

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE INICIO DE LA
TRADUCCIÓN DEL MENSAJERO COMPLETO
DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA DE TIPO 1: CARACTERIZACIÓN DE UN
MODELO DE INICIACIÓN DUAL.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

MATÍAS ALBERTO RIVERO JIMÉNEZ

Director de Memoria: Dr. Marcelo López Lastra
Laboratorio de Virología Molecular
Faculta de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor Patrocinante: Prof. Mercedes Zaldívar San Román
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

SANTIAGO DE CHILE, SEPTIEMBRE 2011

*A mis abuelos, por saber que el arma más
poderosa es la educación,
a mis padres “simplemente”, por TODO,
a mis dos hermanos,
por ser los dos tercios de un gran entero
y a mi sobrina “Amada”
por enseñarnos a luchar desde el primer día de vida.*

*“Lo poco que sé, se lo debo a mi ignorancia”
Platón*

AGRADECIMIENTOS.

Sin duda no será tarea fácil resumir y evocar en pocas líneas, lo importante de las personas, presentes en esta sección del trabajo que hoy sostienen en sus manos, pero sin lugar a dudas cada una de ellas ha, de alguna u otra manera, ayudado en la realización de este trabajo.

Comenzando, no puedo evitar partir agradeciendo a mi compañero, (ahora) colega, pero por sobre todo amigo Alonso Ferrer Silva, quien durante estos años de estudios ha sido una fuente de debate, reflexión y buena compañía. Compañía que desinteresadamente comenzó cuando me acompañaste al hospital luego de ese debut accidentado en el torneo mechón de fútbol. Espero haber estado y seguir estando a la altura de tu amistad, con personas como tú cerca de uno, se aprende mucho más que ciencia. No puedo dejar de agradecer a mis demás compañeros(as); Claudia Molina, Valentina Muñoz, Marcela Gatica, Juan Luengo, Freddy Navarro, Sergio Hernández y Alejandro Gayan quienes además de su compañía aportaron a los estudios realizados una visión crítica y de diversos ángulos, tan diversos como nuestras formas de ser y pensar, pero que sin duda enriquecen la cotidianidad del estudio.

Dentro de estos años estudiando la carrera de Bioquímica, tuve muchos profesores y ayudantes, pero muy pocos lograron para mí la categoría de maestros, ya que un maestro no solo es quien enseña lo que sabe, sino además le da la pasión necesaria para lograr hacer que otros se apasionen e intenten imitar el camino que ellos han trazado, es por esto que no puedo evitar de agradecer a; Dr. Juan Venegas (Facultad de Medicina Universidad de Chile) por sin ni siquiera conocernos, abrirnos las puertas de su laboratorio, a mí y a mi amigo Alonso, para hacer nuestra primera unidad de investigación, Dr. Gino Corsini (Faculta de Medicina Universidad Diego Portales), por ser el primer profesor que me dio la confianza de trabajar en su laboratorio, de una manera autónoma, depositando en mí la confianza que no muchos se atreven a darle a un alumno de tercer año, al hoy, Dr. Christian Wilson, que si bien no fue nunca mi ayudante ni profesor, tuve el agrado de compartir algunas clases con él como

compañero y me demostró, que incluso las cosas que parecen más difíciles, pueden llegar a entenderse si uno toma el tiempo y el raciocinio necesario para hacerlo.

Mencionando a las personas que han influenciado en mí durante mi formación profesional, no puedo omitir a los miembros del laboratorio que fue mi hogar académico, durante más de un año y medio, el Laboratorio de Virología Molecular, de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, agradecer al Dr. Marcelo López Lastra por darme la posibilidad de pertenecer a un gran equipo de trabajo y por adentrarme en el mundo de la ciencia, por mostrarme además que la ciencia no implica solo trabajar en un laboratorio sino pensar como científico todos los días. Agradecer a todos los miembros del laboratorio que me ayudaron; Karla Pino, Ursula Leon, Claudia Avila, Delphine Marsac, Maricarmen Vallejos, Alejandro Letelier, Constanza Pino, Pablo Ramdohr y a las personas que llegaron al laboratorio en el momento de mi partida; Estefanía Castillo, Loreto Solis y Jenniffer Angulo. De manera especial quisiera agradecer a dos ex miembros del laboratorio, al hoy Dr. Jorge Vera Otarola por el apoyo y la visión crítica (siempre constructiva) entregada de mis resultados y por ser un obrero de la ciencia. Y a quien fue mi mentor en el trabajo de tesis que hoy tienen en sus manos, el Dr. Fernando Valiente Echeverría, por enseñarme a desenvolverme dentro de un laboratorio y por que la experiencia de vida, que alguien como el puede enseñar, trasciende los ámbitos del conocimiento formal que se adquiere en una Universidad, sin duda una gran persona a la cual le agradezco la paciencia y el compañerismo.

Finalmente quisiera agradecer y dedicar este trabajo: A las únicas personas que se ganaron el derecho de estar en esta sección de mi tesis, incluso antes de que yo aprendiera a escribir, mis Padres; Raquel Verónica Jiménez López y Luís Alberto Rivero Giralt, ya que ellos son la luz del sendero que vamos trazando. A aquellos que hubiesen estado presentes en esta sección de mi trabajo de titulación, aunque hubiese decidido y podido estudiar cualquier otra cosa, mis Hermanos Nicolás Jesús Rivero Jiménez y Luís Alonso Rivero Jiménez, porque ellos son la compañía vital del sendero

en el que vamos. Además no puedo dejar de agradecerle a quien ha sido un soporte emocional y afectivo único, durante ya 5 años Virginia Elizabeth Carvajal San Martín, por ser la mujer que es. No puedo olvidar en esta parte a mi Tata (Q.E.P.D.) por ser una de las primeras personas que confió en mis capacidades, cuando yo apenas comenzaba a caminar, y espero que aun lo siga haciendo ahora que comienzo a caminar en los campos de la Ciencia.

Muchas Gracias a Todos

Matías Alberto Rivero Jiménez

FINANCIAMIENTO.

Este proyecto fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT 1090318. (I.R Dr. Marcelo López Lastra)

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	<i>PÁGINA</i>
AGRADECIMIENTOS.....	III
FINANCIAMIENTO.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN.....	XVIII
SUMMARY.....	XX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Los retrovirus.....	1
1.2 VIH-1.....	1
1.3 Ciclo replicativo de VIH-1.....	4
1.4 Síntesis de las proteínas virales.....	5
1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes.....	6
1.6 Inicio de la traducción cap – dependiente.....	7
1.7 Inicio de la traducción cap – independiente.....	11
1.8 IRES virales <i>versus</i> IRES celulares.....	12
2. HIPOTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	14

3.1	Objetivo general.....	14
3.2	Objetivos específicos.....	14
4.	MATERIALES.....	15
4.1	Bacterias.....	15
4.2	Líneas Celulares.....	15
4.3	Plásmidos.....	15
4.4	Partidores.....	16
4.5	Enzimas.....	17
4.6	Sistemas comerciales.....	18
4.7	Anticuerpos y otros reactivos para Western Blot.....	18
4.8	Otros reactivos y materiales.....	19
4.9	Equipos.....	20
5.	MÉTODOS.....	21
5.1	Técnicas de DNA recombinante.....	21
5.1.1	Obtención de mutantes de DNA mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	21
5.1.2	Construcción de la mutante AUG 29.....	21
5.1.3	Construcción de la mutante AUG 77.....	22
5.2	Clonamiento.....	23
5.2.1	Clonamiento de fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR.....	23

5.2.2 Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.....	24
5.2.3 Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	25
5.2.4 Ligación de fragmentos de DNA en plásmidos.....	25
5.2.5 Preparación de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes.....	25
5.2.6 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	26
5.2.7 Obtención de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos.....	26
5.3 Técnicas de RNA.....	27
5.3.1 Transcripción <i>in vitro</i>	27
5.3.2 Electroforesis de RNA en gel de agarosa en condiciones desnaturalantes.....	28
5.4 Traducción <i>in vitro</i> y ensayo de luciferasa.....	28
5.4.1 Traducciones <i>in vitro</i>	28
5.4.2 Traducciones suplementadas.....	29
5.4.3 Traducciones en presencia de edeína.....	29
5.4.4 Síntesis de proteasa.....	29
5.4.5 Traducción en presencia de proteasa.....	29
5.4.6 Ensayo de luciferasa.....	30
5.5 Análisis de proteínas.....	30
5.5.1 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.....	30

5.5.2 Fraccionamiento de extractos celulares por cromatografía de	
Exclusión.....	30
5.5.3 Ultracentrifugación.....	31
5.5.4 Western Blot.....	31
5.6 Cultivo Celular.....	32
5.6.1 Crecimiento, tripsinización y expansión celular.....	32
5.6.2 Arresto celular.....	32
5.6.3 Preparación de extracto celular.....	33
5.6.4 Citometría de flujo.....	33
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
6.1 Función de los mutantes para la región 5'UTR del mRNA de VIH-1.....	34
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Secuenciación de mutantes.....	36
7.2 Síntesis <i>in vitro</i> de RNAs	36
7.3 Determinación de la funcionalidad IRES en las construcciones	
monocistrónicas.....	37
7.4 Determinación de la funcionalidad IRES del mutante AUG 77.....	38
7.5 Actividad proteolítica de la proteasa-L del virus de la fiebre aftosa.....	39
7.6 Funcionalidad IRES en presencia de proteasa-L del virus de la fiebre aftosa...41	
7.7 Sincronización celular de células HeLa para la síntesis de extracto.....	42

7.8 Incremento de la función del IRES mediado por factores transactivadores de IRES (ITAFs).....	43
7.9 Determinación del comportamiento del IRES en presencia del antibiótico edeína.....	46
8. DISCUSIÓN.....	49
8.1 Funcionalidad del IRES-1 de HIV-1 en las construcciones generadas.....	49
8.2 Caracterización del IRES-1 de HIV-1.....	51
9. CONCLUSIONES.....	54
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55

Figura 1. Genoma y virión de VIH-1.....	3
Figura 2. Ciclo replicativo de VIH-1.....	6
Figura 3. Vía de formación del complejo de iniciación 80S, de manera cap-dependiente	8
Figura 4. Vía de formación del complejo de iniciación 80s, mediada por IRES....	13
Figura 5. Esquema de los plásmidos utilizados.....	15
Figura 6. Esquema de ubicación en el DNA de partidores utilizados.....	17
Figura 7. Estrategia utilizada para la generación del mutante AUG 29.....	22
Figura 8. Estrategia utilizada para la generación del mutante AUG 77.....	22
Figura 9. Construcciones de RNA utilizadas.....	24
Figura 10. Esquema explicativo del diseño experimental.....	35
Figura 11. Secuencias de mutantes generados.....	36
Figura 12. Visualización de los RNAs sintéticos utilizados.....	37
Figura 13. Determinación de la actividad de luciferasa de luciérnaga en construcciones monocistrónicas.....	38
Figura 14 Evaluación del efecto del codón de inicio introducido en el IRES-1 de VIH-1 sobre su funcionalidad.....	39
Figura 15. Efecto de la proteasa-L del virus de la fiebre aftosa sobre el factor eIF4G.....	40

Figura 16. Traducción <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de proteasa-L.....	42
Figura 17. Citometría de flujo de células no sincronizadas y sincronizadas.....	43
Figura 18. Fraccionamiento de extractos proteicos de células HeLa por FPLC....	44
Figura 19. Actividades traduccionales de construcciones bicistrónicas.....	45
Figura 20. Determinación de la funcionalidad IRES-1 de VIH-1 en presencia del antibiótico edeína.....	48

Tabla 1. Características de los factores involucrados en el inicio de la traducción cap-dependiente.....	9
Tabla 2. Partidores usados para la generación de mutantes.....	16
Tabla 3. Endonucleasas de restricción utilizadas	18
Tabla 4. Equipos utilizados.....	20

ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
5'UTR	Región 5' no traducida
3'UTR	Región 3' no traducida
ΔEMCV	IRES del Virus de la encefalomiocarditis, con delección que lo hace no funcional
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
AUG	Codón de Inicio
CA	Capside
Cap	Estructura 5' de los mensajeros eucarióticos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditriotreitol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DIS	Señal de dimerización
DO	densidad óptica
dNTPs	desoxirribonucleótidos
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ENV	Poliproteína precursora de SU y TM
eIFs	factores eucarióticos de inicio de la traducción
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis

Fw	Partidor sentido
g	Gravedad, unidad de magnitud de fuerza centrífuga
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora u horas
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
INT	Integrasa viral
IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas (del inglés internal ribosome entry site)
ITAF	Factores Trans Activadores de IRES
kb	Kilobases
LAR	Agente de ensayo de luciferasa II (del inglés luciferase reagent reaction)
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LTR	Repetición terminal larga (del inglés “ <u>L</u> ong <u>T</u> erminal <u>R</u> epeat”)
M	Molaridad
MA	Proteína de la matriz
min	Minutos
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
mRNA	RNA mensajero
NC	Nucleocápside
nm	Nanómetros
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés open reading frame)
pb	Pares de base

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés polymerase chain reaction)
PBS	tampón fosfato salino (del inglés phosphate buffered saline)
Pol II	RNA Polimerasa II
PR	Proteasa viral
PV	Poliovirus
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
RRL	Lisado de reticulocitos de conejo
RT	Retrotranscriptasa viral
Rv	Partidor antisentido
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SU	Proteína de superficie viral
TBE	Tampón Tris-ácido bórico EDTA
TM	Proteína de membrana viral
tRNA	RNA de transferencia
U	Unidades
UV	Ultravioleta

RESUMEN.

En organismos eucariontes, el inicio de la síntesis de proteínas comienza con el reclutamiento de la subunidad 40S del ribosoma al mRNA. Sin embargo, dependiendo de cómo se efectúe este reclutamiento, el inicio de la traducción puede ser dependiente o independiente de la estructura 5'cap.

El mecanismo cap-dependiente se basa en el reconocimiento de la estructura cap (7mGpppN), presente en el extremo 5' de todos los mRNA, por el complejo de iniciación eIF4F. El complejo eIF4F está constituido por tres proteínas: eIF4E, la proteína de unión al cap; eIF4A, una RNA helicasa ATP dependiente y la proteína de andamiaje, eIF4G. La subunidad 40S ribosomal es reclutada al mRNA como parte de un complejo formado por eIF2-GTP/Met-tRNA_i, eIF1A y eIF3. El factor de iniciación eIF4G cumple la función de proteína puente entre la subunidad 40S del ribosoma (vía eIF3) y el mRNA (vía eIF4E). Luego del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal en la vecindad de la estructura cap, el complejo de iniciación migra en dirección 5' a 3' hasta encontrar un codón de inicio de la síntesis de proteína, AUG, en un contexto óptimo.

El estudio del mecanismo de traducción de los mRNA de la familia *Picornaviridae*, los cuales carecen de estructura 5'cap, permitió la caracterización de un mecanismo alternativo de iniciación de la síntesis de proteína. El mecanismo de inicio de la traducción en los mRNA de Picornavirus está mediado por regiones de RNA altamente estructuradas que son capaces de reclutar la subunidad 40S ribosomal de manera independiente a los extremos del mRNA. Estas estructuras de RNA se denominaron sitios internos de entrada de ribosomas, IRES (por sus siglas en inglés). Desde su caracterización inicial en los mRNA de la familia *Picornaviridae*, la existencia de IRES se ha extendido a otras familias virales incluyendo a la familia *Retroviridae*.

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. El genoma de VIH-1 está constituido por dos hebras idénticas de un RNA de cadena simple de polaridad positiva, unidas entre si por enlaces no covalentes. El mRNA de VIH-1 posee cap, 3'poli(A) y dos elementos

IRES, el primero, IRES-1, en su región 5' no traducida (5'UTR) y el segundo en su región codificante para la proteína viral Gag (IRES-40K). Este trabajo se focalizó en el estudio de la función del IRES-1 de VIH-1 partiendo del postulado que a diferencia de otros mRNAs virales que poseen un elemento IRES, y sólo pueden iniciar la traducción de manera IRES dependiente, el mRNA de VIH-1 posee la capacidad de iniciar la síntesis de proteína de manera dual, es decir, de manera dependiente y/o independiente de la estructura cap. Este trabajo establece que el mRNA completo de VIH-1 puede iniciar su traducción utilizando un mecanismo tanto dependiente como independiente de su estructura 5'cap. En este contexto se establece que el mRNA de VIH-1 comparte características funcionales descritas sólo para mRNA celulares, diferenciándose de manera importante de los otros mRNA virales que poseen un elemento IRES que inician su traducción exclusivamente de manera dependiente de IRES.

SUMMARY.

Study of the translation initiation mechanism of the full length messenger from human immuno deficiency virus type 1; characterization of a dual initiation model.

In eukaryotes, the initiation of protein synthesis begins with the recruitment of the 40S ribosomal subunit to the mRNA. However, depending on how this recruitment takes place, translation initiation may be dependent or independent of the 5' cap structure. Cap-dependent translation initiation is based on the recognition of the cap structure (7mGpppN), present at the 5' end of all mRNA by the eIF4F initiation complex. The eIF4F complex consists of three proteins: eIF4E, the cap-binding protein; eIF4A, an ATP-dependent RNA helicase and eIF4G, the scaffold protein. The 40S ribosomal subunit is recruited to the mRNA as part of a complex formed by eIF2-GTP/Met-tRNA_i, eIF1A and eIF3. The initiation factor eIF4G serves as a bridge between the 40S ribosomal subunit (through eIF3) and the mRNA (through eIF4E). After recruitment of the 40S ribosomal subunit to the vicinity of the cap structure, the initiation complex migrates in a 5' to 3' direction until a start codon (AUG) within an optimal context is recognized.

The study of the translation initiation mechanism used by the mRNAs of the Picornaviridae family, which lack a 5' cap structure allowed the characterization of an alternative mechanism for translation initiation. The translation initiation mechanism used by these viral mRNAs is mediated by highly structured RNA regions that are able to recruit the 40S ribosomal subunit. These RNA structures are called internal ribosome entry sites or IRES. Since their initial characterization of IRESes in mRNAs of the Picornaviridae family, the existence of these elements has been demonstrated in mRNAs, of other viral families, including the Retroviridae family. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) belongs to the genus Lentivirus of the Retroviridae family. The HIV-1 genome consists of two identical strands of a single-stranded RNA of positive polarity, non-covalently attached to each other. The mRNA of HIV-1 is capped, has a 3' poly (A) tail and harbours two IRES elements, one within the mRNAs 5'UTR (IRES-1) and the second within the viral Gag protein coding

region (IRES-40K). This work focuses on the study of the IRES-1 and is based on the assumption that, unlike other viral mRNAs that possess IRES elements that can only initiate translation in an IRES-dependent fashion, the mRNA of HIV-1 has the ability to initiate protein synthesis in both a cap-dependent or cap-independent fashion. In this context, this work demonstrates that mRNA of HIV-1 shares functional characteristics to date only ascribed to cellular mRNA, that is, it can initiate translation using two mechanisms. Thus, we establish that translation initiation of the HIV-1 full length mRNA is different from what has been described to date for other IRES-harboring viral mRNAs which can only initiate their translation through an IRES-dependent mechanism.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Los retrovirus.

Los retrovirus comprenden una familia de virus con envoltura lipoproteica y cuyo genoma corresponde a dos copias de una hebra de polaridad positiva de RNA. La principal característica de esta familia es la retrotranscripción del RNA genómico viral a un DNA lineal de doble hebra, el cual es luego integrado en el genoma de la célula huésped (1).

Los retrovirus pueden ser subdivididos en dos categorías, dependiendo de la organización de su genoma, en retrovirus simples y complejos. Todos los retrovirus contienen tres regiones codificantes con la información para la síntesis de proteínas virales: *gag*, la cual codifica para la síntesis de las proteínas internas del virion tales como la matriz (MA), la cápside (CA) y la nucleocápside (NC); *pol*, que codifica para la transcriptasa inversa (RT), la proteasa (PR) y la integrasa (IN); y *env*, de la cual derivan los componentes de la superficie viral (gp120) y los elementos transmembrana de la envoltura viral (gp41)(1). Los retrovirus simples codifican sólo esta información, en cambio los retrovirus complejos codifican además para proteínas regulatorias y accesorias. Estas proteínas no estructurales varían dependiendo del tipo, pero es importante mencionar que estas proteínas son producto de mensajeros procesados (compréndase de aquí en adelante mensajeros procesados como los mensajeros sometidos al proceso de splicing) (1).

1.2 VIH-1.

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pertenece al género *Lentivirus* de la familia de los Retroviridae (2).

El genoma de VIH-1 está compuesto por dos copias de RNA de hebra simple con polaridad positiva de aproximadamente 9kb, que se encuentran unidas entre sí por interacciones no covalentes. El genoma viral codifica nueve marcos de lectura, tres de los cuales corresponden a las poliproteínas Gag, Gag-Pol y Env. Gag y Env son

componentes estructurales del virus, siendo Gag el precursor de las proteínas MA, CA, NC y p6. La poliproteína Env generará las glicoproteínas virales SU (superficie o gp120) y TM (transmembrana o gp41). Gag-Pol da origen a las proteínas que realizarán funciones enzimáticas: la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN). Dentro del genoma de VIH-1 también se codifican otras seis proteínas denominadas accesorias, correspondientes a Vif, Tat, Rev, Vpr, Vpu, y Nef (3).

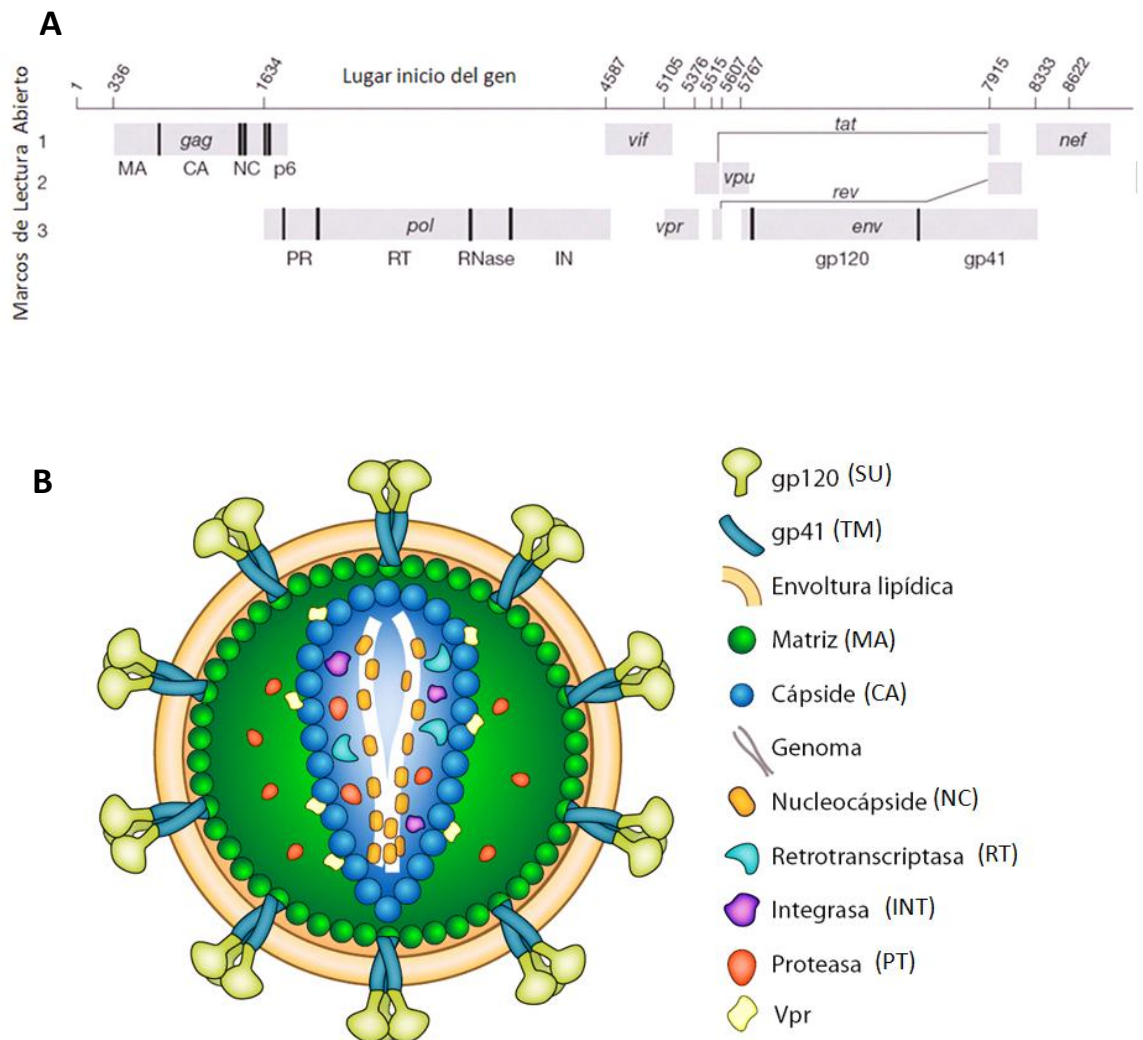


Figura 1: Genoma y Virión de VIH-1. **A.** Organización genómica de VIH-1. Las zonas grises representan a las regiones codificantes para las diversas proteínas. Las zonas de unión entre dos poliproteínas se grafican con líneas negras verticales. Adaptado de (4). **B.** El esquema representa la estructura del virión de VIH-1.

1.3 Ciclo replicativo de VIH-1.

La envoltura de virus VIH-1 posee los elementos moleculares necesarios para que el virus realice el ingreso a la célula blanco. El complejo proteico de la envoltura del virus inicialmente se sintetiza como una poliproteína, gp161, que luego de ser procesada por convertasas celulares (5, 6) da origen a una subunidad de superficie denominada gp120 y otra de transmembrana denominada gp41(7). La proteína gp120 interactúa con el receptor celular CD4 y con los correceptores CCR5 y/o CXCR4, quimiocinas presentes en la superficie celular (6). Posterior a la interacción de SU con CD4 correceptor ocurre un proceso de fusión de la membrana viral con la membrana celular (7).

Luego de la entrada del virus a la célula su material genético es liberado al citoplasma de la célula en donde es retrotranscrito a un DNA lineal de doble hebra, gracias a la acción de la RT. El DNA viral forma luego el complejo de preintegración (PIC) junto a proteínas virales y celulares, el cual es transportado al núcleo de la célula. El DNA viral es integrado en el genoma de la célula gracias a la acción de la enzima IN (1). Una vez integrado, el genoma viral se denomina provirus. Los extremos terminales del provirus se caracterizan por presentar regiones repetidas denominadas LTRs (por sus siglas en inglés, Long Terminal Repeat),

El LTR en el extremo 5' del provirus posee el promotor viral y las secuencias estimuladoras de la transcripción. La transcripción del DNA viral es efectuada por la RNA polimerasa II celular (8). A medida que es sintetizado, gran parte del RNA viral interactúa con las proteínas nucleares y se procesa como un RNA celular (9), es exportado al citoplasma y traducido por la maquinaria celular (10). Una fracción de los pre-mRNA es sin embargo, capaz de evadir el procesamiento, dando origen al mRNA completo de VIH-1. El mRNA completo viral interactúa con proteínas tanto celulares como virales que permiten que sea exportado al citoplasma (11).

El mRNA completo o no procesado cumple dos funciones en el ciclo replicativo viral. Puede ser reconocido por las proteínas virales como el RNA genómico y es encapsidado dentro las partículas virales nacientes. Alternativamente, este RNA

puede ser reconocido por la maquinaria de traducción celular y actuar como mRNA codificando para las proteínas Gag y Gag-Pol (12).

1.4 Síntesis de las proteínas virales.

Al igual que todos los mensajeros celulares, los mensajeros virales son sintetizados por la maquinaria transcripcional de la célula, por lo cual poseen todas las características de un mRNA celular, es decir estructura cap en el extremo 5' y una cola poli(A) en el extremo 3'. Luego de que el RNA viral es exportado del núcleo las poliproteínas que darán origen a las proteínas estructurales son sintetizadas en ribosomas libres (11).

La secuencia de la región 5' UTR del mRNA completo de VIH-1, da origen a múltiples elementos estructurales, los cuales son funcionales en diversas etapas del ciclo replicativo del virus (13). Estas zonas están involucradas en la transcripción, procesamiento, dimerización del RNA genómico, encapsidación y retrotranscripción y le confieren una región 5'UTR altamente estructurada a los mensajeros completos de VIH-1(11).

La región 5'UTR del mensajero completo de VIH-1 posee además un elemento IRES (ver más adelante) que comprende los nucleótidos desde el nucleótido 1 hasta el 336 (numeración con respecto al clon infeccioso pNL4.3; GenBank: AF324493). Este IRES (denominado IRES-1 de VIH-1) presenta su actividad mínima en la región desde el nucleótido 104 al 336 y además tiene la capacidad de dirigir el inicio de la traducción durante la etapa G2/M del ciclo celular (14), etapa del ciclo celular en que está inhibida la síntesis proteínas cap-dependiente (15).

Gracias a estas características, el mecanismo de inicio de la traducción que utiliza VIH-1 le otorga una ventaja al mRNA completo viral con respecto a los mRNA celulares, ya que es capaz de dirigir la síntesis de proteínas en una etapa del ciclo celular en la que el inicio de la síntesis de proteínas cap-dependiente está inhibida (14). Si a esto se le suma el efecto que causa la proteína accesoria Vpr, la cual bloquea la progresión del ciclo celular en G2/M en las células infectadas (16, 17),

queda de manifiesto que el virus posee un sistema de inicio de la traducción que favorece la traducción de sus mensajeros en desmedro de los mensajeros celulares.

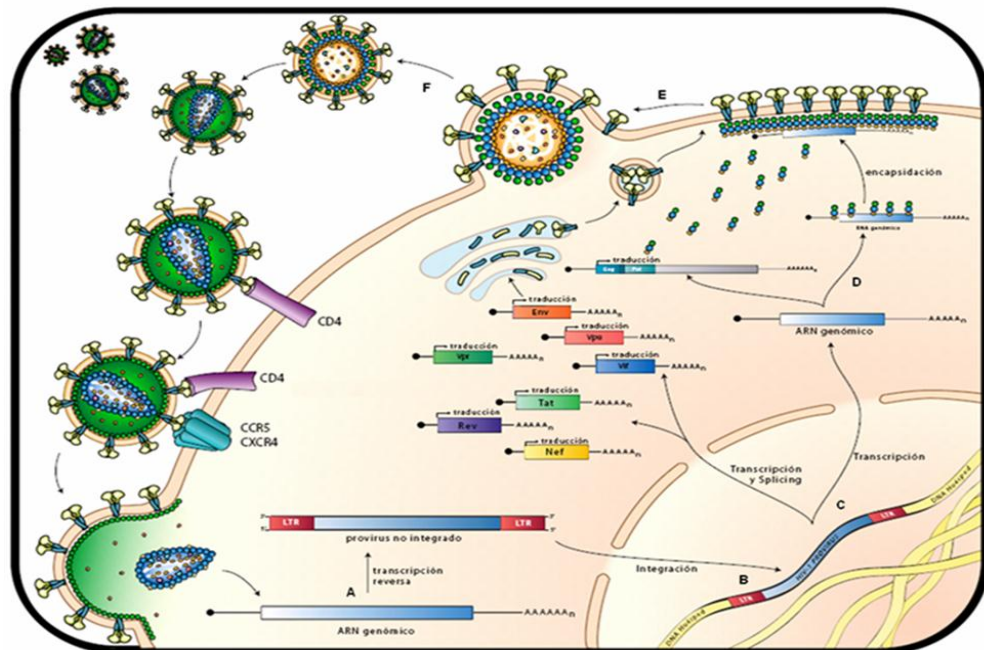


Figura 2: Ciclo replicativo de VIH-1. El ciclo replicativo de VIH-1 puede ser dividido en seis etapas. A) Síntesis de la hebra doble de DNA gracias a la acción de la transcriptasa inversa del virus. B) Integración del provirus. C) transcripción, procesamiento y exporte nuclear. D) Traducción y encapsidación. E) Ensamblaje viral. F) Maduración y liberación viral.

1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes.

El proceso de síntesis proteica puede ser dividido en cuatro grandes etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas (18). La regulación de la síntesis de proteína se ejerce preferentemente en la etapa de iniciación. En eucariontes, el inicio de la síntesis de proteínas comienza con el reclutamiento de la subunidad 40S del ribosoma al mRNA (18). Este reclutamiento puede ser realizado de manera cap-dependiente o cap-independiente.

1.6 Inicio de la traducción Cap – dependiente.

Los mRNAs eucariontes poseen una modificación en su extremo 5' que corresponde a la estructura 7-metil guanosina trifosfato (m^7GpppN , donde N es cualquier nucleótido) denominada cap (19). Entre otras funciones el cap participa en la regulación del inicio de la traducción. Además los mRNAs eucariontes poseen en su extremo 3' una cadena de adenosinas (poliA) que puede variar desde 50 a 200 nucleótidos en longitud (20). Esta cadena nucleotídica, tal como el cap tiene una importante función en el inicio de la traducción cap-dependiente (19).

La iniciación de la traducción cap-dependiente está altamente controlada en su etapa inicial por una serie de factores de inicio de la traducción (eIFs), los que poseen diversas funciones en el proceso (Figura 3 y Tabla 1 (21)).

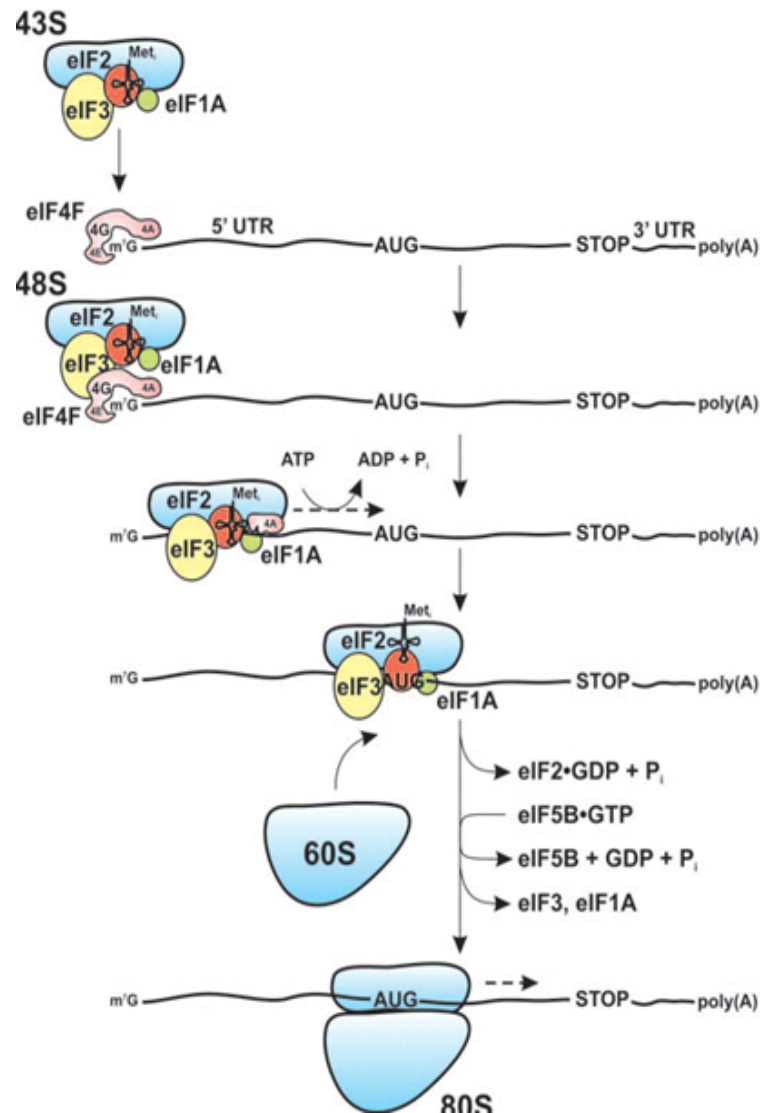


Figura 3: Vía de formación del complejo de iniciación 80s, de manera cap-dependiente. El mecanismo de “scanning” para la iniciación de la traducción postula la existencia de tres etapas a través de las cuales la subunidad 40S se aproxima al codón de inicio. 1° Un complejo de pre iniciación 43S (compuesto de la subunidad 40S, eIF2-GTP-Met-tRNA_i y eIF3) se une al cap. Formando de esta manera el complejo 48S. (eIF1A facilita la unión del Met-tRNA_i a la subunidad 40S del ribosoma). 2° El complejo formado recorre en dirección 5’ hacia 3’ la región 5’ UTR en busca de un codón de inicio. 3° El complejo encuentra un codón de inicio, este reconocimiento es acompañado de la liberación de los factores de inicio y la posterior unión de la subunidad ribosomal 60S, la formación del complejo 80S es catalizado por el factor eIF5B. *Imagen adaptada de Komar AA. et al (38).*

Tabla 1: Características de los factores involucrados en el inicio de la traducción cap-dependiente.

Factor	Nº de Polipéptidos	Tamaño (KDa)	Principales Propiedades y Función
eIF1	1	12.6	Necesario para el reclutamiento correcto del ribosoma y el "scanning" hasta el codón de inicio.
eIF1A	1	16.5	Necesario para el reclutamiento correcto del ribosoma en el "scanning" hasta el codón de inicio.
eIF2	3	36.2 (α) 39 (β) 51.8 (γ)	Forma el complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA _i , que se une a las subunidad ribosomal 40S.
eIF2B	5	33.7 (α) 39 (β) 50.4 (γ) 57.8 (δ) 80.2 (ϵ)	Cataliza la conversión de eIF2/GDP en eIF2/GTP.
eIF3	12	730 en Total	Está involucrado en todas las etapas de la iniciación. Interactúa con eIF1, eIF4G, eIF5 y la sub unidad ribosomal 40S.
eIF4A(I)*	1	44.4	Posee actividad ATPasa y actividad helicasa dependiente de ATP y de eIF4B. Interactúa con eIF4G. Existe una segunda especie de 46.3KDa codificada por otro gen.
eIF4B	1	69.2	Su actividad precisa es indeterminada. Promueve la actividad helicasa de eIF4A.
eIF4E	1	25.1	Se une directamente al cap e interactúa con eIF4G.
eIF4G(I)*	1	171.6	Funciona como puente entre los factores de unión al ribosoma y de unión al cap. Existe una especie diferente menos abundante de 176.5KDa codificada por otro gen.
eIF4F			Complejo compuesto por eIF4A, 4E y 4G.
eIF5	1	48.9	Promueve la hidrólisis del complejo ternario GTP seguido del reconocimiento del codón de inicio mediante apareamiento de bases con el anticodon tRNA _i .
eIF5B	1	139	Requerido para la unión de subunidades. Posee actividad GTPásica dependiente de ribosomas.

*eIF4AI y 4AII parecen ser funcionalmente equivalentes, tal como eIF4GI y 4GII. Se denominarán en adelante simplemente como eIF4A y eIF4G, respectivamente. *Tabla adaptado de Jackson RJ (21).*

La traducción cap-dependiente comienza con el reclutamiento del complejo proteico de unión al cap denominado eIF4F al mRNA. El complejo eIF4F se conforma por tres proteínas eIF4E, eIF4A y eIF4G (22). El factor eIF4E corresponde a la proteína de unión al cap, eIF4A es una RNA helicasa ATP-dependiente perteneciente a la familia de las helicasas DEAD box (23). Esta helicasa permite la pérdida de las estructuras secundarias en la región 5' del mRNA y eIF4G sirve como plataforma para el ensamblaje del complejo de iniciación puesto que une los factores de inicio con el complejo ribosomal (22). El factor eIF4G exhibe dos sitios de unión para eIF4A además de un sitio de unión para eIF4E. Así eIF4G media la interacción entre el mRNA mediante la interacción del cap con eIF4E, de la subunidad ribosomal 40S mediante la interacción con el factor eIF3 (24). La subunidad ribosomal 40S es reclutada como parte de un complejo denominado 43S, complejo que se compone de eIF2-GTP/Met-tRNA_i, eIF1A y eIF3 (25).

Una vez que el complejo de iniciación se encuentra posicionado en el mRNA en proximidad del cap, éste migra en dirección 5' - 3' en un proceso denominado "scanning", hasta encontrar el primer codón de inicio en contexto óptimo (es decir en la base -3 debe haber una purina y la base +4 debe ser una guanina, X corresponde a cualquier base). En la mayoría de los mRNAs eucariontes la síntesis del péptido se inicia en el primer AUG en contexto óptimo río abajo del cap. Este contexto (denominado en ocasiones contexto Kozak en honor a su descubridora) corresponde a **A/GXXAUGG** (26)(27). Una vez establecida la interacción codón-anticodon entre el mRNA y el tRNA iniciador, eIF5 estimula la hidrólisis de GTP unido a eIF2 y la liberación de los factores desde el complejo 48S (el complejo 48S corresponde al 43S junto con el eIF4F). Una vez encontrado el codón de inicio y liberados los eIF del complejo, se permite la entrada de la subunidad ribosomal 60S ensamblándose así el ribosoma competente 80S, el cual contiene el Met-tRNA_i en su sitio P (28). En este punto finaliza la etapa de inicio de la traducción y comienza la fase de elongación.

1.7 Inicio de la traducción Cap – independiente.

El inicio de la traducción cap-independiente se caracterizó por primera vez en picornavirus (30). El mRNA de los picornavirus se caracteriza por no poseer estructura cap, sin embargo, presentan regiones altamente estructuradas en el 5' UTR de su mRNA denominadas sitios internos de entrada del ribosomas, IRES, que son capaces de reclutar la subunidad 40S ribosomal (30, 31). Luego de su caracterización en poliovirus y en otros miembros de la familia *Picornaviridae*, los IRESs fueron encontrados no sólo en mRNAs de otras familias virales como retrovirus, sino también en mRNAs celulares. Por ejemplo, un estudio mostró que el mRNA celular que codifica para la cadena pesada de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), se traducía en células infectadas con el virus polio al tiempo en que la traducción cap-dependiente está inhibida. Esto llevó a la conclusión de que el mRNA de BiP puede mediar la entrada de los ribosomas de manera cap-independiente en células, indicando que el inicio de la síntesis de proteínas mediado por IRES puede ser usado por mRNA celulares (32).

Junto con la característica fundamental de los IRES de reclutar la subunidad ribosomal 40S independiente de los extremos del RNA, su actividad depende de la integridad de su estructura y secuencia, puesto que pequeñas mutaciones dentro de un IRES han demostrado inhibir por completo su actividad (33).

Pese a que los IRES son todos capaces de iniciar la síntesis de manera cap-independiente existen algunas diferencias entre ellos que permiten dividirlos según su forma de reclutar la subunidad 40S, por lo tanto los IRES se clasifican según la necesidad de eIFs, la ubicación del codón de inicio con relación al sitio de reclutamiento de la subunidad 40S y la habilidad del IRES de iniciar la traducción en lisado de reticulocitos (RRL), con o sin suplementación de factores proteicos celulares. De acuerdo a estos parámetros los IRES virales se pueden dividir en cuatro grupos (34):

- **Grupo 1:** Pertenecen a esta categoría los IRES que reclutan al ribosoma de manera directa y no requieren ningún factor proteico para realizar esta función.

Estos IRES tampoco requieren el tRNA iniciador (Met-tRNAi). Ejemplo de este grupo es el IRES del virus de la parálisis del grillo (CrPV).

- **Grupo 2:** A este grupo corresponden los IRES que para unir la subunidad ribosomal 40s usan determinados factores de inicio de la traducción como también el Met-tRNAi. Como ejemplo de esta categoría se puede mencionar al IRES del virus de la Hepatitis C (HCV).
- **Grupo 3:** Los IRES de este grupo requieren algunos factores proteicos denominados Factores Trans-activadores de IRES (ITAFs por sus siglas en inglés) además de ciertos factores de inicio y Met-RNAi. Estos IRES funcionan en RRL y la traducción comienza en la región 3' del IRES. Como miembros de este grupo se pueden mencionar el IRES del virus de la fiebre aftosa.
- **Grupo 4:** Los IRES pertenecientes a este grupo requieren de algunos factores de inicio, Met-RNAi e ITAFs, además funcionan eficientemente en RRL solo cuando son suplementados con extractos celulares de otro tipo celular y también inician la traducción en un codón río abajo del IRES.

1.8 IRES virales *versus* IRES celulares.

En los últimos años se ha incrementado el descubrimiento de IRES en mRNAs celulares (35). La existencia de elementos IRES en mensajeros celulares permite la expresión de ciertos genes cuando la síntesis proteica cap-dependiente se encuentra disminuida, tales como apoptosis, etapa G2/M del ciclo celular, hipoxia, entre otros. En estas condiciones la actividad del factor eIF4F se encuentra disminuida (22). Además en muchas de estas condiciones como privación de nutrientes, shock térmico, exposición a luz UV, hipoxia e infección viral el factor eIF2 se encuentra en un estado inactivo debido a la fosforilación de su subunidad α (36). La reducción de los niveles de eIF2-GTP causa la disminución de la actividad cap-dependiente (37). La principal diferencia entre los mRNA celulares y virales que presentan elementos IRES radica en la capacidad de los mRNA celulares de iniciar la traducción de manera dual es decir de manera cap-dependiente o bien de forma cap- independiente en función del estado en que se encuentre la célula (38). Los elementos IRES para su óptimo funcionamiento pueden requerir la presencia de

ciertos elementos proteicos conocidos como factores transactivadores de IRES (ITAFs), los cuales mediante la unión al elemento IRES regulan su actividad. Se piensa que la variedad de estos elementos en los distintos tipos celulares son los responsables de la especificidad de algunos virus para poder iniciar la traducción de sus proteínas (38).

Debido a las características del mensajero completo de VIH-1, poseer estructura 5'cap, cola poli (A) y elementos IRES, en este trabajo se propone que el mRNA de VIH-1 puede iniciar su traducción de manera dual, ya sea cap o IRES dependiente.

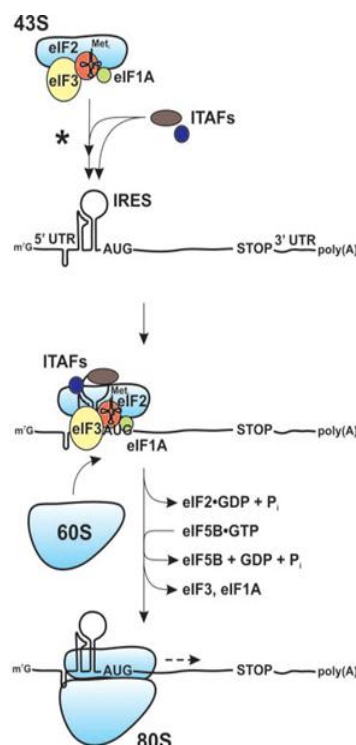


Figura 4: Vía de formación del complejo de iniciación 80s, mediada por IRES. El mecanismo de inicio de la traducción mediado por IRES es independiente del reconocimiento del cap y se caracteriza por el reclutamiento directo (sobre) o en la vecindad del codón de inicio. El reclutamiento de la sub unidad 40S es acompañado por el reconocimiento simultaneo del codón de inicio. Aunque en algunos casos es posible que la subunidad 40S realice scanning río abajo hasta encontrar el codón de inicio.* El conjunto de factores de iniciación canónicos así como ITAFs requerido para la iniciación mediada por IRES varía según el IRES, ya sea celular o viral. *Imagen adaptada de Komar AA. et al (38).*

2. HIPÓTESIS.

El mRNA completo de VIH-1 inicia la síntesis de proteína de manera tanto cap-dependiente como IRES-dependiente.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General.

Determinar la capacidad de la región 5'UTR de VIH-1 para iniciar la síntesis de proteínas de manera dependiente de la estructura cap así como de manera IRES-dependiente.

3.2 Objetivos Específicos.

3.2.1 Construir mutantes en la región 5'UTR de VIH-1 útiles para la diferenciación de las actividades cap-dependiente e IRES-dependiente.

3.2.2 Caracterizar el IRES-1 de VIH-1.

4. MATERIALES.

4.1 Bacterias.

Escherichia coli (*E. coli*) TOP 10.

4.2 Líneas Celulares.

Células HeLa obtenidas de ATCC (CCL-2™).

4.3 Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este estudio se esquematizan en la Figura 5.

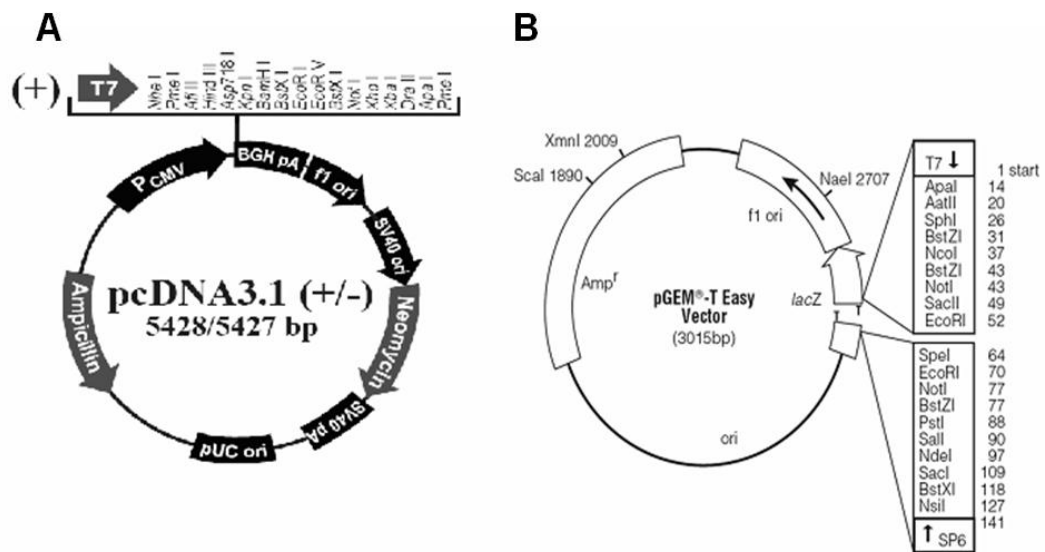


Figura 5: Esquema de los plásmidos utilizados. A) El plásmido pcDNA3.1 se utilizó para las construcciones bicistrónicas. **B)** El plásmido pGEM-T fue utilizado para la inserción de las construcciones monocistrónicas y posterior amplificación mediante PCR y transcripción.

4.4 Partidores.

Los partidores utilizados se obtuvieron de Invitrogen.

Se detallan en la tabla 3 y en la figura 5 se esquematiza su sitio de unión al DNA.

Tabla 2. Partidores utilizados para generación de mutantes.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Propósito
pUCM13 Fw	GTTTTCCAGTCACGAC	Comprobación Insertos en pGEM-T
pUCM13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	Comprobación Insertos en pGEM-T
T7 Fw	TAATACGACTCACTATAGGG	
p2ANTI Rv	TCTCTTCATAGCCTTATGCAGTTG	Utilizado en secuenciación
FlucXbaI Rv	CGTCTAGAATTACACTGCGATCTTTCCG	Amplificación monocistrónicos
VIH1-336f-EcoRI Fw	TTTGAAAAACACGAATTCGGTCTCTCTG	Amplificación VIH-1
MatF1 Fw	CCATATGTAATACGACTCACTATAGGTCTCTCTGGTTAGA	Monocistrónico
MatF2 Fw	CCATATGTAATACGACTCACTATAGGTCTCTCTGGTTAGATCTGGGCATGGGA GC	Amplificación AUG29
MatF3 Fw	CCTCAGTAATGGTTGCCTT	Síntesis AUG77
MatR1 Rv	AAGGCAACCATTACTGAGG	Síntesis AUG77

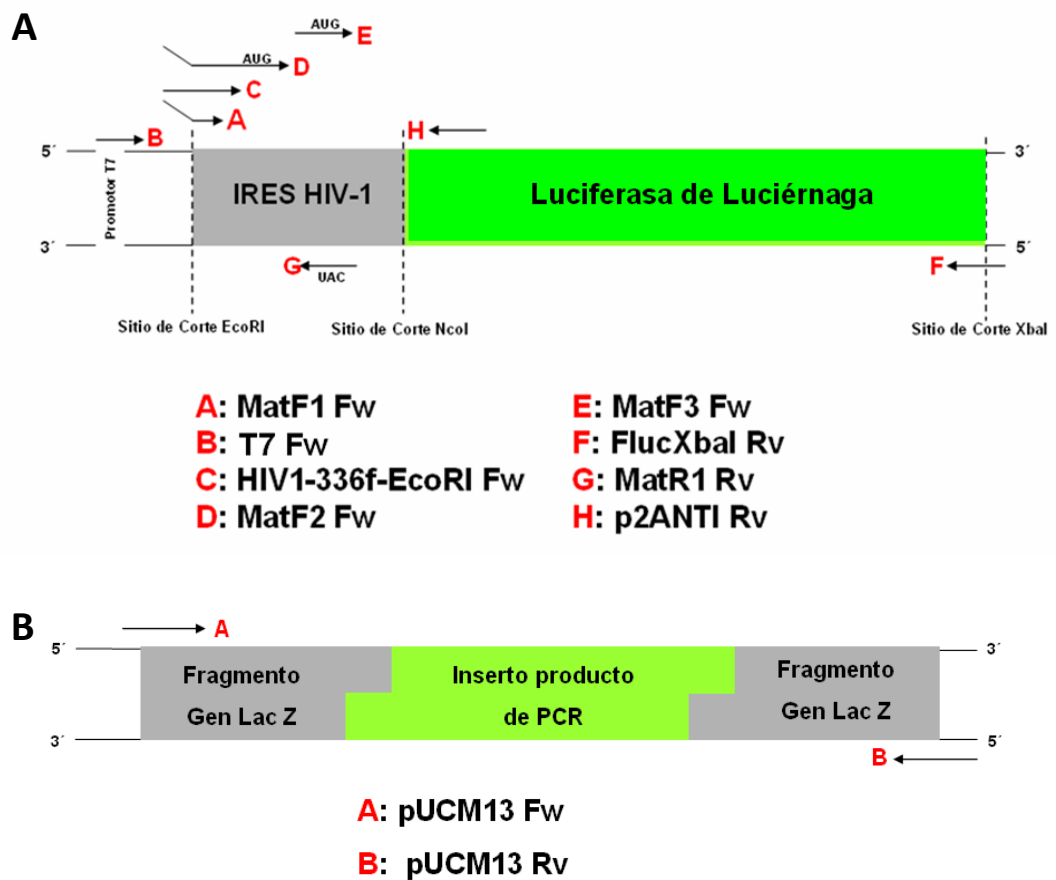


Figura 6: Esquema de ubicación en el DNA de los partidores utilizados. A. Esquema de amplificación de vectores monocistrónicos. **B.** Esquema de amplificación desde vector pGEM-T.

4.5 Enzimas.

Se emplearon las enzimas DNA polimerasa *Taq* (Fermentas, E.E.U.U.), RNasaA (Invitrogen, Promega, E.E.U.U.) y la enzimas DNA ligasa de T4 (Fermentas, E.E.U.U.), RNA polimerasa de T7 (Fermentas, E.E.U.U.). RNasin® Ribonuclease inhibitor (Fermentas, E.E.U.U.).

Las endonucleasas de restricción utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Endonucleasas de restricción utilizadas en este estudio.

Enzima	Procedencia	Sitio de corte (5'-3')
<i>XbaI</i>	Fermentas, E.E.U.U.	5'...T [^] CTA GA...3'
<i>EcoRI</i>	Ferments, E.E.U.U.	5'...G [^] A A T T C...3'
<i>NcoI</i>	New England BioLabs, E.E.U.U.	5'...C [^] C A T G G...3'
<i>BamHI</i>	Fermentas, E.E.U.U.	5'...G [^] A G A T C C...3'
<i>SmaI</i>	Fermentas, E.E.U.U.	5'...C C C [^] G G G...3'
<i>StuI</i>	Fermentas, E.E.U.U.	5'...A G G [^] C C T...3'

4.6 Sistemas Comerciales.

Los sistemas utilizados fueron: Rabbit Reticulocyte Lysate System (RRL) tratado con nucleasa micrococcal (Promega), Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (Promega, E.E.U.U.), mMessage mMachine® (Ambion®, E.E.U.U.), Favor Prep Gel/PCR Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp. E.E.U.U.), Pure Yield™ Plasmid Midiprep system (Promega, E.E.U.U.).

4.7 Anticuerpos y otros reactivos para Western Blot.

Para determinar el corte proteolítico de la proteasa L sobre el factor eIF4GI, se utilizó el anticuerpo policlonal (1:5000 en tris-HCL 10mM pH 8,0, NaCl 150mM, Tween 20 0,5%, leche al 5%) contra los fragmentos N- y C-terminal del factor eIF4GI (Amablemente proporcionado por L. Carrasco, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, España). El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) diluido en TBS (1:5000).

Las soluciones para el ensayo de western se prepararon de la siguiente manera:

En DMSO: Acido cumárico: 90mM (74g/5mL). Guardar a -20°C.

Luminol: 250mM (443mg/10mL). Guardar a -20°C.

Solución A: 5mL de Tris-HCl 100mM pH 8,5

22µL del "stock" de ácido cumárico

50 μ L del “stock” de luminol

Solución B: 5mL de Tris-HCl pH 8,5, 100mM

3 μ L de H₂O₂ 30%

Mezclar y utilizar de inmediato.

4.8 Otros Reactivos y Materiales.

Agua libre de nucleasas (Fermentas)

Tampón TAE 50X: 242g Tris base en 750mL de agua, 57,1mL de ácido acético glacial y 100mL de EDTA 0,5M pH 8,0 y aforar a un volumen de 1L.

Medios de cultivo: Para cultivo celular se utilizó HyClone® Medio Líquido Clásico: Dulbecco's Modified Eagles Medium, alto en glucosa. (Thermo Scientific, E.E.U.U.) suplementado con suero fetal de bovino 10% (Hyclone), antibiótico penicilina/estreptomina (Gibco Life Technologies.). Las células se mantuvieron en botellas de cultivo de 175cm³ a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% en estufa (NU-5500 Direct Heat CO₂ Incubator).

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó caldo Luria-Bertani (LB) (MoBio, E.E.U.U.), esterilizado en autoclave. El medio para el crecimiento de bacterias en placa fue LB Agar (MoBio, E.E.U.U.).

De Winkler se obtuvieron agarosa, glicerol, cloruro de calcio, acrilamida/bisacrilamida.

De Bio Rad se obtuvo el reactivo de Bradford *BioRad Protein Assay (reactive Bradford 5X)*.

De Fermentas se obtuvieron los marcadores de DNA de 100 pares de bases y de 1 kilobase, dNTPs, rNTPs.

De Merck se obtuvieron cloroformo, fenol, ácido acético glacial, isopropanol, alcohol isoamílico, DMSO, etanol, metanol, NaCl, KOH, NaOH.

De Sigma, se obtuvieron albúmina de suero de bovino (BSA), β -mercaptoetanol (β -MeOH) y ampicilina.

De Gibco se obtuvo la tripsina 5%-EDTA.

4.9 Equipos.

En la tabla 4 se detallan los equipos utilizados

Tabla 4: Equipos utilizados.

Equipo	Marca	Modelo
Luminómetro	Berthold Detection Systems	SIRIUS Luminometro
Nanodrop	Thermo Scientific	Nanodrop 1000 Spectrophotometer
Ultracentrifuga	Beckman	L2 65B
Centrifuga	Eppendorf	Centrifuge 5810R
Lector de Elisa	Bio - Tek	EL X 800
Incubadores	Memmert	
Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc	G24 Enviromental Incubator
Termociclador	Applied Biosystems	2720 Thermal Cycler
Espectrofotómetro	Jeneway	6305 Spectrophotometer

5. MÉTODOS.

5.1 Técnicas de DNA Recombinante.

5.1.1 Obtención de mutantes de DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µl y se utilizó la DNA polimerasa *Taq* en las condiciones de reacción recomendadas por el proveedor. Se realizó inicialmente una etapa de desnaturalización incubando la mezcla de DNA, partidores, enzima y tampón a 94°C durante 5min, luego se efectuaron 35 ciclos de 3 etapas: 30seg a 94°C (desnaturalización), 30seg a 53°C (apareamiento, la temperatura depende de la composición de los oligonucleótidos) y 30seg a 72°C etapa de extensión, el tiempo es dependiente del tamaño del producto a amplificar. Para terminar, se realizó una etapa final de elongación, incubando a 72°C por 15min, y se enfrió a 4°C hasta recuperar los tubos. Una vez finalizadas las reacciones de PCR, se analizó el DNA mediante electroforesis en geles de agarosa, (Métodos 5.1.2)

5.1.2 Construcción de la mutante AUG 29.

Debido a la proximidad del codón de inicio al extremo 5', no se pudo utilizar el sistema de inserción de mutaciones comúnmente utilizado (ver más adelante generación mutante AUG 77), por lo que el mutante AUG 29 se generó a partir de una reacción de PCR, utilizando un partidor sentido (Fw) que contenía las sustituciones necesarias para la inserción del codón de inicio en la posición indicada y el partidor anti sentido (Rv) necesario para amplificar el 5' UTR de VIH-1 (Figura 7).

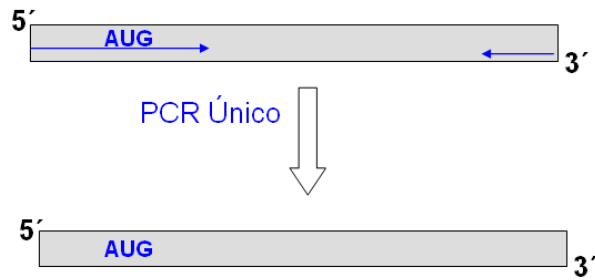


Figura 7: Estrategia utilizada para la generación del mutante AUG 29. Se amplificó mediante PCR la región de interés utilizando un partidor sentido (Mat F2 Fw) que contenía las mutaciones necesarias y el partidor antisentido p2ANTI Rv.

5.1.3 Construcción de la mutante AUG 77.

Para la inserción del codón de inicio en posición 77, AUG 77, primero se realizó un PCR con el partidor externo sentido (VIH1-336f-EcoRIFw) y con el partidor antisentido (Mat R1 Rv) que contiene la mutación a insertar. En paralelo se efectuó un segundo PCR con el partidor antisentido externo (FlucXbaIRv) y el partidor sentido (Mat F3 Fw), complementario al antisentido que contenía la mutación a insertar. Luego estos dos fragmentos amplificados se agregaron ambos como templado en una tercera reacción de PCR con los partidores externos para generar el fragmento completo, con la mutación requerida.

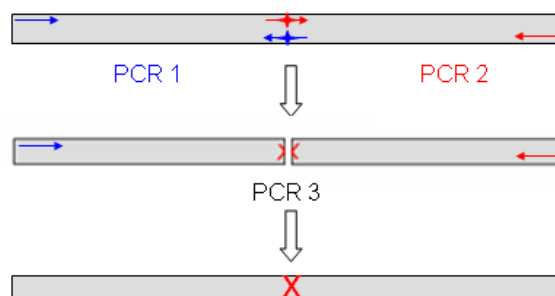


Figura 8: Estrategia utilizada para la generación del mutante AUG 77. Método de PCR-Overlap Extension. Se realizaron tres reacciones de PCR, de las cuales las dos primeras fueron hechas en paralelo con partidores que contenían los sitios mutados y además eran cohesivos entre sí. Luego el producto de estas dos reacciones se usó como templado con de partidores externos, mediante una tercera reacción de PCR.

5.2. Clonamiento.

5.2.1 Clonamiento de fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR.

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR fueron clonados en el vector pGEMTM-T easy (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor. Este sistema está diseñado para la ligación directa de productos obtenidos por PCR que tengan un nucleótido de adenina protuberante al extremo de cada hebra del DNA, lo que ocurre cuando se emplea la enzima DNA polimerasa *Taq*. La ligación de productos en el vector pGEMTM-T easy fue utilizada para obtener grandes cantidades del producto y realizar luego digestiones preparativas para el clonamiento en otros plásmidos.

Para poder evaluar la actividad IRES de los mutantes generados, estos fueron clonados en el plásmido Dual Luciferasa. Para esto los mutantes generados por PCR se clonaron en el vector pGEMTM-T easy, luego el vector con el inserto necesario fue digerido con las enzimas EcoRI y NcoI y ligado mediante una ligación triple en el vector Dual Luciferasa.

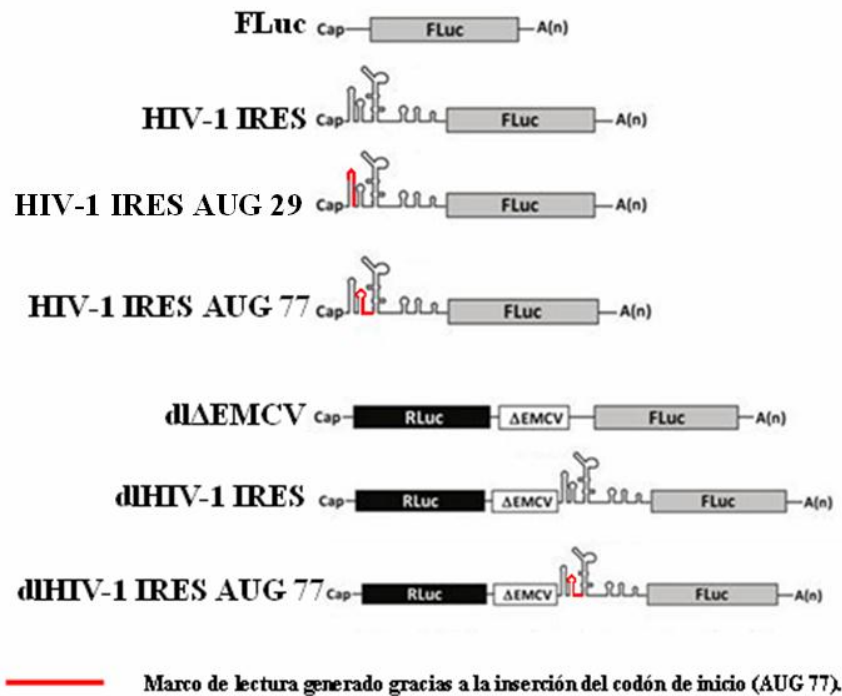


Figura 9: Construcciones de RNA utilizadas. Se muestra un esquema de todas las construcciones de RNA utilizadas en el desarrollo del estudio. FLuc: construcción monocistrónica con el mensajero del gen reportero Luciferasa de Luciérnaga; VIH-1 IRES: construcción monocistrónica que contiene en la región 5'UTR el 5'UTR de VIH-1 en su estado salvaje (wild type); VIH-1 IRES AUG 29: construcción monocistrónica que posee un codón de inicio en contexto óptimo en la base 29 del 5'UTR de VIH-1; VIH-1 IRES AUG 77: construcción monocistrónica que posee un codón de inicio en contexto óptimo en la base 77 del 5'UTR de VIH-1; dΔEMCV: construcción bicistrónica cuya región intercistrónica no posee actividad IRES; dVIH-1 IRES: construcción bicistrónica que contiene el 5'UTR de VIH-1 en su región intercistrónica; dVIH-1 AUG 77: construcción bicistrónica que contiene el 5'UTR de VIH-1 con el codón de inicio en la base 77.

5.2.2 Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

El gel se preparó disolviendo agarosa en amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 90mM, EDTA 2mM, pH 8,4) a una concentración final entre 1 y 2% según el tamaño de los productos que se requiera resolver. Para la visualización de las bandas, se agregó bromuro de etidio 0,05μg/mL al gel. Las muestras se prepararon agregando tampón de carga (Na₂EDTA 0,1M pH 8,0 SDS 1%, azul de bromofenol 0,25%) y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a 100V en amortiguador

TAE 1X. Al finalizar la electroforesis, las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

5.2.3 Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Para las digestiones analíticas (por ejemplo, para analizar la identidad de un plásmido), se incubó el DNA (0,2 a 1,0µg) con 1-10U de la enzima de restricción en un volumen final de 20µl, durante 1h a 37°C y en presencia del tampón correspondiente. Los fragmentos de DNA obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa. Para las digestiones preparativas (por ejemplo, para digerir fragmentos que serán transcritos posteriormente), se tomaron 10 a 50µg de DNA y se incubaron durante toda la noche a 37°C con 5 a 20U de la enzima de restricción y con el tampón correspondiente. Finalmente, el producto de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (Métodos 5.1.2).

5.2.4 Ligación de fragmentos de DNA en plásmidos.

Se mezcló el plásmido digerido con las correspondientes enzimas de restricción y el fragmento de DNA a clonar en una relación 1:3 respectivamente (39). En el caso de una ligación triple las relaciones son de 1:3:3 de plásmido, inserto 1 e inserto 2, respectivamente. La reacción de ligación contiene 100ng de plásmido, el fragmento de DNA, amortiguador de ligación (Tris-HCl 30mM pH 7,8, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 1mM, PEG 8000 5% p/v) y 3U de DNA ligasa del fago T4. Se incubó a 4°C durante 16 horas y se utiliza la mezcla de ligación para transformar bacterias.

5.2.5 Preparación de *Escherichia coli* quimiocompetentes.

Se inoculó la cepa de *Escherichia coli* Top-10 en 10mL de medio LB sin antibiótico y se incubó durante 16h a 37°C con agitación constante. Luego se inocularon 100mL de medio LB sin antibiótico con 5mL del cultivo inicial, y se incubó bajo las mismas condiciones hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,5. Se centrifugó el cultivo a 650g por 10min a 4°C, y se resuspendió el sedimento en 20mL de CaCl₂ 0,1M estéril y frío. Se incubó en hielo entre 30min a 1h y se centrifugó a

650g 10min a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 2mL de CaCl₂ 0,1M y se guardaron a -80°C hasta ser utilizadas.

5.2.6 Transformación de *Escherichia coli*.

Se mezclaron 100µl de células quimiocompetentes recién preparadas en hielo con 10 a 50ng de plásmido o la mezcla completa de la ligación y se incubó en hielo por 30min. Se dio un “shock” térmico a 42°C 1min y se incubó en hielo 2min. Se agregaron 500µl de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C con agitación 1h. Las bacterias se centrifugaron 3min a 650g y el sedimento se resuspendió en 100µl de medio LB. Se sembraron las bacterias en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado. Se incubaron las placas a 37°C 16h o hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado. Las colonias que poseen el plásmido de interés se cultivaron para extraer el DNA plasmidial y posteriormente comprobar mediante digestión enzimática y amplificación por PCR si poseían o no el inserto.

5.2.7 Obtención de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos.

Se crecieron las cepas de *E.coli* que contienen los plásmidos de interés en medio líquido LB por 16h a 37°C. Para la obtención de DNA plasmidial a pequeña escala se incubó un inóculo de 4 a 10mL de bacterias en medio LB con antibiótico, para proceder al método de obtención de DNA plasmidial por lisis alcalina (39). Las bacterias se centrifugaron 5min a 1800g, a 4°C, se removió el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,25mL de solución I (50mM glucosa, 20mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA (pH 8,0). posteriormente se agregaron 0,25mL de solución II (20mM NaOH,1% SDS). Se agregaron 0,25mL de solución III (5M acetato de potasio, ácido acético glacial). Se centrifugó durante 15min a 16000g a 4°C para luego transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Para separar las proteínas se agregó 1 volumen de fenol y se mezcló por vortex, se centrifugó 5 min a 16000g, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y luego se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), nuevamente el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El DNA precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol, se incubó 20min a 4°C y luego se centrifugó 30min a 16000g a 4°C. El sobrenadante se removió y se

agregó 1mL de etanol 70%, luego se centrifugó 30min a 16000g a 4°C. Finalmente se removió el sobrenadante, se secó el sedimento y el DNA se resuspendió en 100µl de agua. Con este método se pueden obtener entre 5 y 18µg de plásmido. Para la obtención de DNA plasmidial a mediana escala, se cultivó un inóculo a partir de 100 a 150mL de bacterias y se utilizó el sistema *Promega PureYield™ Plasmid midiprep System*, según instrucciones del fabricante. Con este sistema se obtienen aproximadamente 100µg de plásmido a partir de 10mL de cultivo bacteriano.

5.3 Técnicas RNA.

5.3.1 Transcripción *in vitro*.

Se utilizó la enzima RNA polimerasa del fago T7 para sintetizar los RNAs con cap y sin cap. Para los RNA sin estructura cap se utilizó la RNA polimerasa T7 en las condiciones que indica el proveedor. Para los con estructura cap se utilizó el sistema comercial mMessage mMachine® de acuerdo con las indicaciones del proveedor y para los RNAs que requerían poli(A) se utilizó el sistema comercial PolyA Tailing Promega. El plásmido pcDNA3.1 con el inserto de interés (1 a 2µg) fue linealizado con la enzima *XbaI*. La síntesis de los RNAs se realizó en volúmenes de 20µl y 25µl para mensajeros con cap y sin cap, respectivamente. La reacción fue tratada con DNaseI para remover el templado de DNA y el RNA fue precipitado con LiCl 2M. El RNA fue resuspendido en 25µl H₂O libre de nucleasas. Para determinar la concentración de RNA, se tomó 1µl de las muestras y se midió su concentración en el Nanodrop, la integridad del RNA fue confirmada por una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. (Métodos 5.2.2)

Como manera alternativa de generación de mRNAs monocistrónicos, se transcribió directamente desde el producto de PCR amplificado con un partidor que posee el promotor transcripcional T7 en su secuencia (Mat F1 Fw). Luego de amplificar por PCR, se precipitaron los DNAs con 1/10 de volumen de acetato de amonio, dos volúmenes de etanol absoluto e incubados 1hr a -20°C para luego centrifugar 30 minutos a 16000g a 4°C. Se removió el sobrenadante, se agregó 1mL de etanol 70%

y se centrifuga 30min a 16000g a 4°C. Finalmente se removió el sobrenadante y se secó el sedimento. El DNA es resuspendido en 10µl de agua libre de nucleasas.

Para efectos prácticos de gráficas y escritura la nomenclatura utilizada para los RNAs generados es la siguiente: ++ representa a los RNAs que poseen cap y cola poli A y +/- representa a los RNAs que sólo poseen cap.

5.3.2 Electroforesis de RNA en gel de agarosa en condiciones desnaturalantes.

Se separaron los RNAs de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalantes. Se emplearon geles de agarosa al 1,5%, con formaldehído al 1% y MOPS 1X (MOPS 20mM; acetato de sodio 8mM; EDTA 1mM, pH 7,0). Se tomaron 3µl de RNA y se agregó 7µl de amortiguador de carga 1,2X (MOPS 62 mM, acetato de sodio 25mM, 3mM EDTA, formaldehido 20,5 % v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,05%, bromuro de etidio 15µg/mL) hasta un volumen final de 10µl. Las muestras se calentaron a 75°C 5min, se enfriaron a temperatura ambiente y se cargaron en el gel de agarosa previamente estabilizado en amortiguador de corrida (MOPS 1X/Formaldehído 7%). Se realizó la electroforesis en el amortiguador MOPS 1X a un voltaje constante de 100V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

5.4 Traducción *in vitro* y ensayos de luciferasa.

5.4.1 Traducciones *in vitro*.

Las traducciones *in vitro* se realizaron a distintas concentraciones de RRL. A concentraciones finales de 1 y 5ng/µL de RNA en un volumen final del 3µL, el lisado se trató con nucleasas. La cantidad de aminoácidos y de inhibidor de RNAsas utilizados fueron las indicadas por el fabricante para el volumen necesario de reacción. Las reacciones de traducción fueron incubadas a 30°C en un baño termostático durante 1h 30min.

5.4.2 Traducciones Suplementadas.

Las traducciones *in vitro* suplementadas con extractos celulares o con fracciones de extractos celulares fueron realizadas de la misma manera descrita en la sección anterior con la diferencia de que antes de agregar el RNA a la reacción, se suplementó con el elemento a estudiar, a diferentes concentraciones finales.

5.4.3 Traducciones en presencia de edeína.

Las traducciones *in vitro* realizadas en presencia de edeína, se efectuaron a un 35% de RRL y con una concentración final de RNA de 1ng/μL. El extracto celular o la fracción que suplementó la reacción se agregó a la mezcla de traducción antes de agregar el RNA. Una vez que se agregó todo lo correspondiente a la mezcla en el orden correlativo indicado, se agregó finalmente la edeína en las cantidades necesarias. Esta mezcla se incubó 15min a 30°C para finalmente agregar el RNA a la reacción e incubar durante 1hr y 30min.

5.4.4 Síntesis de proteasa.

La síntesis de proteasa se realizó desde el vector pMM1 el cual se linearizó con la enzima de restricción *XbaI* y se transcribió según Métodos 5.2.1.

Posteriormente se tradujo la proteasa *in vitro* en el sistema RRL Flexi (Promega) con las siguientes modificaciones: se utilizaron 2μg de RNA total en una reacción de 200μL con 50% del volumen de RRL Flexi con 4μL de aminoácidos con una concentración final de KCl de 75mM y 0,1mM de MgCl₂.

El producto de traducción se ultracentrifugó a 100000g durante 40min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y guardado a -80°C hasta su utilización.

5.4.5 Traducción en presencia de proteasa.

Los ensayos suplementados con proteasa fueron realizados en las mismas condiciones descritas anteriormente (Métodos 3.1). Previo a la adición del RNA a

la mezcla de reacción, se agregaron 0,15µL de proteasa sintetizada en RRL, mezcla que se preincubó a 30°C durante 15min, para luego agregar el RNA y proseguir la traducción a 30°C durante 1hr 30min.

5.4.6 Ensayo de luciferasa.

La actividad de luciferasa fue determinada utilizando el sistema Luciferase® Reporter Assay System, para lo cual se alicuotó 1µL de la reacción de traducción y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga. Para ello se agregó 5µL Luciferase Assay Reagent I (LAR I). Para los ensayos con mensajeros bicistrónicos se utilizó el sistema comercial Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System. Se tomó una alicuota de 1 µL de la reacción de traducción y se determinó primero la actividad de luciferasa de luciérnaga para lo cual se agregaron 5µL Luciferase Assay Reagent II (LAR II) y luego se midió en el luminómetro. Sobre la misma muestra se midió la actividad de luciferasa de Renilla, para lo cual se agregaron 5µL Stop&Glo® Reagent y se midió nuevamente en el luminómetro.

5.5 Análisis de proteínas.

5.5.1 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

Para realizar esta medición se utilizó el reactivo de Bradford 5X (BioRad Protein Assay). Se diluyó el reactivo 5 veces con agua tridestilada. Se tomó 1µl de cada extracto proteico y se les agregó 0,2mL de reactivo. Las muestras se agitaron vigorosamente, se dejó a temperatura ambiente durante 5min y se midió la absorbancia a 595nm en un lector de ELISA. En paralelo se realizó una curva de calibración con albúmina de suero de bovino (BSA) con cantidades correspondientes a 1, 2, 3 y 4µg de BSA. Se midieron todas las absorbancias en duplicado.

5.5.2 Fraccionamiento de extractos celulares por cromatografía de exclusión.

La calibración de la columna Superdex 200 se llevó a cabo con el tampón de elución (Tris HCl 20mM, pH 7,5; NaCl 0,1M), a un flujo de 0,5mL/min, por dos

volúmenes de columna vacía (volumen vacío, V_0). Después se inyectó 1mg/200 μ L de tampón de calibración de la muestra de las proteínas estándar (citocromo C, seroalbúmina y deshidrogenasa alcohólica), y se recolectaron las fracciones cada 1min. Finalmente, la columna fue lavada con 2 volúmenes de tampón de calibración. La determinación del tiempo de retención se realizó con la fórmula $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ donde V_e es el volumen de elución de cada muestra y V_0 está dado por la elución del azul de dextrano y V_t es el volumen total de la columna (31,12mL).

Se inyectaron aproximadamente 1mg de los extractos de células HeLa en G2/M en la columna equilibrada con tampón hipotónico en ausencia de DTT. Se colectaron fracciones de 0,5mL que fueron almacenados a 4°C.

5.5.3 Ultracentrifugación.

La proteasa-L fue utilizada en ensayos traduccionales *in vitro*, para proteolisar el factor eIF4G y de esta manera disminuir la actividad traduccional cap-dependiente. Fue sintetizada como se explica en 2.3.4. y luego esta proteasa se ultracentrifugó a 45000rpm durante 1h 20min a 4°C en la ultracentrífuga. El sobrenadante fue alicuotado y almacenado en alícuotas a -80°C.

5.5.4 Western Blot.

Para el análisis del corte de eIF4G por la proteasa del virus de la fiebre aftosa, las reacciones de traducción en RRL en ausencia o presencia de proteasa L fueron resueltas en un gel de poliacrilamida en gradiente (5-20%) en condiciones desnaturantes y transferidos a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia a 200mA 2h en presencia de tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, pH 8,3). Las proteínas transferidas fueron tratadas con solución de bloqueo (Tween-20 0,05% y leche descremada 5% en PBS) toda la noche a 4°C. La membrana fue lavada 2 veces con TBS y luego incubada 4h a temperatura ambiente con una mezcla de anticuerpos policlonales anti eIF4GI. Nuevamente la membrana fue lavada 3 veces con TBS e incubada con

el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) diluido en TBS (1:5000) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana fue lavada 3 veces con TBS y revelada con una solución luminol-ácido cumárico.

5.6 Cultivo Celular.

5.6.1 Crecimiento, tripsinización y expansión celular.

Se descongelaron en gabinetes de bioseguridad de nivel II 5×10^6 células de la línea celular HeLa, provenientes del nitrógeno líquido en 1mL de medio de congelación (SFB 90% y 10% DMSO). Las células fueron resuspendidas en 10 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 pH 7,4), 10 % SFB y se centrifugaron a 1500 RMP durante 10 minutos a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo en 10mL de medio DMEM (Gibco) 10% SFB (Hyclone), con 50U de antibióticos penicilina/estreptomicina. Se cultivaron en frascos de poliestireno (Nunc) de una superficie de 75cm^2 los cuales poseen un filtro en su tapa que les permite el intercambio gaseoso y se incubaron en una estufa de cultivo con CO_2 al 5% a 37°C.

Luego que las células se han adherido al fondo de la botella y han llegado entre un 70% a un 90% de confluencia, en gabinetes de bioseguridad de nivel II se remueve el medio de cultivo y se añade 5mL de PBS 1X para remover el remanente de suero del medio de cultivo (esta etapa de lavado con PBS se repite 3 veces). Se remueve el PBS 1X y se agregó 1mL tripsina 1X y se incubó un minuto en estufa a 37°C. Una vez que las células estaban separadas se agregó 30mL de medio completo y se dividieron en tres botellas de 75cm^2 . Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo con 5% de CO_2 a 37°C.

5.6.2 Arresto celular.

Para obtener células detenidas en G2/M, las células alcanzaron un 70% de confluencia y se lavaron con PBS 1X. Luego se les agregó medio DMEM completo

con una concentración de nocodazol de 400ng/mL. Las células luego se incubaron durante 19h en estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37°C.

5.6.3 Preparación de extracto celular.

Luego de las 19h de incubación en presencia de la droga nocodazol, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío para luego ser tripsinizadas agregando 1mL de tripsina 1X a cada botella de cultivo. Posteriormente las células se resuspendieron en 5mL de DMEM con SFB 20%, se incubaron en hielo y luego se centrifugaron a 420g durante 5min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 5mL de PBS 1X frío, centrifugando nuevamente a 420g durante 5min a 4°C. Este procedimiento de lavado de las células con PBS 1X se repitió dos veces. Se separaron 1x10⁶ células para citometría de flujo y el sedimento restante se resuspendió en 2 volúmenes de amortiguador hipotónico (Hepes KOH 10mM, pH 7,6, KOAc10mM, MgOAc₂ 0,5mM, DTT 1mM). Las células resuspendidas en el amortiguador hipotónico se incubaron en hielo durante 30min y luego se pasaron 20 veces a través de una jeringa de 23G. Después de ser pasadas por la jeringa, las células se lisaron en un homogenizador celular mecánico para obtener de este modo una lisis celular exhaustiva. Para comprobar que las células estaban lisadas se tiñó el extracto con azul de tripán y se observó al microscopio. El extracto se centrifugó a 16000g durante 30min a 4°C. El sobrenadante se alicuotó en volúmenes desde 5 a 30µL, dependiendo de la concentración proteica que poseía el extracto, y se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y luego se almacenó a -80°C.

5.6.4 Citometría de flujo.

Una vez que las 1x10⁶ células se separaron se centrifugaron a 420g durante 5min. El sedimento se resuspendió en 333µl de PBS 1X, así las células están listas para ser fijadas. La fijación se efectuó agregando 666µl de etanol absoluto frío mientras se agitaba suavemente en vortex. Una vez terminada la fijación se guardaron las células a 4°C hasta su uso. Para medir las muestras, se lavaron dos veces con 2mL de PBS 1X, centrifugando a 420g 5min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 0,5mL de PBS 1X con RNAsa A (0,2µg/mL) y se incubó durante 30min a 37°C. Se

agregó yoduro de propidio a una concentración 30µg/mL y se incubó 30min a 37°C. Las muestras fueron analizadas por clasificación celular de fluorescencia-activada (FACS) con un instrumento de FACS con laser-simple (Becton Dickinson) combinado con el programa WinMidi.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.

6.1 Función de los mutantes para la región 5'UTR del mRNA de VIH-1.

La región 5'UTR de VIH-1 posee un elemento IRES que es funcional durante el estadio G2/M del ciclo celular (14). Además, el mensajero completo de VIH-1 posee una estructura cap en su extremo 5' y una cola poli(A) en su extremo 3'. Estos antecedentes nos han llevado a postular que la iniciación de la síntesis de proteína a partir del mRNA viral puede ser de manera cap- dependiente o bien de manera IRES-dependiente, asemejándose de esta manera al modo de acción de un mRNA celular que posee IRES. Para evaluar esta posibilidad se construyó un vector monocistrónico en el cual la traducción del gen reportero está comandada por la región 5'UTR de VIH-1 y que además posee un codón de inicio en contexto óptimo, río arriba del IRES mínimo, en desfase con el AUG de inicio del gen reportero. Esta aproximación experimental permite diferenciar la iniciación cap-dependiente de la dependiente de IRES. En esta construcción la traducción de la proteína reportera FLuc es mediada por el IRES, mientras que la actividad cap-dependiente determina la síntesis de un péptido pequeño. Por su pequeño tamaño el péptido generado no puede ser detectado en geles de proteínas, por tanto se considera que la ausencia de la proteína reportera refleja la iniciación de la traducción cap-dependiente (Figura 10).

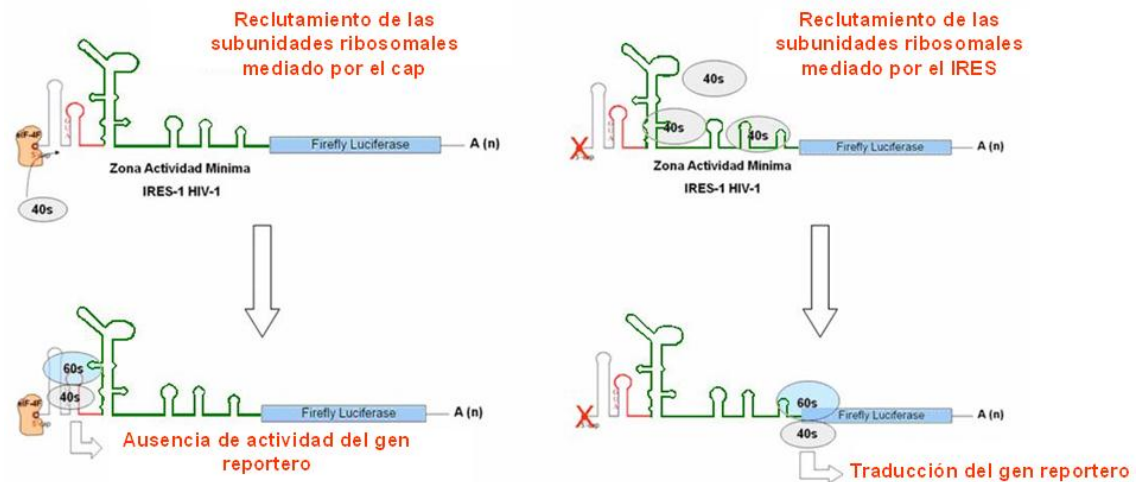


Figura 10: Esquema explicativo del diseño experimental. Para diferenciar, la zona de actividad mínima IRES se grafica con color verde y el ORF generado por la presencia del codón de inicio introducido se muestra de color rojo, la [X] representa la inhibición del inicio de la traducción cap-dependiente. Gracias al uso de esta construcción se espera diferenciar el inicio de la traducción cap-dependiente del inicio de la traducción IRES dependiente en un contexto monocistrónico. Puesto que la síntesis de la proteína reportera está asociada sólo al inicio IRES dependiente.

Se construyeron dos mutantes con codones de inicio antes de la zona mínima de actividad IRES:

- AUG 29
- AUG77

Los nombres dados a los mutantes corresponden a la posición de la adenina del codón de inicio en el 5'UTR de VIH-1.

7. RESULTADOS.

7.1 Secuenciación de mutantes.

Los mutantes generados fueron enviados a secuenciar a Macrogen INC, E.E.U.U. El alineamiento de las secuencias obtenidas permitió verificar la introducción de las mutaciones necesarias para dar origen al mutante AUG 29 y AUG 77 (Fig. 10).

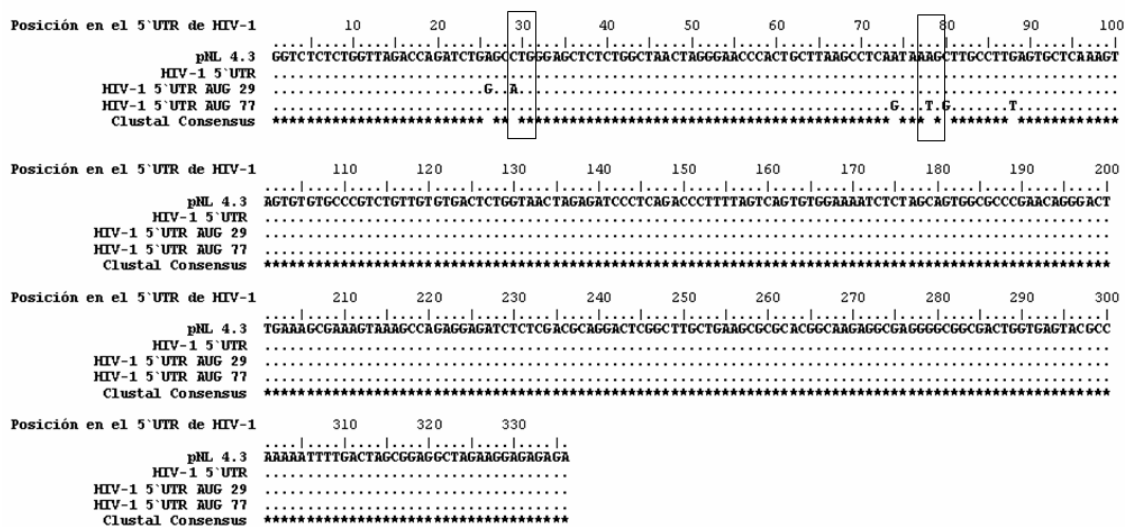


Figura 11: Secuencias de los mutantes generados. Alineamiento de secuencias entre 5'UTR de VIH-1 silvestre y los mutantes que poseen los codones de inicio introducidos en la posición 29 y 77, respectivamente.

7.2 Síntesis *in vitro* de RNAs.

La síntesis de los RNAs bicistrónicos se llevó a cabo a partir de los DNAs linealizados con la enzima XbaI según lo indicado en la sección 5.1.4.

Para la síntesis de los RNAs monocistrónicos se utilizó como sustrato el producto de PCR cuyo partidor Fw poseía el promotor transcripcional T7 requerido para la transcripción (Partidores MatF1 y MatF2).



Figura 12: Visualización de los RNAs sintéticos utilizados. Las muestras de RNAs sintetizados se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5% en condiciones desnaturantes (sección 5.2.2).

7.3 Determinación de la funcionalidad del IRES en las construcciones monocistrónicas.

Una vez que se confirmó la obtención de las construcciones mediante secuenciación, se procedió a determinar la funcionalidad del IRES realizando ensayos de traducción con las construcciones monocistrónicas (Figura 13). Los resultados muestran que la actividad traduccional de las construcciones generadas es mayor que la actividad de la cepa WT, para la mutante AUG 29 y menor para la mutante AUG 77. Con este resultado se observa que la construcción correspondiente al mutante AUG 77 cumple la función de separar las actividades cap-dependiente de la IRES dependiente, para la cual fue diseñado. El comportamiento de la mutante AUG 29 no da cuenta de la separación del inicio cap-dependiente del inicio IRES-dependiente, sino más bien indica una exacerbación del inicio cap-dependiente (ver discusión), por lo cual el resto del trabajo se centra en el uso de la mutante AUG 77.

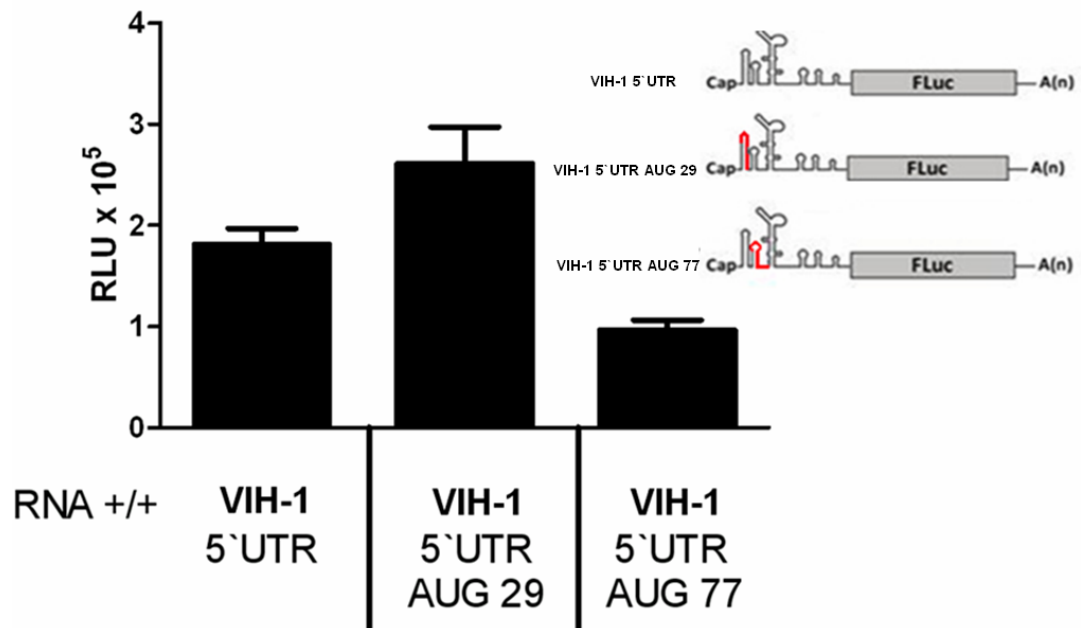


Figura 13: Determinación de la actividad luciferasa de luciérnaga en construcciones monocistrónicas que poseen codones de inicio en contexto óptimo y en desfase con respecto al codón de inicio del gen reportero antes de la zona mínima del IRES-1 de VIH-1. Cada medición corresponde a tres experimentos independientes realizados en triplicado.

7.4 Determinación de la funcionalidad IRES del mutante AUG 77.

Una estrategia para determinar la funcionalidad del IRES es mediante el uso de construcciones bicistrónicas, las cuales poseen el elemento IRES a determinar en su región intercistrónica, así la síntesis del primer cistrón estará mediada por un mecanismo cap-dependiente y la del segundo cistrón estará mediada por un mecanismo IRES, dependiente de la región intercistrónica.

Debido a que los IRES son muy sensibles a cambios estructurales y de secuencia, (ya que pueden perder su funcionalidad debido a pequeños cambios en estos patrones [32]), fue necesario determinar si las mutaciones introducidas antes de la zona mínima de actividad IRES de VIH-1, eran capaces de eliminar o afectar la actividad IRES del 5'UTR de VIH-1. Para esto se utilizaron construcciones bicistrónicas en ensayos de traducción *in vitro*. Los resultados mostraron que la actividad IRES del mutante AUG 77 no es afectada significativamente en

comparación al WT. Por tanto, se concluye que en un contexto bicistrónico la mutación AUG 77 no altera la actividad del IRES-1 de VIH-1 (Figura 14).

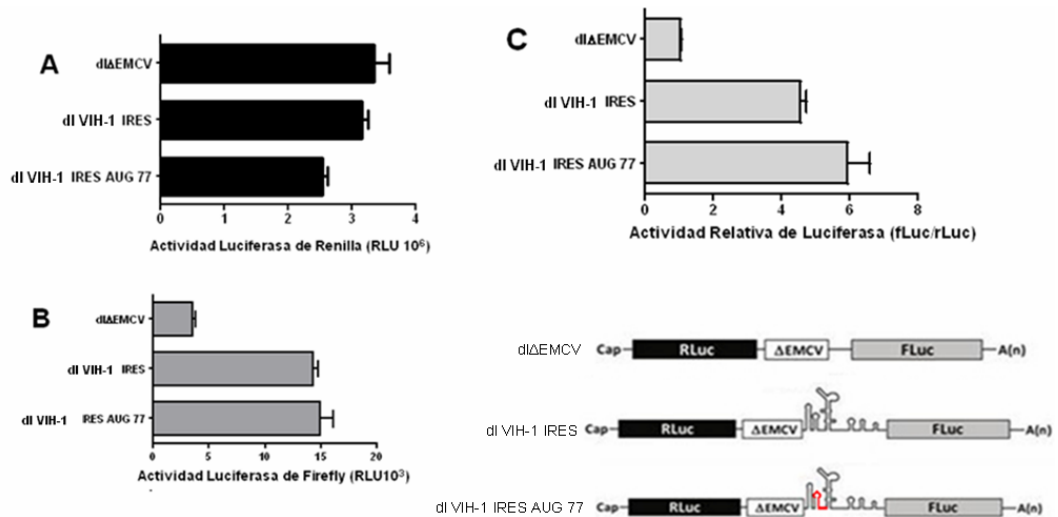


Figura 14: Evaluación del efecto del codón de inicio introducido en el IRES-1 de VIH-1 sobre su funcionalidad. Traducción *in vitro* de los RNAs bicistrónicos en lisado de reticulocito de conejo tratado con nucleasas (RRL, Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones; se utilizaron 5ng/mL de RNA total en 35% del volumen de RRL para una reacción de 3mL; 0,03mL de aminoácidos; 0,06mL de inhibidor de ribonucleasas, con una concentración final de acetato de potasio 40mM y MgCl₂ 2,5mM. La mezcla de reacción de traducción se incubó durante 90 min a 30°C. **Panel A.** Actividad del primer cistrón luciferasa de Renilla. **Panel B.** Actividad del segundo cistrón luciferasa de luciérnaga. **Panel C.** Razón Fluc/Rluc, da cuenta de la actividad IRES de cada una de las construcciones independiente la cantidad de RNA presente en el ensayo. *Cada medición corresponde a tres experimentos independientes realizados en triplicado.*

7.5 Actividad proteolítica de la proteasa-L del virus de la fiebre aftosa.

Con el fin de independizar el sistema de traducción *in vitro* del inicio de la traducción cap-dependiente se utilizó la proteasa-L del virus de la fiebre aftosa. Para esto las mezclas de reacción se incubaron a diferentes tiempos a una temperatura de 30°C con la proteasa-L. Con esto se logró proteolizar el factor eIF4G responsable de la unión del complejo eIF4F al cap. El efecto de la acción de la proteasa se logró determinar mediante Western blot con anticuerpo contra la región carboxilo terminal de eIF4GI. En el panel A de la figura 15 se esquematiza el mecanismo mediante el cual la proteasa L corta el factor de inicio de la traducción eIF4GI,

desacoplándolo del inicio de la traducción cap-dependiente, causando una disminución de la traducción cap-dependiente. En el panel B de la figura 15 se muestra el Western blot del factor de inicio eIF4GI en un gel de poliácridamida en gradiente (5-20%) con anticuerpo contra la región carboxilo terminal del factor. Esto nos muestra que efectivamente la proteasa corta el factor eIF4G de los extractos traduccionales usados para realizar traducciones *in vitro*. En consecuencia en estos extractos el inicio de la traducción cap-dependiente estará inhibida.

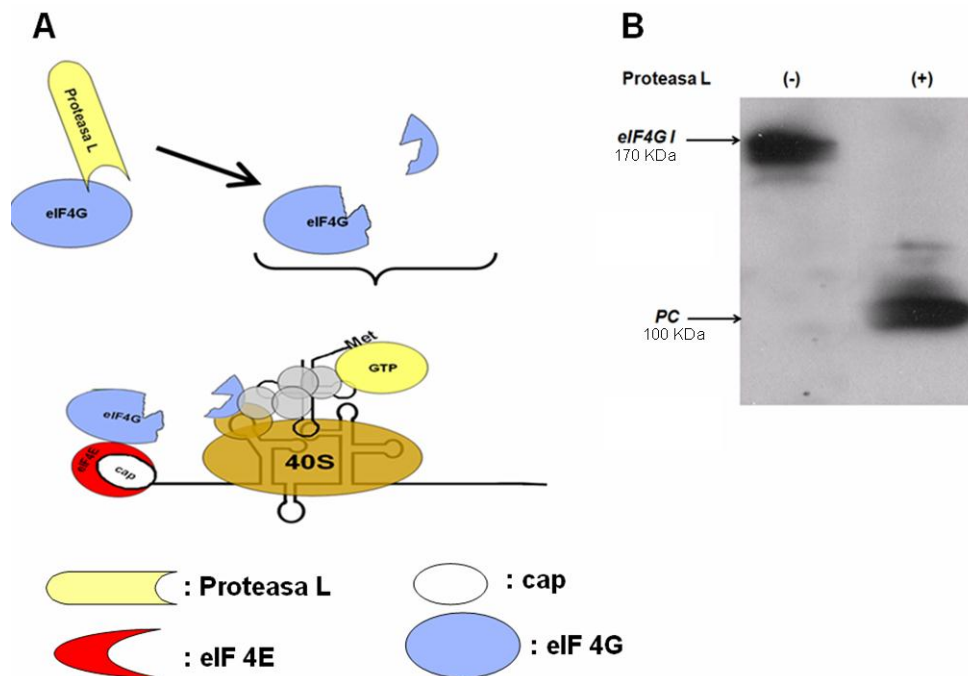


Figura 15: Efecto de la proteasa-L del virus de la fiebre aftosa sobre el factor eIF4G. Panel A. Esquema del efecto proteolítico de la proteasa L sobre el factor de inicio de la traducción eIF4G. **Panel B.** Reacciones de traducción en RRL en ausencia (-) o presencia (+) de la proteasa L del virus de la fiebre aftosa fueron resultas en un gel de poliácridamida en gradiente (5-20%) en condiciones desnaturantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos policlonales contra el fragmento C-terminal de eIF4G I. Se indica la presencia del factor eIF4GI integro y del producto del corte (PC) proteolítico de la proteasa L.

7.6 Funcionalidad IRES en presencia de proteasa-L del virus de la fiebre aftosa.

Mediante la traducción *in vitro* de las construcciones monocistrónicas en presencia de proteasa-L se determinó la funcionalidad neta del IRES-1 de VIH-1 (Figura 16). Esto ya que al tratar el medio donde se realizara la reacción con la proteasa L, se logra eliminar la capacidad de unión al cap del complejo de iniciación a través del factor eIF4G. De esta manera la actividad observada corresponde solamente al inicio de la traducción IRES dependiente (Figura 15 A). Los resultados presentados en la figura 16, muestran que la presencia de la proteasa L afecta la traducción dirigida por la región 5'UTR del mRNA de VIH-1. Sin embargo, la inhibición sólo llega a niveles traduccionales similares a lo observado con el mutante VIH-1 5'UTR AUG 77. Por otro lado la presencia de la proteasa L no afecta la traducción dirigida por la región 5'UTR del mRNA que contiene la mutación AUG 77. Estos resultados indican que el 100% de la actividad observada con el mutante VIH-1 5'UTR AUG 77 corresponde a actividad IRES. En conjunto los resultados presentados sugieren que la iniciación de la traducción a partir de la región 5'UTR del mRNA de VIH-1 corresponde a la sumatoria de la iniciación de la traducción mediada por cap e IRES.

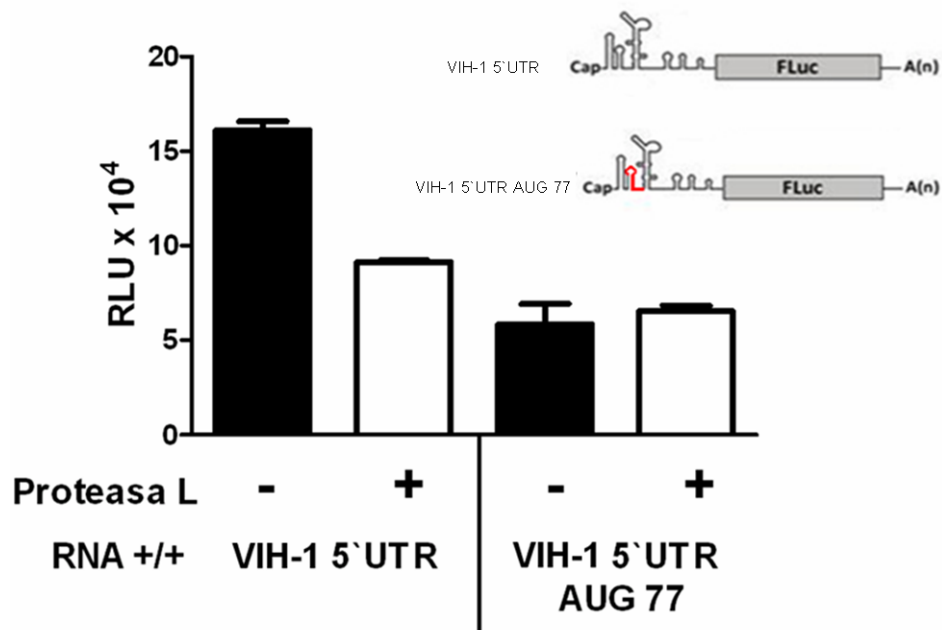


Figura 16: Traducción *in vitro* en presencia y ausencia de proteasa-L. En lisado de reticulocito de conejo tratado con nucleasas (RRL,) siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones, se utilizaron 5ng/mL de RNA total en 35% del volumen de RRL para una reacción de 3mL; 0,03mL de aminoácidos; 0,06mL de inhibidor de ribonucleasas, con una concentración final de acetato de potasio de 40mM y cloruro de magnesio de 2,5mM. La mezcla de reacción se incubó 15min a 30°C en presencia y en ausencia de proteasa-L para luego traducir los mRNA durante 90 min a 30°C. Cada medición corresponde a tres experimentos independientes realizados en triplicado.

7.7 Sincronización celular de células HeLa, para la síntesis de extracto.

Con el fin de establecer si la actividad IRES de VIH-1 requiere de factores transactivadores de IRES o ITAFs (por sus siglas en inglés; *IRES Trans Acting Factors*) se procedió a evaluar el efecto de la adición de extractos celulares a la reacción de traducción *in vitro*. Para preparar los extractos, los cultivos de células HeLa fueron sincronizados como se explica en el punto 5.6.2. Estas células fueron analizadas por citometría de flujo para comprobar su estado de sincronización como se muestra en la figura 17, donde se puede ver que las células tratadas con la droga poseen una mayor población en el estado celular correspondiente a G2/M. Luego las células sincronizadas fueron utilizadas para la preparación de extractos citoplasmáticos. Estos extractos fueron posteriormente utilizados para suplementar las reacciones de traducción *in vitro* (ver más adelante punto 7.8).

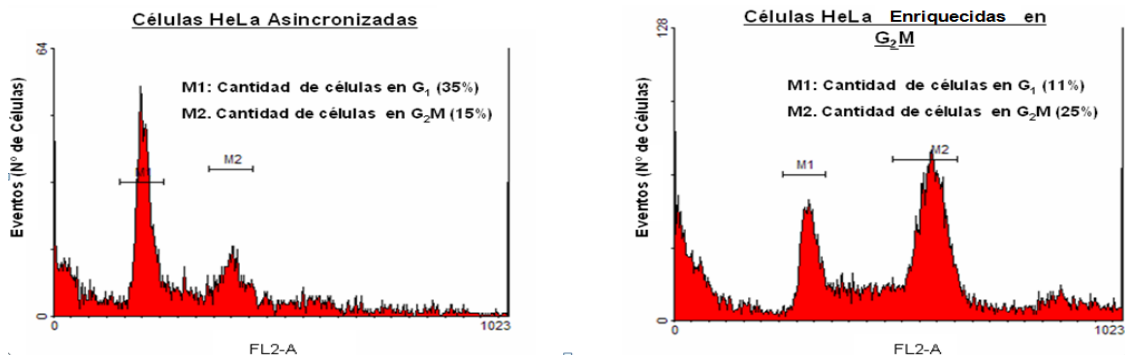


Figura 17: Citometría de flujo de células no sincronizadas y sincronizadas. Las células utilizadas para la síntesis de extractos fueron sincronizadas con el uso de nocodazol y analizadas mediante citometría para comprobar su estado de sincronización.

7.8 Incremento de la función del IRES mediado por los factores trans activadores de IRES (ITAFs).

Los elementos IRES requieren de factores proteicos para su regulación, estos factores se denominan ITAFs (por sus siglas en ingles; *IRES Trans Acting Factors*). Como se conoce además que el IRES -1 de VIH-1 es capaz de comandar el inicio de la síntesis de proteínas durante la etapa G2/M del ciclo celular (14), es lógico pensar que los ITAFs necesarios para el IRES-1 de VIH-1 se encuentran en la célula durante esta etapa del ciclo celular. Con el fin de evaluar si la presencia de extractos modifica la funcionalidad del IRES de VIH-1 se efectuaron ensayos de traducción en RRL suplementados con extractos celulares de células HeLa no sincronizadas y sincronizadas en G2/M. Además se efectuaron ensayos de traducción suplementados con las diferentes fracciones proteicas, separadas mediante cromatografía, de los diferentes extractos, como muestra la figura 18, en la que se pueden ver los perfiles de las cromatografías de los extractos sincronizados en el panel A y los extractos asincronizados en el panel B. Estos ensayos se realizaron como primera aproximación para identificar cuál o cuáles son los factores responsables de estimular o sostener la actividad IRES dependiente.

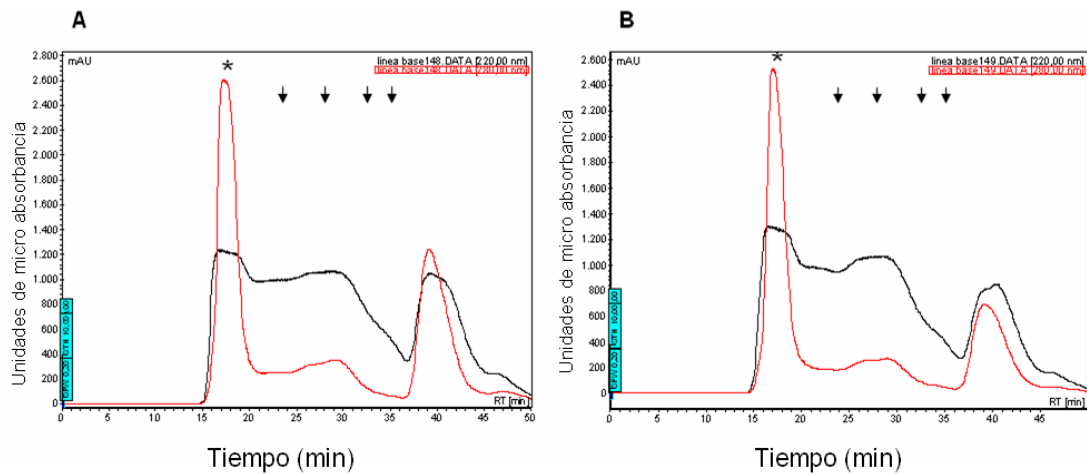


Figura 18: Fraccionamiento de extractos proteicos de células HeLa por FPLC. Preparaciones de 2 mg de proteínas (200 μ L) de extractos sincronizados (A) y asincronizados (B). Fracciones de 0,5 mL fueron colectadas para posteriores ensayos de actividad. Las figuras muestran los perfiles obtenidos a 220 nm (negro) y 280 nm (rojo). Las flechas indican los tiempos de retención de los marcadores moleculares utilizados para calibrar la columna β -amilasa (200 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12.4 kDa), el asterisco señala el tiempo de retención obtenido por el azul dextrano (2000 kDa) equivalente al volumen vacío de la columna.

En la figura 19 panel A, se pueden apreciar las actividades relativas de la luciferasa de Renilla, cuyo inicio de traducción es dependiente del cap, en presencia de las distintas fracciones colectadas en la cromatografía, tanto de extractos celulares arrestados en G2/M como en extractos no arrestados. En el panel B se aprecian las actividades relativas del segundo cistrón (luciferasa de luciérnaga) dependiente de la actividad IRES-1 de VIH-1, en presencia de las distintas fracciones de extractos sincronizados en G2/M y no sincronizados. Finalmente en el panel C se muestra el gráfico de la relación entre los niveles de actividad del segundo cistrón *v/s* el primer cistrón. Estos resultados permitieron identificar la fracción que activa el IRES-1 de VIH-1 como la fracción recolectada en el minuto 29 de la cromatografía, lo que nos indica que al menos un factor proteico presente en aquella fracción es responsable del aumento en la funcionalidad del IRES-1 de VIH-1.

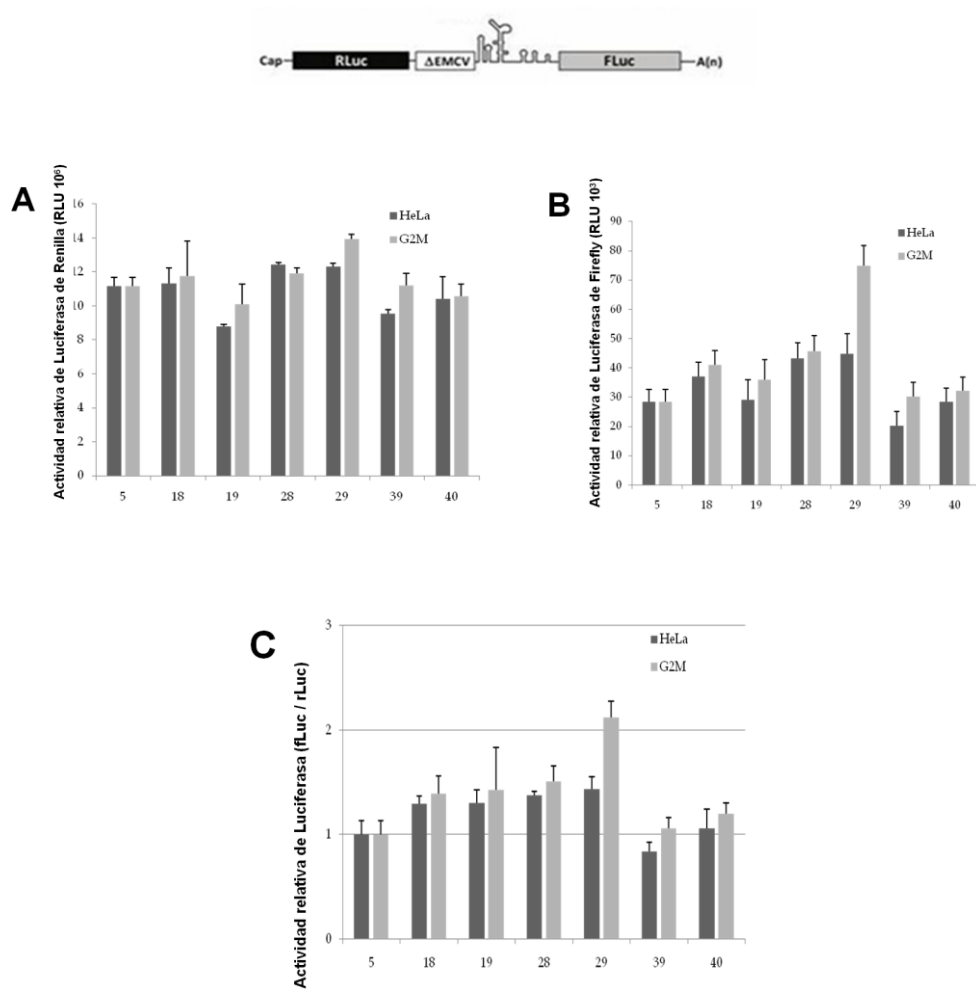


Figura 19: Actividades traduccionales de construcciones bicistrónicas. Contienen el IRES-1 de VIH-1. Se midió la actividad luciferasa de traducciones en lisado de reticulocitos suplementadas con fracciones de extractos de células HeLa asincronizadas y sincronizadas en G2/M, mediante el uso de nocodazol. **A)** Actividad de Renilla nuciferasa en las distintas condiciones de suplementación. **B)** Actividad de Luciferasa de Luciérnaga en las diferentes condiciones de suplementación. **C)** Razón (actividad Fluc/actividad RLuc) en las diferentes condiciones de suplementación. *Cada medición corresponde a tres experimentos independientes realizados en triplicado.*

7.9 Determinación del comportamiento del IRES en presencia del antibiótico edeína.

La edeína es un antibiótico producido por *Bacillus brevis* (48), si bien en procariontes el antibiótico edeína es un inhibidor de la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, pero no impide la acción peptidil transferasa de éste (40). En eucariontes el mecanismo de acción de este antibiótico no ha sido descrito, pero es utilizado como un inhibidor del proceso de “*scanning*” de la subunidad ribosomal 40S ya que se ha generado la hipótesis de un eventual mecanismo de acción que tendría la droga en eucariontes, este se describe como una interacción con el factor de inicio eIF1A (46), el cual es el encargado de estabilizar la unión del Met-tRNA_i con la subunidad ribosomal 40S (47), esta desestabilización de la unión del factor eIF4A con la subunidad 40S desfavorecería el reconocimiento del codón de inicio causando que las subunidades 40S que están realizando “*scanning*” no puedan reconocer el codón de inicio y se produzca una aglomeración de subunidades 40S en la región 5' UTR (48). Por esto este antibiotico se utiliza como herramienta de inhibición del “*scanning*”.

En una construcción monocistrónica cuya región 5' UTR corresponde a un IRES capaz de posicionar al ribosoma directamente sobre el codón de inicio, la síntesis de proteínas no debiese verse afectada por el uso de esta droga ya que el IRES sería capaz de posicionar el complejo de preiniciación sobre el codón de inicio, lo que implica que el tRNA_i queda en el sitio P del ribosoma justo sobre el codón de inicio para iniciar la traducción. En cambio si el elemento IRES posiciona al ribosoma río arriba del codón de inicio, este deberá realizar “*scanning*” para alcanzar el codón de inicio e iniciar la traducción, mecanismo de inicio que se vería afectado al utilizar esta droga ya que el posicionamiento del tRNA_i sobre el codón de inicio no podría efectuarse de manera correcta sobre el AUG luego del “*scanning*”. Siguiendo esta lógica se efectuaron traducciones tanto en las construcciones bicistrónicas como en las construcciones monocistrónicas en presencia de diferentes concentraciones de edeína. La figura 20 panel A, muestra las construcciones bicistrónicas utilizadas como controles para asegurar que el funcionamiento de la droga es correcto. Se

observa que el IRES de HCV es más resistente a la droga que el IRES de poliovirus y que la traducción cap-dependiente (primer cistrón). Se observa también que a concentraciones altas de edeína, la droga inhibe la traducción de todos los RNA utilizados. Se muestra además que el IRES de VIH-1 es resistente a la droga lo cual sugiere que el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal se realiza directamente sobre el codón de inicio de la traducción. Además en la figura 20 se puede observar que la utilización de la fracción de extracto de células HeLa sincronizadas en G2/M aumentan la función del IRES de VIH-1 ya que si bien el IRES de VIH-1 es siempre resistente a la acción de la edeína, su funcionalidad y su resistencia a la droga aumentan si la traducción se le agrega la fracción 29 de las células HeLa sincronizadas en G2/M.

Una vez que se comprobó que el IRES-1 de VIH-1 es resistente a la acción de la edeína (lo que nos indica que no realiza “*scanning*”), se realizaron ensayos en presencia de edeína con el mutante AUG 77 monocistrónico, con el fin de remedar de mejor manera el contexto de los mensajeros virales en una construcción que solo comanda el inicio de la traducción de manera IRES dependiente. Al realizar estos ensayos se observa que el VIH-1 5’UTR AUG 77 es resistente a la droga (panel B). Con esto se concluye que el modo de inicio de la traducción comandado por el IRES-1 de VIH-1 no requiere de “*scanning*” de la subunidad 40S ribosomal, ya que el IRES reclutaría la subunidad 40S directamente sobre el AUG de inicio.

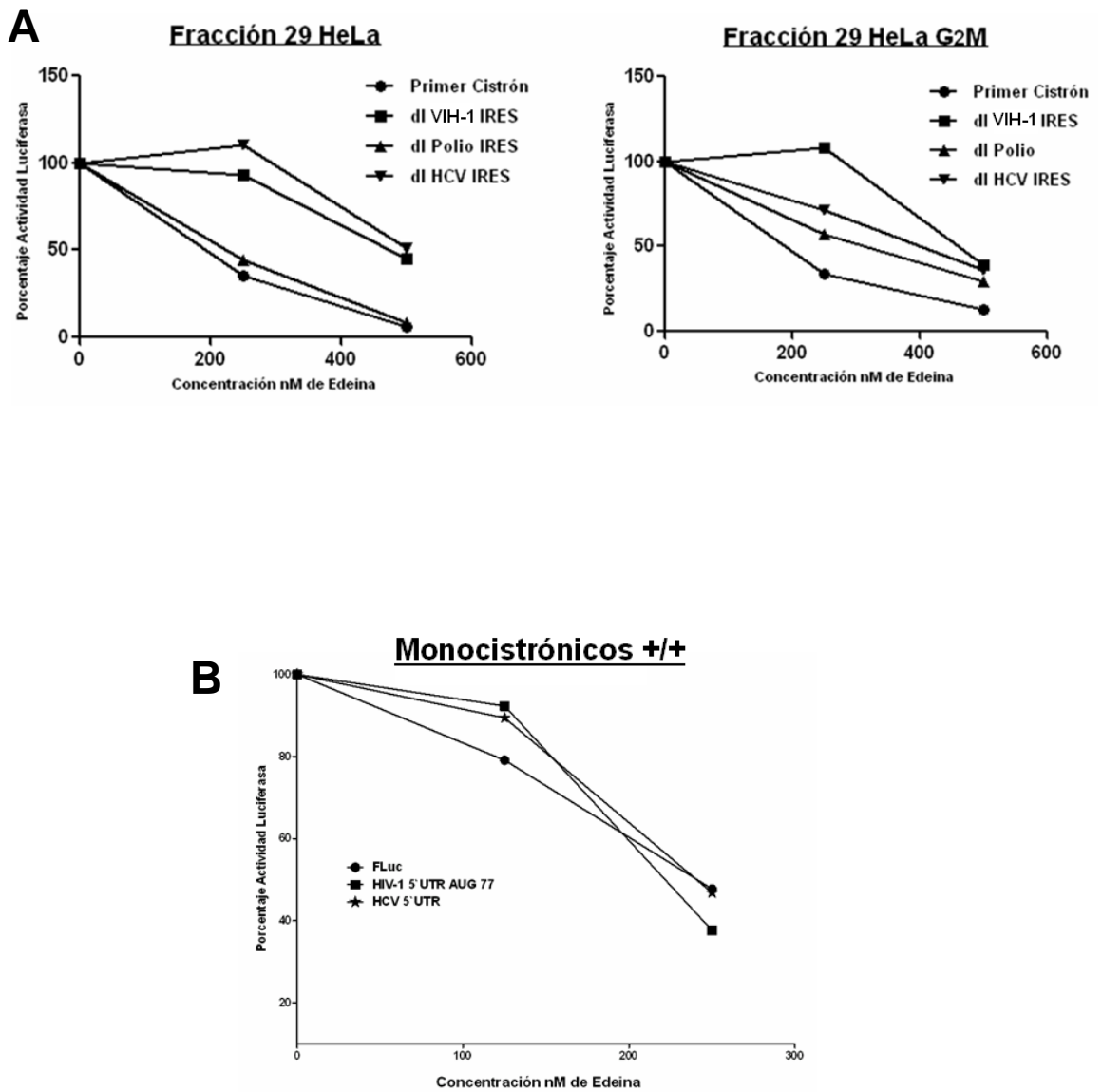


Figura 20: Determinación de la funcionalidad del IRES-1 de VIH-1 en presencia del antibiótico edeína. **A)** Actividad traduccional del cistrón dependiente de funcionalidad IRES en diferentes concentraciones de edeína, en construcciones bicistrónicas. **B)** Actividad traduccional de las construcciones monocistrónicas en presencia de diferentes concentraciones de edeína. *Cada medición corresponde a tres experimentos independientes realizados en triplicado.*

8. DISCUSIÓN.

La presencia de elementos IRES en la región 5'UTR de retrovirus parece ser una característica importante dentro de esta familia (41) y les otorga una ventaja importante en el proceso de replicación viral. Trabajos anteriores han propuesto que la presencia de estos sitios dentro de los mRNAs retrovirales sería una característica conservada en esta familia viral (11).

8.1 Funcionalidad del IRES en las construcciones generadas.

Debido a la carencia de consenso en secuencia o estructura necesarias para predecir la existencia de un IRES, la metodología estándar para la identificación de IRES es la utilización de RNAs bicistrónicos (42). Nuestro sistema consta de un RNA bicistrónico que codifica para las proteínas luciferasa de *Renilla* (RLuc) cuya traducción es dependiente de la estructura cap y para la luciferasa de *luciérnaga* (FLuc) cuya síntesis nos indica la funcionalidad del IRES de la región intercistrónica (Figura 9). Es así que los experimentos de traducción *in vitro* utilizando un RNA bicistrónico mostraron que la región 5'UTR de VIH-1 posee actividad IRES en el sistema experimental utilizado y que además las mutaciones introducidas para lograr diferenciar el inicio de la traducción cap-dependiente del IRES dependiente, no afectan la funcionalidad del IRES en la construcción generada (Figura 14).

Con el fin de determinar si la región 5'UTR del mensajero completo de VIH-1 posee la capacidad de iniciar la traducción de manera cap-dependiente e IRES dependiente fue necesario realizar traducciones de construcciones monocistrónicas, compuestas por la región 5'UTR de VIH-1 y FLuc (Figura 9). Estas construcciones fueron traducidas en sistemas *in vitro* que favorecían el inicio de la traducción cap-dependiente y en condiciones en que esta forma de inicio de la traducción esta inhibida. Para lograr esto se incubó previamente la mezcla de reacción con la proteasa L del virus de la fiebre aftosa para cortar el factor eIF4G (43) (Figura 15). De esta manera se logró traducir los mensajeros monocistrónicos flanqueados por el 5'UTR de VIH-1 y diferenciar el inicio de la traducción cap-dependiente del

inicio de la traducción IRES dependiente, ya que las construcciones poseían antes de la zona mínima de funcionalidad del IRES, codones de inicio en contexto óptimo y en desfase con el codón de inicio del gen reportero. Así, el inicio de la traducción cap-dependiente se manifiesta mediante la síntesis del péptido generado mediante la traducción del ORF introducido de manera artificial. Esta construcción nos permite atribuir la baja de la actividad del gen reportero inicio de la traducción cap-dependiente. De esta forma se pudo determinar mediante la ausencia de actividad del gen reportero el inicio de la traducción cap-dependiente y mediante la presencia de actividad del gen reportero se determinó el inicio de la traducción IRES dependiente. Puesto que la presencia de un codón de inicio fuera de marco con respecto al gen reportero, en la zona anterior a la región que presenta funcionalidad mínima de IRES, no permite la síntesis via cap-dependiente del gen reportero, ya que mediante el mecanismo de “*scanning*” se sintetiza un pequeño péptido y no la proteína reportera (Figuras 10 y 16).

Cabe mencionar que se utilizaron dos construcciones monocistrónicas para aislar la actividad cap- e IRES-dependiente (Figuras 9 y 13). Una de ellas poseía en la base N° 29 del 5' UTR de VIH-1 la Adenina del codón de inicio en contexto óptimo introducido, la otra construcción por su parte contenía la Adenina del codón de inicio en contexto óptimo en la base N° 77 del 5'UTR de VIH-1. Estas dos construcciones fueron sometidas a traducciones *in vitro* para lograr determinar el efecto del inicio de la traducción cap e IRES dependiente en el 5'UTR de VIH-1. La construcción denominada como AUG29 arrojó un resultado contradictorio respecto al resultado obtenido con la construcción AUG77, ya que la segunda construcción dio como resultado la disminución de la actividad del gen reportero, atribuible a la síntesis cap-dependiente del péptido generado por la introducción del codón de inicio en contexto óptimo introducido. Ensayos posteriores en condiciones inhibitorias de la actividad cap, demostraron que esta disminución era atribuible a la actividad cap y que el mutante AUG 77, traducía al reportero sólo mediante su actividad IRES. Por su parte la primera construcción mencionada anteriormente, al ser traducida *in vitro* demostró tener una actividad mayor incluso que el control, correspondiente al IRES-1 de VIH-1 sin mutaciones. Esto puede deberse a que esta

mutación fue introducida en la estructura de unión a la proteína viral Tat (Transactivator), una horquilla denominada TAR (transactivation response)(44). Se ha descrito que la proteína viral Tat es capaz de aumentar el inicio de la traducción cap-dependiente gracias a que desestabilizaría la horquilla TAR (49) y en ausencia de la proteína viral Tat lo que ocurriría es que se impide la traducción cap-dependiente debido a que la horquilla TAR evita el “*scanning*” por su estructura altamente estable. El hecho de introducir una mutación en esta estructura, eventualmente estaría desfavoreciendo la estabilidad de la horquilla TAR lo que permitiría el ingreso de los ribosomas mediados por la unión al cap de manera más fácil. En consecuencia lo que estaría pasando con esta construcción es que la mutación introducida permite la apertura de la horquilla facilitando así el ingreso de los ribosomas mediado por el cap, además la proximidad del codón de inicio introducido al extremo 5' del mRNA puede en alguna medida no permitir que sea reconocido por el ribosoma. Por lo que el inicio de la traducción de esta construcción correspondería a la suma de las funciones del IRES y el cap, la cual estaría aumentada gracias a la desestabilización del TAR.

8.2 Caracterización del IRES-1 de VIH-1.

Junto a los ensayos para determinar un modelo de iniciación dual de la traducción en el 5'UTR de VIH-1 se realizaron ensayos para caracterizar de mejor manera el IRES-1 de VIH-1.

Para lograr identificar la forma en que el IRES-1 de VIH-1 es capaz de actuar, se realizaron ensayos de traducción *in vitro* suplementados con extractos traduccionales de células HeLa no arrestadas y arrestadas en G2/M mediante el uso de nocodazol (Figura 17 y 18). Los extractos utilizados para identificar el o los posibles elementos ITAFs que estarían favoreciendo la función del IRES fueron fraccionados mediante el uso de cromatografía de exclusión, con lo cual se logró determinar que las fracciones correspondientes a la elución del minuto 29 son las que poseen los elementos proteicos necesarios para causar un aumento en la funcionalidad del IRES-1 de VIH-1 (Figuras 18 y 19). Con el fin de determinar específicamente cuales son los elementos involucrados en esta activación será

necesario realizar a futuro ensayos de unión a RNA de esta fracción o de complementación de cada uno de los elementos presentes en esta fracción.

Para lograr determinar de manera más fehaciente el mecanismo de acción del IRES-1 de VIH-1 se realizaron ensayos de traducción *in vitro* con la droga edeína. En procariontes esta droga es un inhibidor de la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, pero no impide la acción peptidil transferasa de éste (40). En eucariontes se ha descrito un modelo de acción en el cual la droga impide la acción del factor de inicio eIF4A (46). Este factor es el encargado de estabilizar la unión del Met-tRNA_i con la subunidad 40S (47), causando que el codón de inicio no sea reconocido y se acumulen subunidades ribosomales 40S en el 5' UTR (48). Debido a esta acción de la edeína, se puede utilizar para diferenciar el tipo de inicio de la traducción comandado por el IRES, puesto que si el IRES necesita de “*scanning*” para iniciar la traducción será sensible al efecto de la edeína, pero si el IRES no requiere de “*scanning*” y recluta la subunidad 40S directamente sobre el codón de inicio, el IRES será insensible a la presencia de la droga. Por lo tanto, en una construcción monocistrónica cuya región 5' UTR corresponde a un IRES capaz de posicionar al ribosoma directamente sobre el codón de inicio, la síntesis de proteínas no debiese verse afectada por el uso de edeína. En cambio, si el elemento IRES posiciona al ribosoma río arriba del codón de inicio, éste deberá realizar “*scanning*” para iniciar la traducción, mecanismo de inicio que se vería afectado al utilizar edeína. De este modo se utilizó la edeína en la traducción *in vitro* de los mensajeros monocistrónicos y bicistrónicos. Los resultados muestran que el comportamiento de este IRES es comparable con el del IRES de HCV (45), pues como se ve, la actividad del gen reportero no se ve afectada en concentraciones de edeína a las cuales una traducción mediada por “*scanning*” sí se encuentra inhibida (Figura 20). Cabe mencionar que la edeína a concentraciones elevadas es capaz de inhibir incluso el inicio de la traducción independiente de “*scanning*”, lo que explica la razón de la casi nula actividad en las construcciones utilizadas a concentraciones muy elevadas de droga. Como se puede ver en la Figura 20, las actividades de los genes reporteros dependen de la zona intercistrónica. Por esto la construcción que posee el IRES del virus del polio en la región intercistrónica, disminuye

notablemente su actividad, ya que este IRES requiere de “*scanning*” para iniciar la traducción. En cambio la disminución moderada de la actividad del gen reportero que posee los IRES de HCV y VIH-1 en su región intercistronica, se debe a que estos IRES resisten la acción de la edeína a concentraciones moderadas, el conjunto de estos resultados indica que estos IRES no requieren de “*scanning*” para comandar el inicio de la traducción, dado que son capaces de posicionar el ribosoma sobre el codón de inicio.

Un resultado similar se observa cuando las construcciones monocistrónicas son traducidas en presencia de edeína (Figura 20 B). Para estas construcciones se analizó el comportamiento del mutante AUG77, que como se mencionó anteriormente es este mutante el que da cuenta del inicio de la traducción solamente IRES dependiente. Al traducir este mutante en presencia de edeína se observa que sigue siendo resistente a la presencia de edeína en el medio de traducción *in vitro*. Estos resultados sugieren que la capacidad reclutadora de este IRES se encuentra río abajo del nucleótido N° 77.

De esta manera se ha logrado determinar el modo de acción que ejerce la región 5'UTR de VIH-1 para comandar el inicio de la traducción de los mensajeros virales, el cual corresponde a un mecanismo de inicio de la traducción dual, mediado por el cap y el IRES-1 de VIH-1 presente en esta zona.

9. CONCLUSIONES.

- La síntesis de proteínas dirigida por la región 5'UTR del mRNA completo de VIH-1 corresponde a un 60% de función cap-dependiente y un 40% de función IRES-dependiente.
- A lo menos un factor proteico presente en las fracciones de los extractos enriquecidos, permite el aumento de la funcionalidad del IRES durante la etapa G2/M del ciclo celular.
- El IRES-1 de VIH-1 es capaz de iniciar la traducción de manera independiente de "*scanning*", lo que indica su capacidad de reclutar el ribosoma directamente sobre el codón de inicio.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. John M. Coffin SHH, Harold E. Varmus. Retroviruses: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
2. Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. Virus Taxonomy. Elsevier Inc. 2005.
3. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*1998;67:1-25.
4. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW, Jr., Swanstrom R. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 2009 460(7256):711-6.
5. Wouters S, Decroly E, Vandenbranden M, Shober D, Fuchs R, Morel V, et al. Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett* 1999 456(1):97-102.
6. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998 280(5371):1884-8.
7. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998 93(5):681-4.
8. Tong-Starksen SE, Luciw PA, Peterlin BM. Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 84(19):6845-9.
9. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyo EM, Pavlakis GN. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990 64(6):2519-29.

10. Zapp ML. The ins and outs of RNA nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Genet Dev* 1995 5(2):229-33.
11. Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T. Translational control of retroviruses. *Nature reviews* 2007 5(2):128-40.
12. Cimarelli A, Darlix JL. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* 2002 59(7):1166-84.
13. Berkhout B. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996 54:1-34.
14. Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, et al. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 2003 77(7):3939-49.
15. Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 2001 15(16):2083-93.
16. Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr Biol* 1996 6(9):1096-103.
17. He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 1995 69(11):6705-11.
18. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews M. Translational control of gene expression. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
19. Banerjee AK. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* 1980 44(2):175-205.

20. Wickens M. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci* 1990 15(7):277-81.
21. Jackson RJ. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 2005 33(Pt 6):1231-41.
22. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 1999 68:913-63.
23. Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* 1990 10(3):1134-44.
24. Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs AB, McCarthy JE, et al. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 2003 115(6):739-50.
25. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, et al. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 98(13):7029-36.
26. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of molecular biology* 1987 196(4):947-50.
27. Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989 108(2):229-41.

28. Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 2005 38(2-3):121-46.
29. Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 1998 394(6696):854-9.
30. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988 334(6180):320-5.
31. Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol* 1988 62(8):2636-43.
32. Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 1991 353(6339):90-4.
33. Fernandez-Miragall O, Martinez-Salas E. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *Rna* 2003 9(11):1333-44.
34. Kieft JS. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in biochemical sciences* 2008 33(6):274-83.
35. Hellen CU, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 2001 15(13):1593-612.
36. Clemens MJ. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Progress in molecular and subcellular biology* 2001 27:57-89.

37. Sonenberg N, Dever TE. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current opinion in structural biology* 2003 (1):56-63.
38. Komar AA, Hatzoglou M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *The Journal of biological chemistry* 2005 280(25):23425-8.
39. Russell JSDW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 2001.
40. Szer W, Kurylo-Borowska Z. Effect of edeine on aminoacyl-tRNA binding to ribosomes and its relationship to ribosomal binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1970 224(2):477-86.
41. Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 2009 1789 (9-10):542-57.
42. Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO reports* 2001 (10):893-8.
43. Gradi A, Foeger N, Strong R, Svitkin YV, Sonenberg N, Skern T, et al. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site *in vitro*. *Journal of virology* 2004 78(7):3271-8.
44. Huthoff H, Berkhout B. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA (New York, NY)* 2001 (1):143-57.
45. Lancaster AM, Jan E, Sarnow P. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Rna* 2006 (5):894-902.

46. Thomas A, Goumans H, Voorma H O, and Beene R. The Mechanism of Action of Eukaryotic Initiation Factor 4C in Protein Synthesis. *Eur. J. Biochem* 1980 107, 39-45
47. Chaudhuri J, Si K, Maitra U. Function of Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A (eIF1A)(Formerly Called eIF-4C) in Initiation of Protein Synthesis. *The Journal of biological chemistry* 1997 272 (12): 7883-91
- 48.Kozak M. Shatkin AJ. Migration of 40 S Ribosomal Subunits on Messenger RNA in the Presence of Edeine. *The Journal of biological chemistry* 1978 253 (18): 6568-77
- 49.Sengupta D N, Berkhout B, Gagnol A, Zhou A, Silverman R A. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of Human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(19):7492-6