates the accumulation of lactosylceramide at the VRCs. FAPP2 depletion disrupts HCV replication complexes and impairs HCV replication (Khan et al., 2014).

2.3.3 | Niemann–Pick type C1 protein

Niemann–Pick type C1 protein (NPC1) was discovered while studying a human neurodegenerative disease characterized by the disruption of subcellular cholesterol transport. NPC1 is a glycoprotein with 13 transmembrane domains that localizes to late endosomes and transiently in lysosomes and *trans*-Golgi network. NPC1 acts in tandem with NPC2 to carry out the transfer of extracellular and recycled free cholesterol from the endosomal/lysosomal system to *trans*-Golgi network and ER (Ioannou, 2000). NPC1 is the cell receptor of Ebola virus, Marburg virus, and other filoviruses (Carette et al., 2011). U18666A has been developed as a specific inhibitor of NPC1 (Lu et al., 2015). The administration of U18666A and other multiple cationic amphiphiles induces the accumulation of cholesterol in endosomes and lysosomes and inhibits Ebola entry and infection (Shoemaker et al., 2013).

Targeting NPC1 also impairs the replication of other RNA viruses such as DENV (Poh et al., 2012) and hepatitis E virus (Yin, Ambardekar, Lu, & Feng, 2016). NPC1 has not been found to be the cellular receptor for these viruses, so the adverse effects on viral replication after treatment with U18666A or NPC1 depletion must be due to effects at a postentry step.

In the case of HCV, which takes advantage of the cellular endosomal and exosomal pathways to egress from the host cell, U18666A blocks the release of viral particles by inhibiting NPC1 and therefore the transport and functionality of multivesicular bodies. This leads to an accumulation of mature viral particles in exosomes. Moreover, U18666A leads to the formation of large dysfunctional lysosome-like structures that mediate the degradation of these viral particles (Elgner et al., 2016).

2.4 | Viral apoptosis mimicry

PS is an anionic phospholipid usually oriented to the cytosolic side of the plasma membrane. Under pathological and cellular stress situations, PS molecules are flipped and exposed on the cell surface, serving like an alert flag for detection by the immune system. PS exposure has been linked to apoptosis, infections, and cancer (Birge et al., 2016).

PS anionic lipids are present in the membranes of many enveloped RNA viruses, including DENV, WNV, chikungunya, Ebola, Lassa fever virus, human immunodeficiency virus, and DNA viruses such as vaccinia. PS-enriched envelopes of viruses are recognised by cell surface PS receptors that mediate virus uptake in a process known as viral apoptosis mimicry (Amara & Mercer, 2015).

Exposed anionic phospholipids on infected cells may provide a new target for the generation of antiviral agents against multiple classes of viruses (Soares, King, & Thorpe, 2008). Bavituximab, a PS-targeting monoclonal antibody, successfully blocks infectivity of enveloped viruses such as Ebola and Lassa fever viruses in in vitro assays and in small animal models (Dowall et al., 2015; Soares et al., 2008).

The molecular mechanism by which PS is accumulated into viral budding sites in not yet well understood. Recently, the OSBP-related proteins ORP5 and ORP8 have been shown to facilitate the PS/PI4P exchange at ER–plasma membrane MCSs (Chung et al., 2015). Another study suggests that the phospholipid scramblase-1, a calcium-responsive enzyme that flips PS between membrane leaflets, might participate in PS extracellular exposure in cells infected with herpes virus. Inhibition of phospholipid scramblase-1 with its antagonist R5421 prevents the virus-induced exposure of PS on the cell surface and reduces virus infection (Cheshenko, Pierce, & Herold, 2018).

3 | BACTERIA

Bacteria have developed a number of strategies to modify host lipids during infection. The nature and effects of these changes are not fully understood, but it is known that some bacteria manipulate lipids to survive inside eukaryotic cells or to spread by triggering cell death (Toledo & Benach, 2015). Signalling cascades related to cholesterol, SLs, and phosphoinositides are particularly relevant during bacterial infections. Many different bacteria need cholesterol for entering cells or building neo-organelles (Stehr, Elamin, & Singh, 2012). However, bacteria cannot synthetize cholesterol and need to obtain it from the infected cell. Acid sphingomyelinase (Asm) is one of the hydrolases that generates Cer from SM. Asm activation produces Cer-enriched domains in the plasma membrane that are used by bacteria for entering cells or to trigger apoptosis. On the other hand, Asm is also crucially involved in the host response against pathogenic bacteria. Finally, phosphoinositides (PtdIns) and related enzymes control many processes including vesicular trafficking, actin polymerisation, and different signalling cascades that can modify membranes during phagocytosis or activate the endocytic pathway. Bacteria hijack all these pathways together with LTPs.

Here, we summarise the strategies used by different pathogenic bacteria to subvert lipid synthesis and transport. Targeting these pathways can generate new efficient antibiotics (summarised in Figures 1 and 2).

3.1 | Regulation of lipid biosynthesis

3.1.1 | Cholesterol and lipid rafts

De novo cholesterol biosynthesis occurs in the ER, with the conversion of HMG-CoA to mevalonate by HMGCR. Cellular cholesterol levels can also be increased by the uptake of cholesterol bound to low-density lipoprotein (LDL) via the LDL receptor. When cellular

cholesterol levels are high, it can be transported out of the cell, broken down into bile acids or steroids, or esterified and stored in LDs. In eukaryotic cells, cholesterol and SLs are the main components of membrane microdomains known as lipid rafts. These microdomains that contain tightly packed receptor clusters and other signalling proteins are involved in many signal transduction pathways.

Anaplasma phagocytophilum and *Brucella* species enter cells in a lipid raft-dependent manner (Naroeni & Porte, 2002; Xiong, Lin, & Rikihisa, 2009). Pharmacological disruption of cholesterol flows impairs the assembly of lipid rafts. Thus, treatment with U18666A (Xiong & Rikihisa, 2012), ketoconazole, or filipin III (Watarai et al., 2002; Watarai, Makino, Fujii, Okamoto, & Shirahata, 2002) makes these bacteria incapable of infecting cells. *Chlamydia* has developed different strategies to incorporate lipids via vesicular and nonvesicular transport (Hackstadt, Scidmore, & Rockey, 1995; Hatch & McClarty, 1998; Wylie, Hatch, & McClarty, 1997). Cholesterol depletion with MβCD (Jutras, Abrami, & Dautry-Varsat, 2003; Korhonen et al., 2012), simvastatin (Erkkila et al., 2005), U18666A (Beatty, 2006), and an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor (Peters & Byrne, 2015) have shown that elementary bodies, the extracellular infectious stage of *Chlamydia*, attaches to cholesterol-rich sites at the plasma membrane. However, the importance of lipid rafts in *Chlamydia* entry is a matter of controversy because some studies have shown that *Chlamydia* can enter cells in a way that does not depend on lipid rafts (Gabel, Elwell, van Ijzendoorn, & Engel, 2004; Norkin, Wolfrom, & Stuart, 2001). Contradictory results can be attributed to studies with various bacterial isolates and different host cells.

After entering cells, *A. phagocytophilum*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Chlamydia*, and *Coxiella burnetii* establish their replicative inclusions in membrane-bound compartments derived from phagosomes or organelles of the endocytic pathway (Alpuche-Aranda, Berthiaume, Mock, Swanson, & Miller, 1995; Heinzen, Scidmore, Rockey, & Hackstadt, 1996; Niu, Yamaguchi, & Rikihisa, 2008; Oh et al., 1996). Although these bacteria lack the genes for cholesterol biosynthesis, cholesterol content increases in infected cells. In particular, *Chlamydia* spp., *C. burnetii*, and *A. phagocytophilum* modulate host cholesterol homeostasis at the level of gene transcription, such as the LDL receptor or the HMGCR (Gilk, 2012; Lin & Rikihisa, 2003). *Chlamydia* downregulates cholesterol efflux and requires de novo cholesterol synthesis (Bashmakov, Zigangirova, Pashko, Kapotina, & Petyaev, 2010), whereas *A. phagocytophilum* alters LDL uptake by infected cells and causes a twofold increase of their cholesterol content (Xiong et al., 2009). *C. burnetii* increases the cholesterol content of infected cells by 70% (Czyz et al., 2014; Howe & Heinzen, 2006). During early stages of infection, the inclusion membrane of *C. burnetii* has low levels of cholesterol, but at later stages, the amount of cholesterol increases, which suggests a temporal regulation of cholesterol biosynthesis and uptake. *C. burnetii* has been shown to be sensitive to the treatment with statins (Howe & Heinzen, 2006). *Mycobacterium* and *Salmonella* do not need lipid rafts for entry, but intracellular cholesterol is important for infection. As mentioned above, *Mycobacterium* cannot synthesize cholesterol and needs to obtain cholesterol from the host through alternative means such as the *mce4* gene cluster and the ABC-like-ATP-dependent system that import cholesterol into bacteria. Disrupting cholesterol metabolism diminishes *Mycobacterium* entry (Kaul, Anand, & Verma, 2004), replication (de Chastellier & Thilo, 2006; Miner, Chang, Pandey, Sassetti, & Sherman, 2009; Mohn et al., 2008; Parihar et al., 2014; Russell, Cardona, Kim, Allain, & Altare, 2009), and subsequent stages of infection (Nesbitt et al., 2010; Pandey & Sassetti, 2008). *Salmonella* uses the pathogenicity island 1 and 2 type III secretion systems that localize in the lumen of the inclusion, where they mediate the esterification of cholesterol (Haraga, Ohlson, & Miller, 2008; Nawabi, Catron, & Haldar, 2008). Pharmacological disruption of cholesterol with statins (Catron et al., 2004) or MβCD (Huang, 2011) reduces intracellular *Salmonella* growth. Other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (Kowalski & Pier, 2004), *Staphylococcus pneumoniae* (Bergman et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (Jerwood & Cohen, 2008), *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* (Al-Kuraishy, Al-Gareeb, & Al-Buhadily, 2018) are also susceptible to the treatment with statins. Pharmacological inhibition of cholesterol and genetic depletion experiments confirmed that targeting cholesterol can lead to efficient strategies against all these bacteria by reducing entry and replication in host cells.

3.1.2 | Sphingolipid and phospholipid synthesis

Although incorporation of Cer to lipid rafts is essential for the initiation of cell defence against pathogens such as *Salmonella* (Huang, 2016; McCollister, Myers, Jones-Carson, Voelker, & Vazquez-Torres, 2007), this process is used by some bacteria to infect cells. During *Mycobacterium* infection, Asm contributes to the fusion of the *Mycobacterium*-containing vacuole with the phagosome, a process that mediates the elimination of bacteria (Vazquez et al., 2016). *Mycobacterium* avoids this host defence via PI signalling. Thus, *Mycobacterium tuberculosis* synthesizes glycosylated phosphoinositides such as mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM; Beatty et al., 2000; Fratti, Chua, Vergne, & Deretic, 2003). Furthermore, the phosphatase activity of SapM, MptpB, and MptpA reduces the amount of PtdIns(3)P on the *Mycobacterium*-containing vacuole surface (Chua & Deretic, 2004). Both ManLAM and phosphatase effectors interfere with phagosomal maturation and degradation of bacteria (Castandet et al., 2005; Singh et al., 2003). Interestingly, Asm is also important for *Mycobacterium* infection. Pharmacological inhibition of Asm with imipramine (Godbole et al., 2015) and infection in Asm-deficient mice (Utermohlen, Herz, Schramm, & Kronke, 2008) showed that the growth of *M. tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, and *Mycobacterium avium* was blocked. Moreover, Asm-deficient mice were more resistant to *Mycobacterium* lethal infection than wild-type mice. Additionally, both *Neisseria* and *Pseudomonas* trigger Asm activation, Cer release, and the assembly of Cer-enriched rafts that are essential for infection (Grassme et al., 1997; Grassme et al., 2003; Hauck et al., 2000). Cer-enriched platforms serve as scaffold for the recruitment of cellular receptors such as the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, used by *Pseudomonas* to enter cells (Schroeder et al., 2002). Deficiency of Asm and specific pharmacological inhibition blocked *Neisseria* (Grassme et al., 1997; Hauck et al., 2000; Simonis, Hebling, Gulbins, Schneider-Schaulies, & Schubert-Unkmeir, 2014) and *Pseudomonas* (Becker et al., 2010; Cremesti et al., 2001; Riethmuller et al., 2009) entry and infection. Asm inhibitors were also effective against other bacteria such as *S. aureus* (Peng et al., 2015)

and *E. coli* (Falcone et al., 2004), demonstrating their potential as broad-spectrum antibiotics.

Chlamydia incorporates lipid storage organelles into the inclusion lumen (Cocchiaro, Kumar, Fischer, Hackstadt, & Valdivia, 2008), and it has its own machinery to synthetize GPLs such as PE, phosphatidylglycerol, and PS but needs to hijack other host-derived lipids such as FAs. *Chlamydia* also needs to transport cholesterol and SLs to the bacterial cell wall (Yao, Cherian, Frank, & Rock, 2015; Yao, Dodson, Frank, & Rock, 2015). There is a close association between Golgi apparatus, where SM is synthetized, and *Chlamydia* inclusions. *Chlamydia* intercepts the exocytic transport of SM-containing vesicles and redirects them to the inclusions (Wolf & Hackstadt, 2001). For this purpose, *Chlamydia* also uses the CERT whose role in infection will be discussed below.

3.2 | Interfering with lipid-mediated signalling

PI-related lipids are signalling molecules involved in a wide range of cellular processes such as eukaryotic signal transduction, cytoskeleton rearrangement, and membrane dynamics. The plasma membrane is enriched in PI(4,5)P2 and PI(4)P, phagosomes and early endosomes are enriched in PI(3)P, and multivesicular bodies and late endosomes contain PI(3)P and PI(3,5)P2. Bacteria subvert PtdIns flows by encoding enzymes, principally phosphatases, and by altering the expression or localization of host proteins that modulate PI intracellular levels. The presence of different species of lipids on the surface of bacterial inclusions creates an optimal micro-environment for recruiting specific proteins, shooting signalling cascades, and avoiding cellular defences.

Two mayor signalling cascades have been proposed for *Listeria* invasion (Mengaud et al., 1996; Shen, Naujokas, Park, & Ireton, 2000). These two pathways depend on virulence factors InlA or InlB. InlB interaction with its natural receptor Met (Marino, Braun, Cossart, & Ghosh, 1999; Shen et al., 2000) triggers the activation and translocation of PI3KIA to *Listeria monocytogenes* entry site. The subsequent signalling cascade produces an increase in lipid products, in particular PI(3,4,5)P3 (Ireton et al., 1996; Ireton, Payrastre, & Cossart, 1999) that recruits effectors for actin reorganisation. PI3K cascade and cytoskeletal rearrangements are critical for *L. monocytogenes* invasion, and that is why PI3K inhibitors such as wortmannin and LY294002 block infection (Ireton et al., 1996). During *Shigella* infection, the sites of internalisation colocalize with PI(5)P, which is produced with the participation of the bacterial phosphatase IpgD. The accumulation of PI5P at the plasma membrane reduces tether forces and favours entry. When PI3KI–AKT pathway is activated, the regulation of antiapoptotic effectors is triggered. However, blocking PI3K with wortmannin does not affect *Shigella* entry, suggesting that PI3KI activity is not involved in invasion but in later steps of infection (Lafont, Tran Van Nhieu, Hanada, Sansonetti, & van der Goot, 2002; Pendaries et al., 2006). *A. phagocytophilum* also takes advantage of the PI3K–AKT pathway to delay apoptosis, something observed in experiments of PI3K pharmacological inhibition with LY294002 (Khanal, Sultana, Catravas, Carlyon, & Neelakanta, 2017; Sarkar et al., 2012). *Brucella* also requires both PI3KI and PI3KII activity for entering the cell and replicate (Guzman-Verri et al., 2001). *Salmonella* can modulate PI-derived signalling at different stages of infection via the bacterial phosphatase effector SopB. By a not well-understood SopB-dependent process, PI3KI converts PI(4,5)P2 to PI(3,4,5)P3 at the plasma membrane and produces a double effect: First, the reduction of interactions between membrane and cytoskeleton leads to bacterial invasion (Terebiznik et al., 2002), and second, the recruitment of AKT activates cell survival pathways that avoid apoptosis. SopB also reduces PI(4,5)P2 and PS levels on the *Salmonella* vacuole surface, where charge diminishes avoiding the fusion with lysosomes (Bakowski et al., 2010). Another essential SopB function for *Salmonella* replication is the recruitment of Rab5 and PI3KIII to the inclusion surface, which is required to maintain high levels of PI(3)P (Bujny et al., 2008; Hernandez, Hueffer, Wenk, & Galan, 2004). Two studies (Auweter et al., 2011; Auweter, Yu, Arena, Guttman, & Finlay, 2012) showed that SseL, another *Salmonella* effector, interacts with the lipid transfer protein OSBP and enhances *Salmonella* replication, probably by modifying the lipid composition of the replicative vacuole. In contrast, *Mycobacterium* alters PI(3)P levels by a dual strategy. *Mycobacterium* encodes different phosphatase effectors to arrest phagosomal maturation and avoid its elimination by reducing the amount of PI(3)P on the *Mycobacterium* inclusion surface (Castandet et al., 2005; Singh et al., 2003). *Mycobacterium* also expresses a glycosylated PI analogue, the ManLAM, that inhibits the activation of PI3KIII, the kinase involved in PI(3)P production.

Chlamydia activates phosphoinositide-dependent signalling pathways such as PDPK1-MYC (Al-Zeer et al., 2017) and PI3K-AKT (Zou et al., 2018) to favour infection and survival. PI4KII has been shown to be important for *Chlamydia* and *Listeria* infection. In addition to PI3K, the activation of PI4KII is required for *Listeria* invasion, and its blockade impairs entry without perturbing the plasma membrane content in PI (4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 (Pizarro-Cerda et al., 2007). Although the participation of PI4K in *Listeria* infection is not well understood, these results suggest a postentry signalling role. *Legionella* modifies PI flows with a number of effectors that interfere with endocytic and secretory pathways and with communication with the ER. *Legionella pneumophila* hijacks PC and diacylglycerol on the *Legionella*-containing vacuole membrane (Viner, Chetrit, Ehrlich, & Segal, 2012). Furthermore, it is known that *L. pneumophila* enriches its inclusion membrane with PI(4)P in a PI4KIII-dependent manner (Brombacher et al., 2009; Weber, Ragaz, Reus, Nyfeler, & Hilbi, 2006). Additionally, treatment with the PI4KIII inhibitor PIK93 reduces *L. pneumophila* replication (Hubber et al., 2014), confirming the importance of the PI4Ks in *Legionella* infection. However, the requirement of PI3K in *L. pneumophila* entry and replication has been a matter of debate (Charpentier et al., 2009; Khelef, Shuman, & Maxfield, 2001; Tachado, Samrakandi, & Cirillo, 2008; Weber et al., 2006). *Chlamydia* recruits PI4KIIα, has high levels of PI4P in the membrane inclusion, and recruits the lipid transfer protein OSBP in a PI4P-dependent way. Although its role is still unclear, OSBP probably participates in inclusion membrane remodelling by modifying its lipid composition (Moorhead, Jung, Smirnov, Kaufer, & Scidmore, 2010), something that could make *Chlamydia* sensitive to inhibitors of OSBP.

3.3 | Interfering with lipid trafficking

Although little is known about how bacteria interfere with lipid trafficking, it has been reported that some bacteria hijack LTPs. The best documented cases are described below.

3.3.1 | Niemann–Pick type C1 protein

Pharmacological inhibition and genetic deficiency studies showed that NPC1 is used by *A. phagocytophilum* and *Brucella*. Recruitment of NPC1 produces an accumulation of cholesterol in the inclusions of *A. phagocytophilum*. Moreover, treatment with the NPC1 inhibitor U18666A blocks the transport of cholesterol to the bacterial inclusion and stops bacterial growth, evidencing the essential role of this LTP in infection (Xiong et al., 2009; Xiong & Rikihisa, 2012). In the case of *Brucella*, lipid rafts are important for the entry of bacteria in the host cell (Watarai, Makino, Michikawa, et al., 2002). Because NPC1 is important for the maintenance of cholesterol-rich lipid rafts, targeting NPC1 blocks *Brucella* infection. Therefore, NPC1-deficient mice are resistant to *Brucella* infection (Watarai, Makino, Fujii, et al., 2002). U18666A is efficient also against *C. burnetii* and *Chlamydia trachomatis* (Beatty, 2006; Howe & Heinzen, 2006), but the role of NPC1 in infection is still unknown.

3.3.2 | Ceramide transfer protein

As mentioned before, CERT transports Cer from the ER membrane to the Golgi apparatus where the SM synthase 1 transforms it into SM. *Chlamydia* cannot synthesize SLs that are essential for the biogenesis of bacterial inclusions and replication of bacteria (van Ooij et al., 2000). Cryo-electron microscopy and immunogold labelling showed that CERT is recruited to bacterial inclusions. *Chlamydia* uses CERT to transport Cer from the ER to the bacterial inclusion for SM synthesis (Derre, Swiss, & Agaisse, 2011; Elwell et al., 2011). SM then incorporates into the inclusion membrane and the bacterial cell wall. The compound HPA-12 has been reported as a specific CERT inhibitor. However, in CERT-knockout cells, SL transport still works, and HPA-12 strongly impairs this transport (Carabeo, Mead, & Hackstadt, 2003; Elwell et al., 2011; Koch-Edelmann et al., 2017). These results suggest that HPA-12 is an inhibitor of Cer transporters other than CERT.

3.3.3 | Oxysterol-binding protein-related protein 1

Oxysterol-binding protein-related protein 1 (ORP1L) belongs to the OSBP-related protein family. ORP1L acts as a cholesterol sensor that modulates the formation of MCSs between the late endosomes and the ER. It has been recently reported that *Coxiella* recruits ORP1L to MCSs formed between the bacterial inclusion and the ER, which is followed by changes in the membrane properties of the inclusion vacuole (Justis et al., 2017; Wallqvist et al., 2017). ORP1L attaches to the *Coxiella*-containing vacuole membrane through its N-terminal ankyrin repeats that are involved in protein–protein interactions, but the specific function of ORP1L in the infection is still unclear.

4 | CONCLUSIONS

Therapeutic approaches based on specific factors of host–pathogen interactions are a promising avenue to overcome treatment failure in infectious diseases. Lipids are gaining importance as targets for antiviral and antibiotic development. Because many viruses and bacteria use lipids to build neo-organelles for replication and persistence, inhibitors of the synthesis of cholesterol, Cer, SLs, FAs, and phospholipids interfere with growth of many pathogens. Besides, drugs against protein kinases target signalling pathways needed for infection. Figures 1 and 2 summarise current knowledge on host lipid synthesis, transport, and signalling pathways used by viruses and bacteria. Compounds that interfere with these pathways may become efficient antivirals or antibiotics. Moreover, drugs tested against viruses might be efficient also against bacteria and vice versa. Notably, targeting lipid transport may produce less toxic antivirals and antibiotics as intracellular pathogens depend on specific LTPs for making their neo-organelles, although cells may have more than one LTP for the same function. Within this context, high-throughput screening of clinically tested compounds will provide a rapid means to identify undiscovered, antiviral, and antibiotic functions for well-characterized molecules that target lipid metabolism and flows.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by Contract BES-2016-078317 for predoctoral fellows (to A. F.- O.) and Research Grant BIO2015-68758-R (to C. R.) from the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain. The authors thank Dr R. Tenorio for critically revising the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare to have no conflicts of interest.

ORCID

Alberto Fernández-Oliva https://orcid.org/0000-0002-2079-2362
Paula Ortega-González https://orcid.org/0000-0003-2882-3271
Cristina Risco https://orcid.org/0000-0001-7501-5934

REFERENCES

Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., … Suzuki, T. (2008). Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, *82*, 5715–5724. https://doi.org/10.1128/JVI.02530-07

Aktepe, T. E., Pham, H., & Mackenzie, J. M. (2015). Differential utilisation of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology*, *484*, 241–250. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.06.015

Albulescu, L., Bigay, J., Biswas, B., Weber-Boyvat, M., Dorobantu, C. M., Delang, L., … Strating, J. R. P. M. (2017). Uncovering oxysterol-binding protein (OSBP) as a target of the anti-enteroviral compound TTP-8307. *Antiviral Research*, *140*, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.01.008

Albulescu, L., Strating, J. R., Thibaut, H. J., van der Linden, L., Shair, M. D., Neyts, J., & van Kuppeveld, F. J. (2015). Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP. *Antiviral Research*, *117*, 110–114. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.02.013

Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., & Al-Buhadily, A. K. (2018). Rosuvastatin as forthcoming antibiotic or as adjuvant additive agent: In vitro novel antibacterial study. *Journal of Laboratory Physicians*, *10*, 271–275. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_170_17

Alpuche-Aranda, C. M., Berthiaume, E. P., Mock, B., Swanson, J. A., & Miller, S. I. (1995). Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infection and Immunity*, *63*, 4456–4462.

Altan-Bonnet, N. (2017). Lipid tales of viral replication and transmission. *Trends in Cell Biology*, *27*, 201–213. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.011

Al-Zeer, M. A., Xavier, A., Abu Lubad, M., Sigulla, J., Kessler, M., Hurwitz, R., & Meyer, T. F. (2017). *Chlamydia trachomatis* prevents apoptosis via activation of PDPK1-MYC and enhanced mitochondrial binding of hexokinase II. *eBioMedicine*, *23*, 100–110. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.005

Amako, Y., Syed, G. H., & Siddiqui, A. (2011). Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 11265–11274. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182097

Amara, A., & Mercer, J. (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*, 461–469. https://doi.org/10.1038/nrmicro3469

Amemiya, F., Maekawa, S., Itakura, Y., Kanayama, A., Matsui, A., Takano, S., … Enomoto, N. (2008). Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(3), 361–370. https://doi.org/10.1086/525287

Arita, M. (2014). Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure. *Microbiology and Immunology*, *58*, 239–256. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12144

Arita, M., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Wakita, T., & Shimizu, H. (2011). Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *Journal of Virology*, *85*, 2364–2372. https://doi.org/10.1128/JVI.02249-10

Auweter, S. D., Bhavsar, A. P., de Hoog, C. L., Li, Y., Chan, Y. A., van der Heijden, J., … Finlay, B. B. (2011). Quantitative mass spectrometry catalogues *Salmonella* pathogenicity island-2 effectors and identifies their cognate host binding partners. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 24023–24035. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224600

Auweter, S. D., Yu, H. B., Arena, E. T., Guttman, J. A., & Finlay, B. B. (2012). Oxysterol-binding protein (OSBP) enhances replication of intracellular *Salmonella* and binds the *Salmonella* SPI-2 effector SseL via its N-terminus. *Microbes and Infection*, *14*, 148–154. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.09.003

Bajimaya, S., Frankl, T., Hayashi, T., & Takimoto, T. (2017). Cholesterol is required for stability and infectivity of influenza A and respiratory syncytial viruses. *Virology*, *510*, 234–241. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.024

Bakowski, M. A., Braun, V., Lam, G. Y., Yeung, T., Heo, W. D., Meyer, T., et al. (2010). The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host & Microbe*, *7*, 453–462. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.011

Bashmakov, Y. K., Zigangirova, N. A., Pashko, Y. P., Kapotina, L. N., & Petyaev, I. M. (2010). *Chlamydia trachomatis* growth inhibition and restoration of LDL-receptor level in HepG2 cells treated with mevastatin. *Comparative Hepatology*, *9*, 3. https://doi.org/10.1186/1476-5926-9-3

Beatty, W. L. (2006). Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Cell Science*, *119*, 350–359. https://doi.org/10.1242/jcs.02733

Beatty, W. L., Rhoades, E. R., Ullrich, H. J., Chatterjee, D., Heuser, J. E., & Russell, D. G. (2000). Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic*, *1*, 235–247. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010306.x

Becker, K. A., Riethmuller, J., Luth, A., Doring, G., Kleuser, B., & Gulbins, E. (2010). Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *42*, 716–724. https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0174OC

Bergman, P., Linde, C., Putsep, K., Pohanka, A., Normark, S., Henriques-Normark, B., et al. (2011). Studies on the antibacterial effects of statins—In vitro and in vivo. *PLoS One*, *6*, e24394. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024394

Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., … Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death and Differentiation*, *23*, 962–978. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.11

Bishe, B., Syed, G., & Siddiqui, A. (2012). Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses*, *4*, 2340–2358. https://doi.org/10.3390/v4102340

Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S. S., Kami, K., Overduin, M., & Hilbi, H. (2009). Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*, 4846–4856. https://doi.org/10.1074/jbc.M807505200

Bryan-Marrugo, O. L., Arellanos-Soto, D., Rojas-Martinez, A., Barrera-Saldana, H., Ramos-Jimenez, J., Vidaltamayo, R., & Rivas-Estilla, A. M. (2016). The antidengue virus properties of statins may be associated with alterations in the cellular antiviral profile expression. *Molecular Medicine Reports*, *14*, 2155–2163. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5519

Bujny, M. V., Ewels, P. A., Humphrey, S., Attar, N., Jepson, M. A., & Cullen, P. J. (2008). Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *Journal of Cell Science*, *121*, 2027–2036. https://doi.org/10.1242/jcs.018432

Carabeo, R. A., Mead, D. J., & Hackstadt, T. (2003). Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 6771–6776. https://doi.org/10.1073/pnas.1131289100

Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., … Brummelkamp, T. R. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature*, *477*, 340–343. https://doi.org/10.1038/nature10348

Castandet, J., Prost, J. F., Peyron, P., Astarie-Dequeker, C., Anes, E., Cozzone, A. J., … Maridonneau-Parini, I. (2005). Tyrosine phosphatase MptpA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages. *Research in Microbiology*, *156*, 1005–1013. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.013

Castorena, K. M., Stapleford, K. A., & Miller, D. J. (2010). Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication. *BMC Genomics*, *11*, 183. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-183

Catron, D. M., Lange, Y., Borensztajn, J., Sylvester, M. D., Jones, B. D., & Haldar, K. (2004). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* requires nonsterol precursors of the cholesterol biosynthetic pathway for intracellular proliferation. *Infection and Immunity*, *72*, 1036–1042. https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1036-1042.2004

Charpentier, X., Gabay, J. E., Reyes, M., Zhu, J. W., Weiss, A., & Shuman, H. A. (2009). Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathogens*, *5*, e1000501. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000501

Cheshenko, N., Pierce, C., & Herold, B. C. (2018). Herpes simplex viruses activate phospholipid scramblase to redistribute phosphatidylserines and Akt to the outer leaflet of the plasma membrane and promote viral entry. *PLoS Pathogens*, *14*, e1006766. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006766

Chotiwan, N., Andre, B. G., Sanchez-Vargas, I., Islam, M. N., Grabowski, J. M., Hopf-Jannasch, A., … Perera, R. (2018). Dynamic remodeling of

lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathogens*, *14*(2), e1006853. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006853

Chua, J., & Deretic, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 36982–36992. https://doi.org/10.1074/jbc.M405082200

Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L. B., … de Camilli, P. (2015). INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER–plasma membrane contacts. *Science*, *349*, 428–432. https://doi.org/10.1126/science.aab1370

Cocchiaro, J. L., Kumar, Y., Fischer, E. R., Hackstadt, T., & Valdivia, R. H. (2008). Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 9379–9384. https://doi.org/10.1073/pnas.0712241105

Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., et al. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 23954–23961. https://doi.org/10.1074/jbc.M101866200

Czyz, D. M., Potluri, L. P., Jain-Gupta, N., Riley, S. P., Martinez, J. J., Steck, T. L., et al. (2014). Host-directed antimicrobial drugs with broad-spectrum efficacy against intracellular bacterial pathogens. *MBio*, *5*, e01534–e01514. https://doi.org/10.1128/mBio.01534-14

de Chastellier, C., & Thilo, L. (2006). Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cellular Microbiology*, *8*, 242–256. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00617.x

DeLucia, D. C., Rinaldo, C. R., & Rappocciolo, G. (2018). Inefficient HIV-1 *trans* infection of $CD4^+$ T cells by macrophages from HIV-1 nonprogressors is associated with altered membrane cholesterol and DC-SIGN. *Journal of Virology*, *92*. https://doi.org/10.1128/JVI.00092-18

Deng, Y., Almsherqi, Z. A., Ng, M. M., & Kohlwein, S. D. (2010). Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends in Cell Biology*, *20*, 371–379.

Derre, I., Swiss, R., & Agaisse, H. (2011). The lipid transfer protein CERT interacts with the *Chlamydia* inclusion protein IncD and participates to ER–*Chlamydia* inclusion membrane contact sites. *PLoS Pathogens*, *7*, e1002092. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002092

Diamond, D. L., Syder, A. J., Jacobs, J. M., Sorensen, C. M., Walters, K. A., Proll, S. C., … Katze, M. G. (2010). Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000719. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000719

Dorobantu, C. M., Albulescu, L., Harak, C., Feng, Q., van Kampen, M., Strating, J. R., et al. (2015). Modulation of the host lipid landscape to promote RNA virus replication: The picornavirus encephalomyocarditis virus converges on the pathway used by hepatitis C virus. *PLoS Pathogens*, *11*, e1005185. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005185

Dorobantu, C. M., Harak, C., Klein, R., van der Linden, L., Strating, J. R., van der Schaar, H. M., et al. (2016). Tyrphostin AG1478 inhibits encephalomyocarditis virus and hepatitis C virus by targeting phosphatidylinositol 4-kinase IIIα. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*, 6402–6406. https://doi.org/10.1128/AAC.01331-16

Dowall, S. D., Graham, V. A., Corbin-Lickfett, K., Empig, C., Schlunegger, K., Bruce, C. B., … Hewson, R. (2015). Effective binding of a phosphatidylserine-targeting antibody to Ebola virus infected cells and purified virions. *Journal of Immunology Research*, *2015*(347903), 1–9. https://doi.org/10.1155/2015/347903

Elgner, F., Ren, H., Medvedev, R., Ploen, D., Himmelsbach, K., Boller, K., & Hildt, E. (2016). The intracellular cholesterol transport inhibitor U18666A inhibits the exosome-dependent release of mature hepatitis C virus. *Journal of Virology*, *90*(24), 11181–11196. https://doi.org/10.1128/JVI.01053-16

Elwell, C. A., Jiang, S., Kim, J. H., Lee, A., Wittmann, T., Hanada, K., … Engel, J. N. (2011). *Chlamydia trachomatis* co-opts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development. *PLoS Pathogens*, *7*, e1002198. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002198

Erkkila, L., Jauhiainen, M., Laitinen, K., Haasio, K., Tiirola, T., Saikku, P., & Leinonen, M. (2005). Effect of simvastatin, an established lipid-lowering drug, on pulmonary *Chlamydia pneumoniae* infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*, 3959–3962. https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3959-3962.2005

Falcone, S., Perrotta, C., De Palma, C., Pisconti, A., Sciorati, C., Capobianco, A., et al. (2004). Activation of acid sphingomyelinase and its inhibition by the nitric oxide/cyclic guanosine 3′,5′-monophosphate pathway: Key events in *Escherichia coli*-elicited apoptosis of dendritic cells. *Journal of Immunology*, *173*, 4452–4463. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4452

Fernandes, P., & Martens, E. (2017). Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology*, *133*, 152–163. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025

Fernandez de Castro, I., Fernandez, J. J., Barajas, D., Nagy, P. D., & Risco, C. (2017). Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *Journal of Cell Science*, *130*, 260–268. https://doi.org/10.1242/jcs.181586

Fontana, J., Lopez-Iglesias, C., Tzeng, W. P., Frey, T. K., Fernandez, J. J., & Risco, C. (2010). Three-dimensional structure of rubella virus factories. *Virology*, *405*(2), 579–591. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.043

Fontana, J., Lopez-Montero, N., Elliott, R. M., Fernandez, J. J., & Risco, C. (2008). The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cellular Microbiology*, *10*, 2012–2028. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01184.x

Fratti, R. A., Chua, J., Vergne, I., & Deretic, V. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 5437–5442. https://doi.org/10.1073/pnas.0737613100

Frolova, E. I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S., & Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *Journal of Virology*, *84*, 11679–11695. https://doi.org/10.1128/JVI.01441-10

Gabel, B. R., Elwell, C., van Ijzendoorn, S. C., & Engel, J. N. (2004). Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells. *Infection and Immunity*, *72*, 7367–7373. https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7367-7373.2004

Gilk, S. D. (2012). Role of lipids in *Coxiella burnetii* infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *984*, 199–213. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4315-1_10

Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of Virology*, *84*, 10438–10447. https://doi.org/10.1128/JVI.00986-10

Godbole, A. A., Ahmed, W., Bhat, R. S., Bradley, E. K., Ekins, S., & Nagaraja, V. (2015). Targeting *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I by small-molecule inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*, 1549–1557. https://doi.org/10.1128/AAC.04516-14

Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., et al. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nature Cell Biology*, *6*, 393–404. https://doi.org/10.1038/ncb1119

Grassme, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., et al. (1997). Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*, *91*, 605–615.

Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., et al. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires

ceramide-rich membrane rafts. *Nature Medicine*, *9*, 322–330. https://doi.org/10.1038/nm823

Guardado-Calvo, P., Atkovska, K., Jeffers, S. A., Grau, N., Backovic, M., Perez-Vargas, J., et al. (2017). A glycerophospholipid-specific pocket in the RVFV class II fusion protein drives target membrane insertion. *Science*, *358*, 663–667. https://doi.org/10.1126/science.aal2712

Gullberg, R. C., Steel, J. J., Pujari, V., Rovnak, J., Crick, D. C., & Perera, R. (2018). Stearoly-CoA desaturase 1 differentiates early and advanced dengue virus infections and determines virus particle infectivity. *PLoS Pathogens*, *14*(8), e1007261. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007261

Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., et al. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: Direct activation of Cdc42. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 44435–44443. https://doi.org/10.1074/jbc.M105606200

Hackstadt, T., Scidmore, M. A., & Rockey, D. D. (1995). Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: Directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*, 4877–4881. https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4877

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., & Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, *426*, 803–809. https://doi.org/10.1038/nature02188

Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*, 53–66. https://doi.org/10.1038/nrmicro1788

Harikumar, K. B., Kunnumakkara, A. B., Ochi, N., Tong, Z., Deorukhkar, A., Sung, B., … Guha, S. (2010). A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, *9*, 1136–1146. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1145

Hatch, G. M., & McClarty, G. (1998). Phospholipid composition of purified *Chlamydia trachomatis* mimics that of the eucaryotic host cell. *Infection and Immunity*, *66*, 3727–3735.

Hauck, C. R., Grassme, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T. F., & Gulbins, E. (2000). Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Letters*, *478*, 260–266. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01851-2

Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., Lacount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*, 17345–17350. https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107

Heinzen, R. A., Scidmore, M. A., Rockey, D. D., & Hackstadt, T. (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, *64*, 796–809.

Henry, S. A., Kohlwein, S. D., & Carman, G. M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*, 317–349. https://doi.org/10.1534/genetics.111.130286

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., … Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requieres diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine*, *16*(11), 1295–1298. https://doi.org/10.1038/nm.2238

Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R., & Galan, J. E. (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science*, *304*, 1805–1807. https://doi.org/10.1126/science.1098188

Hofmann, S., Krajewski, M., Scherer, C., Scholz, V., Mordhorst, V., Truschow, P., … Herker, E. (2018). Complex lipid metabolic remodeling is required for efficient hepatitis C virus replication. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1863*, 1041–1056. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.002

van der Schaar, H. M., Dorobantu, C. M., Albulescu, L., Strating, J., & van Kuppeveld, F. J. M. (2016). Fat(al) attraction: Picornaviruses usurp lipid transfer at membrane contact sites to create replication organelles. *Trends in Microbiology*, *24*, 535–546. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.017

van der Schaar, H. M., Leyssen, P., Thibaut, H. J., de Palma, A., van der Linden, L., Lanke, K. H., et al. (2013). A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*, 4971–4981. https://doi.org/10.1128/AAC.01175-13

Howe, D., & Heinzen, R. A. (2006). *Coxiella burnetii* inhabits a cholesterol-rich vacuole and influences cellular cholesterol metabolism. *Cellular Microbiology*, *8*, 496–507. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00641.x

Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., … Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, *141*, 799–811. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.050

Huang, F. C. (2011). Plasma membrane cholesterol plays a critical role in the *Salmonella*-induced anti-inflammatory response in intestinal epithelial cells. *Cellular Immunology*, *271*, 480–487. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.08.018

Huang, F. C. (2016). De novo sphingolipid synthesis is essential for *Salmonella*-induced autophagy and human beta-defensin 2 expression in intestinal epithelial cells. *Gut Pathogens*, *8*, 5. https://doi.org/10.1186/s13099-016-0088-2

Hubber, A., Arasaki, K., Nakatsu, F., Hardiman, C., Lambright, D., De Camilli, P., et al. (2014). The machinery at endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites contributes to spatial regulation of multiple Legionella effector proteins. *PLoS Pathogens*, *10*, e1004222. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004222

Ilnytska, O., Santiana, M., Hsu, N. Y., Du, W. L., Chen, Y. H., Viktorova, E. G., et al. (2013). Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. *Cell Host & Microbe*, *14*, 281–293. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.002

Ioannou, Y. A. (2000). The structure and function of the Niemann–Pick C1 protein. *Molecular Genetics and Metabolism*, *71*, 175–181. https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3061

Ireton, K., Payrastre, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., & Cossart, P. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science*, *274*, 780–782. https://doi.org/10.1126/science.274.5288.780

Ireton, K., Payrastre, B., & Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 17025–17032. https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17025

Jerwood, S., & Cohen, J. (2008). Unexpected antimicrobial effect of statins. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*, 362–364. https://doi.org/10.1093/jac/dkm496

Justis, A. V., Hansen, B., Beare, P. A., King, K. B., Heinzen, R. A., & Gilk, S. D. (2017). Interactions between the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole and the endoplasmic reticulum involve the host protein ORP1L. *Cellular Microbiology*, *19*, e12637. https://doi.org/10.1111/cmi.12637

Jutras, I., Abrami, L., & Dautry-Varsat, A. (2003). Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infection and Immunity*, *71*, 260–266. https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.260-266.2003

Kampmueller, K. M., & Miller, D. J. (2005). The cellular chaperone heat shock protein 90 facilitates Flock House virus RNA replication in *Drosophila* cells. *Journal of Virology*, *79*, 6827–6837. https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6827-6837.2005

Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A., & Chisari, F. V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type

I. *Journal of Virology*, *81*(1), 374–383. https://doi.org/10.1128/JVI.01134-06

Kaul, D., Anand, P. K., & Verma, I. (2004). Cholesterol-sensor initiates *M. tuberculosis* entry into human macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *258*, 219–222. https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000012851.42642.be

Khan, I., Katikaneni, D. S., Han, Q., Sanchez-Felipe, L., Hanada, K., Ambrose, R. L., … Konan, K. V. (2014). Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *Journal of Virology*, *88*, 12276–12295. https://doi.org/10.1128/JVI.00970-14

Khanal, S., Sultana, H., Catravas, J. D., Carlyon, J. A., & Neelakanta, G. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* infection modulates expression of megakaryocyte cell cycle genes through phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *PLoS One*, *12*, e0182898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182898

Khelef, N., Shuman, H. A., & Maxfield, F. R. (2001). Phagocytosis of wild-type *Legionella pneumophila* occurs through a wortmannin-insensitive pathway. *Infection and Immunity*, *69*, 5157–5161. https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5157-5161.2001

Kim, S. S., Peng, L. F., Lin, W., Choe, W. H., Sakamoto, N., Schreiber, S. L., & Chung, R. T. (2007). A cell-based, high-throughtput screen for small molecule regulators of hepatits C virus. *Gastroenterology*, *132*(1), 311–320. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.032

Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., et al. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, *6*, e226. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226

Koch-Edelmann, S., Banhart, S., Saied, E. M., Rose, L., Aeberhard, L., Laue, M., … Heuer, D. (2017). The cellular ceramide transport protein CERT promotes *Chlamydia psittaci* infection and controls bacterial sphingolipid uptake. *Cellular Microbiology*, *19*. https://doi.org/10.1111/cmi.12752

Kopek, B. G., Perkins, G., Miller, D. J., Ellisman, M. H., & Ahlquist, P. (2007). Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biology*, *5*, e220. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050220

Korhonen, J. T., Puolakkainen, M., Haveri, A., Tammiruusu, A., Sarvas, M., & Lahesmaa, R. (2012). *Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *Microbial Pathogenesis*, *52*, 157–164. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.12.002

Kowalski, M. P., & Pier, G. B. (2004). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *Journal of Immunology*, *172*, 418–425. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.418

Kushwaha, N., Singh, A. K., Basu, S., & Chakraborty, S. (2015). Differential response of diverse solanaceous hosts to tomato leaf curl New Delhi virus infection indicates coordinated action of NBS-LRR and RNAi-mediated host defense. *Archives of Virology*, *160*, 1499–1509. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2399-x

Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P., & van der Goot, F. G. (2002). Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44–IpaB interaction. *The EMBO Journal*, *21*, 4449–4457. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf457

Lee, W. M., Ishikawa, M., & Ahlquist, P. (2001). Mutation of host Δ9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *Journal of Virology*, *75*, 2097–2106. https://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2097-2106.2001

Li, L., Yu, L., & Hou, X. (2017). Cholesterol-rich lipid rafts play a critical role in bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) infection. *Research in Veterinary Science*, *114*, 341–347. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.009

Liebscher, S., Ambrose, R. L., Aktepe, T. E., Mikulasova, A., Prier, J. E., Gillespie, L. K., … Mackenzie, J. M. (2018). Phospholipase A2 activity during the replication cycle of the flavivirus West Nile virus. *PLoS Pathogens*, *14*(4), e1007029. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007029

Liefhebber, J. M. P., Hague, C. V., Zhang, Q., Wakelam, M. J. O., & McLauchlan, J. (2014). Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(31), 21276–21288. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582999

Limpens, R. W., van der Schaar, H. M., Kumar, D., Koster, A. J., Snijder, E. J., van Kuppeveld, F. J., & Barcena, M. (2011). The transformation of enterovirus replication structures: A three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio*, *2*. https://doi.org/10.1128/mBio.00166-11

Lin, M., & Rikihisa, Y. (2003). *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, *71*, 5324–5331. https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5324-5331.2003

Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M. J., Kräusslich, H. G., & Brügger, B. (2012). Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cellular Microbiology*, *15*(2), 292–304.

Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., De Brabander, J. K., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2015). Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *eLife*, *4*. https://doi.org/10.7554/eLife.12177

Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., & Parton, R. G. (2007). Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host & Microbe*, *2*, 229–239. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.003

Marino, M., Braun, L., Cossart, P., & Ghosh, P. (1999). Structure of the lnlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Molecular Cell*, *4*, 1063–1072. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80234-8

Martin, J. J., Holguera, J., Sanchez-Felipe, L., Villar, E., & Munoz-Barroso, I. (2012). Cholesterol dependence of Newcastle disease virus entry. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1818*, 753–761. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.004

Martin-Acebes, M. A., Blazquez, A. B., Jimenez de Oya, N., Escribano-Romero, E., & Saiz, J. C. (2011). West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One*, *6*, e24970. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024970

Martin-Acebes, M. A., Gabande-Rodriguez, E., Garcia-Cabrero, A. M., Sanchez, M. P., Ledesma, M. D., Sobrino, F., & Saiz, J. C. (2016). Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo. *Journal of Lipid Research*, *57*, 422–432. https://doi.org/10.1194/jlr.M064212

McCollister, B. D., Myers, J. T., Jones-Carson, J., Voelker, D. R., & Vazquez-Torres, A. (2007). Constitutive acid sphingomyelinase enhances early and late macrophage killing of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infection and Immunity*, *75*, 5346–5352. https://doi.org/10.1128/IAI.00689-07

Mengaud, J., Lecuit, M., Lebrun, M., Nato, F., Mazie, J. C., & Cossart, P. (1996). Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infection and Immunity*, *64*, 5430–5433.

Menzel, N. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens*, *8*(7), e1002829. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002829

Miner, M. D., Chang, J. C., Pandey, A. K., Sassetti, C. M., & Sherman, D. R. (2009). Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian Journal of Experimental Biology*, *47*, 407–411.

Mohn, W. W., van der Geize, R., Stewart, G. R., Okamoto, S., Liu, J., Dijkhuizen, L., & Eltis, L. D. (2008). The actinobacterial mce4 locus

encodes a steroid transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*, 35368–35374. https://doi.org/10.1074/jbc.M805496200

Moorhead, A. M., Jung, J. Y., Smirnov, A., Kaufer, S., & Scidmore, M. A. (2010). Multiple host proteins that function in phosphatidylinositol-4-phosphate metabolism are recruited to the chlamydial inclusion. *Infection and Immunity*, *78*, 1990–2007. https://doi.org/10.1128/IAI.01340-09

Naroeni, A., & Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infection and Immunity*, *70*, 1640–1644. https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1640-1644.2002

Nawabi, P., Catron, D. M., & Haldar, K. (2008). Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular *Salmonella* infection. *Molecular Microbiology*, *68*, 173–185. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06142.x

Nesbitt, N. M., Yang, X., Fontan, P., Kolesnikova, I., Smith, I., Sampson, N. S., & Dubnau, E. (2010). A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infection and Immunity*, *78*, 275–282. https://doi.org/10.1128/IAI.00893-09

Nguyen, L. N., Lim, Y. S., Pham, L. V., Shin, H. Y., Kim, Y. S., & Hwang, S. B. (2014). Stearoyl coenzyme A desaturase I is associated with hepatitis C virus replication complex and regulates viral replication. *Journal of Virology*, *88*(21), 12311–12325. https://doi.org/10.1128/JVI.01678-14

Niu, H., Yamaguchi, M., & Rikihisa, Y. (2008). Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, *10*, 593–605. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01068.x

Norkin, L. C., Wolfrom, S. A., & Stuart, E. S. (2001). Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Experimental Cell Research*, *266*, 229–238. https://doi.org/10.1006/excr.2001.5202

Oh, Y. K., Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S. I., & Swanson, J. A. (1996). Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, *64*, 3877–3883.

Ooi, L. S., Tian, L., Su, M., Ho, W. S., Sun, S. S., Chung, H. Y., et al. (2008). Isolation, characterization, molecular cloning and modeling of a new lipid transfer protein with antiviral and antiproliferative activities from *Narcissus tazetta*. *Peptides*, *29*, 2101–2109. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.020

van Ooij, C., Kalman, L., van, I., Nishijima, M., Hanada, K., Mostov, K., & Engel, J. N. (2000). Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cellular Microbiology*, *2*, 627–637. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00077.x

Pandey, A. K., & Sassetti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 4376–4380. https://doi.org/10.1073/pnas.0711159105

Parihar, S. P., Guler, R., Khutlang, R., Lang, D. M., Hurdayal, R., Mhlanga, M. M., … Brombacher, F. (2014). Statin therapy reduces the *Mycobacterium tuberculosis* burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *The Journal of Infectious Diseases*, *209*, 754–763. https://doi.org/10.1093/infdis/jit550

Park, C. J., Shin, R., Park, J. M., Lee, G. J., You, J. S., & Paek, K. H. (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Molecular Biology*, *48*, 243–254. https://doi.org/10.1023/A:1013383329361

Pendaries, C., Tronchere, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., et al. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *The EMBO Journal*, *25*, 1024–1034. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601001

Peng, H., Li, C., Kadow, S., Henry, B. D., Steinmann, J., Becker, K. A., … Grassmé, H. (2015). Acid sphingomyelinase inhibition protects mice from lung edema and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *J Mol Med (Berl)*, *93*, 675–689. https://doi.org/10.1007/s00109-014-1246-y

Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A. S., Moore, R. J., Weitz, K. W., … Kuhn, R. J. (2012). Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathogens*, *8*, e1002584. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584

Peters, J., & Byrne, G. I. (2015). *Chlamydia trachomatis* growth depends on eukaryotic cholesterol esterification and is affected by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibition. *Pathogens and Disease*, *73*(6), ftv028.

Pizarro-Cerda, J., Payrastre, B., Wang, Y. J., Veiga, E., Yin, H. L., & Cossart, P. (2007). Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells. *Cellular Microbiology*, *9*, 2381–2390. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00967.x

Poh, M. K., Shui, G., Xie, X., Shi, P. Y., Wenk, M. R., & Gu, F. (2012). U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Research*, *93*, 191–198. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.014

Rao, G. A., & Pandya, P. K. (2011). Statin therapy improves sustained virologic response among diabetic patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, *140*(1), 144–152. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.055

Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., … Bartenschlager, R. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host & Microbe*, *9*, 32–45. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.002

Rendina, A. R., & Cheng, D. (2005). Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: Inhibition of partial reactions and protection by substrates. *The Biochemical Journal*, *388*, 895–903. https://doi.org/10.1042/BJ20041963

Riethmuller, J., Anthonysamy, J., Serra, E., Schwab, M., Doring, G., & Gulbins, E. (2009). Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *24*, 65–72. https://doi.org/10.1159/000227814

Roe, B., Kensicki, E., Mohney, T., & Hall, W. W. (2011). Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes. *PLoS One*, *6*, e23641. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023641

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., … Bartenschlager, R. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens*, *8*, e1003056. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056

Rothwell, C., Lebreton, A., Young Ng, C., Lim, J. Y., Liu, W., Vasudevan, S., et al. (2009). Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*, *389*, 8–19. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.025

Roulin, P. S., Lotzerich, M., Torta, F., Tanner, L. B., van Kuppeveld, F. J., Wenk, M. R., & Greber, U. F. (2014). Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER–Golgi interface. *Cell Host & Microbe*, *16*, 677–690. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.003

Russell, D. G., Cardona, P. J., Kim, M. J., Allain, S., & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, *10*, 943–948. https://doi.org/10.1038/ni.1781

Rutaganira, F. U., Fowler, M. L., McPhail, J. A., Gelman, M. A., Nguyen, K., Xiong, A., … Burke, J. E. (2016). Design and structural characterization of potent and selective inhibitors of phosphatidylinositol 4 kinase IIIβ. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*, 1830–1839. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01311

Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., … Sudoh, M. (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature Chemical Biology*, *1*, 333–337. https://doi.org/10.1038/nchembio742

Sarkar, A., Hellberg, L., Bhattacharyya, A., Behnen, M., Wang, K., Lord, J. M., … Laskay, T. (2012). Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-κB survival pathways in neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*, *80*, 1615–1623. https://doi.org/10.1128/IAI.05219-11

Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E., & Pier, G. B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-κB translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 6907–6912. https://doi.org/10.1073/pnas.092160899

Shahsavandi, S., Ebrahimi, M. M., & Hasaninejad Farahani, A. (2017). Interfering with lipid raft association: A mechanism to control influenza virus infection by *Sambucus nigra*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *16*, 1147–1154.

Sharma, M., Sasvari, Z., & Nagy, P. D. (2010). Inhibition of sterol biosynthesis reduces tombusvirus replication in yeast and plants. *Journal of Virology*, *84*, 2270–2281. https://doi.org/10.1128/JVI.02003-09

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., & Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, *103*, 501–510. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00141-0

Shoemaker, C. J., Schornberg, K. L., Delos, S. E., Scully, C., Pajouhesh, H., Olinger, G. G., … White, J. M. (2013). Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann–Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection. *PLoS One*, *8*, e56265. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056265

Simonis, A., Hebling, S., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., & Schubert-Unkmeir, A. (2014). Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. *PLoS Pathogens*, *10*, e1004160. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004160

Singh, R., Rao, V., Shakila, H., Gupta, R., Khera, A., Dhar, N., … Tyagi, A. K. (2003). Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. *Molecular Microbiology*, *50*, 751–762. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03712.x

Soares, M. M., King, S. W., & Thorpe, P. E. (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nature Medicine*, *14*, 1357–1362. https://doi.org/10.1038/nm.1885

Sohal, A. K., Pallas, J. A., & Jenkins, G. I. (1999). The promoter of a *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, *41*, 75–87. https://doi.org/10.1023/A:1006232700835

Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & Del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathogens*, *13*, e1006257. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257

Stancu, C., & Sima, A. (2001). Statins: Mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *5*, 378–387. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x

Staring, J., von Castelmur, E., Blomen, V. A., van den Hengel, L. G., Brockmann, M., Baggen, J., … Brummelkamp, T. R. (2017). PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of Picornaviridae. *Nature*, *541*, 412–416. https://doi.org/10.1038/nature21032

Stehr, M., Elamin, A. A., & Singh, M. (2012). Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, *14*, 1227–1237. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.08.001

Strating, J. R., van der Linden, L., Albulescu, L., Bigay, J., Arita, M., Delang, L., et al. (2015). Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Reports*, *10*, 600–615. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.054

Tachado, S. D., Samrakandi, M. M., & Cirillo, J. D. (2008). Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *PLoS One*, *3*, e3324. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003324

Tatematsu, K., Tanaka, Y., Sugiyama, M., Sudoh, M., & Mizokami, M. (2011). Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *Journal of Medical Virology*, *83*, 587–593. https://doi.org/10.1002/jmv.21970

Tenorio, R., Fernandez de Castro, I., Knowlton, J. J., Zamora, P. F., Lee, C. H., Mainou, B. A., … Risco, C. (2018). Reovirus σNS and μNS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles. *MBio*, *9*(4), e01253–e01218.

Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., … Grinstein, S. (2002). Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nature Cell Biology*, *4*, 766–773. https://doi.org/10.1038/ncb854

Toledo, A., & Benach, J. L. (2015). Hijacking and use of host lipids by intracellular pathogens. *Microbiology Spectrum*, *3*(6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0001-2014.

Utermohlen, O., Herz, J., Schramm, M., & Kronke, M. (2008). Fusogenicity of membranes: The impact of acid sphingomyelinase on innate immune responses. *Immunobiology*, *213*, 307–314. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.10.016

Uto, Y. (2016). Recent progress in the discovery and development of stearoyl CoA desaturase inhibitors. *Chemistry and Physics of Lipids*, *197*, 3–12. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.08.018

Vance, D. E., Trip, E. M., & Paddon, H. B. (1980). Poliovirus increases phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells by stimulation of the rate-limiting reaction catalyzed by CTP: Phosphocholine cytidylyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*, 1064–1069.

Vazquez, C. L., Rodgers, A., Herbst, S., Coade, S., Gronow, A., Guzman, C. A., et al. (2016). The proneurotrophin receptor sortilin is required for *Mycobacterium tuberculosis* control by macrophages. *Scientific Reports*, *6*, 29332. https://doi.org/10.1038/srep29332

Viner, R., Chetrit, D., Ehrlich, M., & Segal, G. (2012). Identification of two *Legionella pneumophila* effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS Pathogens*, *8*, e1002988. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002988

Wallqvist, A., Wang, H., Zavaljevski, N., Memisevic, V., Kwon, K., Pieper, R., et al. (2017). Mechanisms of action of *Coxiella burnetii* effectors inferred from host–pathogen protein interactions. *PLoS One*, *12*, e0188071. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188071

Wang, H., Perry, J. W., Lauring, A. S., Neddermann, P., De Francesco, R., & Tai, A. W. (2014). Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology*, *146*(1373-1385), e1371–e1311.

Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., & Shirahata, T. (2002). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular Microbiology*, *4*, 341–355. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00195.x

Watarai, M., Makino, S., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S., & Shirahata, T. (2002). Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infection and Immunity*, *70*, 4818–4825. https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4818-4825.2002

Weber, S. S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., & Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathogens*, *2*, e46. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020046

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., et al. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, *5*, 365–375. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007

Welte, M. A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Current Biology*, *25*, R470–R481. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.004

Weng, L., Hirata, Y., Arai, M., Kohara, M., Wakita, T., Watashi, K., … Toyoda, T. (2010). Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA

polymerase in a genotype-specific manner. *Journal of Virology*, *84*, 11761–11770. https://doi.org/10.1128/JVI.00638-10

Wolf, K., & Hackstadt, T. (2001). Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cellular Microbiology*, *3*, 145–152. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00098.x

Wong, L. H., Copic, A., & Levine, T. P. (2017). Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*, 516–530. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.05.001

Wylie, J. L., Hatch, G. M., & McClarty, G. (1997). Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, *179*, 7233–7242. https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7233-7242.1997

Xiong, Q., Lin, M., & Rikihisa, Y. (2009). Cholesterol-dependent *Anaplasma phagocytophilum* exploits the low-density lipoprotein uptake pathway. *PLoS Pathogens*, *5*, e1000329. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000329

Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2012). Subversion of NPC1 pathway of cholesterol transport by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, *14*, 560–576. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01742.x

Xu, K., & Nagy, P. D. (2015). RNA virus replication depends on enrichment of phosphatidylethanolamine at replication sites in subcellular membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*, E1782–E1791. https://doi.org/10.1073/pnas.1418971112

Yang, W., Hood, B. L., Chadwick, S. L., Liu, S., Watkins, S. C., Luo, G., … Wang, T. (2008). Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*, *48*, 1396–1403. https://doi.org/10.1002/hep.22508

Yao, J., Cherian, P. T., Frank, M. W., & Rock, C. O. (2015). *Chlamydia trachomatis* relies on autonomous phospholipid synthesis for membrane biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*, 18874–18888. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657148

Yao, J., Dodson, V. J., Frank, M. W., & Rock, C. O. (2015). *Chlamydia trachomatis* scavenges host fatty acids for phospholipid synthesis via an acyl–acyl carrier protein synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*, 22163–22173. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671008

Yasuda, S., Kitagawa, H., Ueno, M., Ishitani, H., Fukasawa, M., Nishijima, M., … Hanada, K. (2001). A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 43994–44002. https://doi.org/10.1074/jbc.M104884200

Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., & Feng, Z. (2016). Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses. *Journal of Virology*, *90*, 4232–4242. https://doi.org/10.1128/JVI.02804-15

Zhang, J., Zhang, Z., Chukkapalli, V., Nchoutmboube, J. A., Li, J., Randall, G., … Wang, X. (2016). Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*, E1064–E1073. https://doi.org/10.1073/pnas.1519730113

Zou, Y., Lei, W., Su, S., Bu, J., Zhu, S., Huang, Q., & Li, Z. (2018). *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein Pgp3 inhibits apoptosis via the PI3K–AKT-mediated MDM2–p53 axis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. https://doi.org/10.1007/s11010-018-3422-9

How to cite this article: Fernández-Oliva A, Ortega-González P, Risco C. Targeting host lipid flows: Exploring new antiviral and antibiotic strategies. *Cellular Microbiology*. 2019;e12996. https://doi.org/10.1111/cmi.12996