

ARN genómico de VIH: rutas alternativas para terapias alternativas

Camila Pereira-Montecinos, Nora Peñailillo-Cabrera, Fernando Valiente-Echeverría, Ricardo Soto-Rifo

¹Laboratorio de Virología Molecular y Celular, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* de la familia de los *Retrovirus* y es el agente etiológico de una de las pandemias más devastadoras de la actualidad: el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Según el último reporte del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) actualmente viven 36,9 millones de personas infectadas en el mundo, con dos millones de nuevos infectados al año y cerca de 40 millones de muertes asociadas al SIDA desde 1981. A pesar de la disponibilidad de los tratamientos antirretrovirales, aún no es posible erradicar el virus del organismo y en consecuencia el SIDA es considerado una enfermedad crónica no curable que requiere tratamiento de por vida.

Existen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. Aunque ambos infectan principalmente linfocitos-T, células dendríticas y macrófagos, el VIH-1 es el responsable de la pandemia. La partícula viral consta de una membrana lipídica, una matriz y la cápside con dos copias idénticas de ARN genómico (ARNg) que codifican para las proteínas estructurales (Gag y Env), enzimas (Pol), y proteínas reguladoras y accesorias (Tat, Rev, Vpu/Vpx, Vif, Nef, Vpr). Cabe destacar que dentro de la partícula viral también se encuentran las enzimas virales proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN), necesarias en etapas tempranas del ciclo replicativo y por ende principales blancos para las terapias actuales (Figura 1). Como se esquematiza en la Figura 1, el ciclo replicativo del VIH comienza con el reconocimiento del receptor CD4 y uno de los co-receptores de quimioquinas CCR5 o CXCR4 en la célula blanco, para dar paso >>>

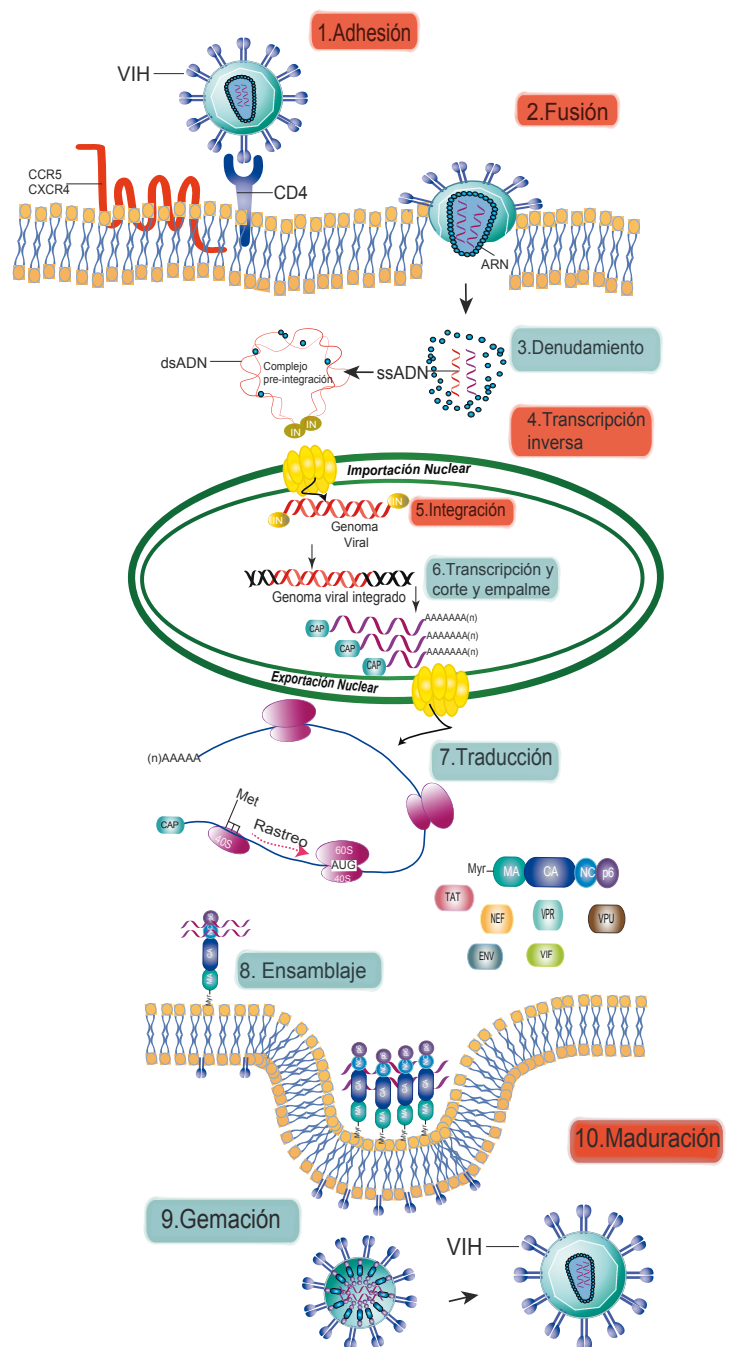


Figura 1

Ciclo replicativo del VIH

Representación esquemática del ciclo replicativo del VIH indicando sus etapas principales. Los cuadros en rojo indican las etapas del ciclo que son utilizadas actualmente como blanco terapéutico por las drogas aprobadas por la FDA. Es posible apreciar que aún no existen drogas que actúen sobre las diferentes funciones que cumple el ARNg.

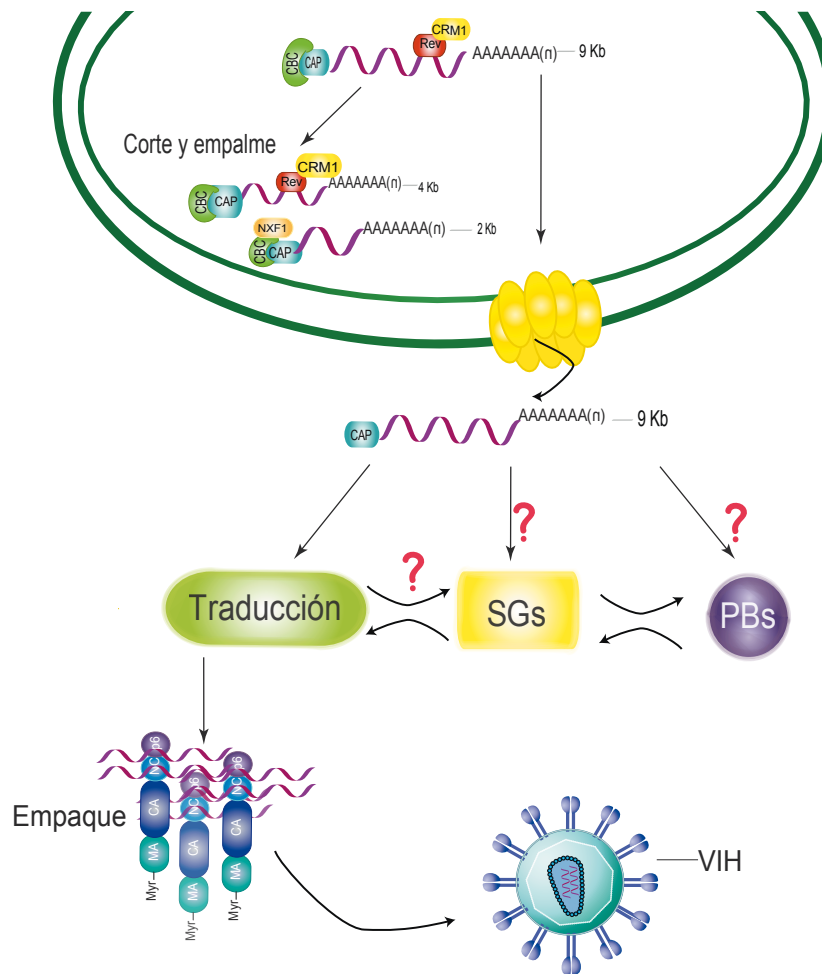


Figura 2

Destino del ARNg de VIH.

Una vez transcrito, el ARNg de 9-kb puede sufrir corte y empalme alternativo para generar los transcritos de 2-kb y 4-kb. Los transcritos de 2-kb se asocian al factor de exportación de ARNm celulares NXF1 y son exportados del núcleo por la vía canónica. Los ARNm de 4-kb y el ARNg son exportados por una vía alternativa regulada por la proteína viral Rev en asociación con el factor de exportación celular CRM1. En el citoplasma, el ARNg es traducido para generar la proteína estructural mayor, Gag y las enzimas Gag-Pol para ser posteriormente utilizado como el genoma viral que será empaquetado en las nuevas partículas virales. Durante la traducción, el ARNg podría encontrarse en equilibrio con diferentes RNPs como los SG o los PBs los cuales podrían jugar un rol fundamental en el equilibrio traducción-empaquetamiento.

>>> a una fusión de ambas membranas permitiendo el ingreso de la cápside viral al citoplasma. Posterior al denudamiento de la cápside, el genoma viral es convertido en ADN de doble hebra por la enzima viral RT para ser importado al núcleo e integrado en el genoma de la célula blanco dando origen a lo que llamamos “provirus”. El provirus puede permanecer latente o continuar el ciclo replicativo bajo una expresión génica eficiente¹. La transcripción del provirus resulta en la expresión de más de 40 transcritos a partir del corte y empalme alternativo de un transcrito único, el ARN mensajero (ARNm) completo de 9-Kb (idéntico al ARNg), generando los ARNm de 4-kb (con procesamiento parcial) y ARNm de 2-kb (con procesamiento completo). El ARNm completo de 9-kb es sintetizado por la ARN polimerasa II celular por lo que posee una estructura m⁷-metil-guanosina (cap) en su extremo 5’ y una cola de poliadenosinas en su extremo 3’. Además de servir como pre-ARNm, el

ARNm de 9-kb, sin procesar, posee una función dual en el ciclo replicativo, ya que es utilizado como ARNm para la síntesis de las proteínas Gag, y Gag-Pol y como genoma incorporado en las nuevas partículas virales². Estas características hacen que los procesos asociados a la regulación postranscripcional de este ARNm viral sean blancos atractivos para el desarrollo de nuevas terapias. Por estas razones, ahondaremos en los mecanismos que regulan al ARNg a nivel postranscripcional.

PROCESAMIENTO DEL ARNg Y EXPORTACIÓN NUCLEAR

La presencia de múltiples sitios dadores y aceptores de corte y empalme en el ARNg, permite el procesamiento alternativo que lleva a la generación de tres subpoblaciones de transcritos virales. Los transcritos de 2-kb, codifican para las proteínas Tat, Rev y Nef mientras que el de 4-kb, codifican para las proteínas Env, Vpu, Vpr y Vif². Los

diversos transcritos virales son exportados del núcleo al citoplasma, mediante la formación de complejos ribonucleoproteicos (RNPs) específicos. La mayoría de los ARNm celulares sufren una remoción completa de los intrones, al igual que los transcritos virales de 2-kb, y en consecuencia son exportados al citoplasma a través del factor de exportación nuclear NXF1/Tap³ (*Figura 2*). Los transcritos virales que contienen intrones no pueden ser exportados por la vía dependiente de NXF1 y son retenidos y degradados en el núcleo⁴. Sin embargo, la proteína viral Rev reconoce los ARNm de 9kb y de 4 kb a través del Elemento de Respuesta a Rev (RRE)^{3,5}

ESTUDIOS recientes del ensamble de cápsides inmaduras, han demostrado que los intermediarios formados durante el proceso contienen Gag junto a proteínas relacionadas con PB, incluyendo a AGO2 y DDX6, las cuales se cree catalizan el ensamble de la cápside. Por otra parte se ha observado que Mov10 interactúa específicamente con el ARN de VIH-1.

y por medio de una señal de exportación nuclear (NES) se asocia al factor de exportación nuclear CRM1 permitiendo la salida del complejo Rev-RRE (*Figura 2*).

TRADUCCIÓN

Una vez en el citoplasma, los transcritos virales deben reclutar la maquinaria de traducción de la célula. En eucariontes, el reclutamiento de los ribosomas ocurre por dos mecanismos principales los cuales dependen o no del reconocimiento de la estructura cap. Se ha observado que el ARN genómico de VIH-1 utiliza ambos mecanismos mediante la formación de distintos tipos de RNPs que reclutaran al ribosoma⁶.

Durante el inicio de la traducción cap-dependiente, la holoenzima eIF4F se une al cap y desenrolla las estructuras locales del ARNm, en conjunto con eIF4B/eIF4H⁶. El complejo eIF4F está compuesto por la proteína de unión al cap, eIF4E la proteína de andamiaje eIF4G y eIF4A. Una vez sobre el cap, eIF4F permite que se forme el complejo de iniciación 48S gracias a la interacción entre eIF4G y eIF3, el cual está asociado a la subunidad ribosomal 40S (*Figura 2*). En este punto comienza el rastreo en dirección 5' a 3' desde el cap hasta encontrar el codón de inicio, comúnmente el codón AUG. Recientemente se demostró que efectivamente ocurre un rastreo en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1 pese al alto grado de estructuración⁶. Sin embargo, en este proceso intervienen factores adicionales como las helicasas de ARN DDX3 y RHA, las cuales favorecen tanto el reconocimiento del cap como el rastreo.

El inicio de la traducción cap-independiente se ha observado principalmente en ARNm virales que carecen

de una estructura cap, pero que poseen una secuencia específica denominada Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES), presente generalmente en la 5'-UTR y cuya función es facilitar el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S⁶. El mecanismo preciso no está completamente entendido ya que los IRES carecen de una secuencia consenso conservada. La presencia de elementos IRES permite la traducción de ARNs bajo condiciones desfavorables, donde la traducción cap-dependiente se ve comprometida⁷. Se ha reportado que la síntesis de las proteínas del virus es altamente dependiente del cap en las primeras 24-48 horas de la replicación viral, mientras que a tiempos tardíos la traducción dependiente de IRES es necesaria para asegurar la producción de partículas virales⁶. Un aspecto interesante de este mecanismo tiene relación con su activación durante la fase G2/M del ciclo celular, el cual es inducido por la proteína viral Vpr.

GRÁNULOS DE ESTRÉS Y CUERPOS DE PROCESAMIENTO

Aquellas células expuestas a diversos tipos de estrés, como una infección viral, desencadenan la rápida detención de la traducción generando el desensamble de polisomas⁸. Estos eventos gatillan un triaje molecular, donde las células deben tomar la decisión sobre el destino del ARNm que es liberado de los polisomas: silenciamiento o degradación⁹. Estos eventos han llevado a la célula a generar diferentes clases de RNPs; entre ellos, los gránulos de estrés (SG) y los cuerpos de procesamiento (PB) que contribuyen al ciclo de vida y regulación del ARNm.

Los SG son RNPs, formados en el citoplasma como respuesta a varios tipos de estrés celulares. La composición de proteínas y ARN de los gránulos es dinámica y se encuentra en equilibrio con los polisomas. Dentro del contenido de los SG se encuentran ARNm heterogéneos, factores de inicio de la traducción, la subunidad ribosomal 40S y otras proteínas de unión a ARN incluyendo TIA-1, TIAR, G3BP, Staufen1, entre otras⁸. Se ha determinado que el ensamble inicial de SG requiere la agregación de factores dependientes de gránulos de estrés (SGDFs), incluyendo G3BP1 y TIA-1/TIAR. Pese a esta rápida respuesta celular a condiciones de estrés, estudios muestran que VIH-1 interfiere con el ensamble de SG a través de una interacción de la proteína viral Gag con dos SGDFs: el factor de elongación de la traducción eEF2 y G3BP1¹⁰ (*Figura 2*).

A diferencia de los SG, los PBs son estructuras citoplasmáticas constitutivas, que se encuentran enriquecidas en proteínas implicadas en el catabolismo del ARNm (deadenilación, hidrólisis del cap y degradación del ARNm) y represión de la traducción incluyendo Argonauta, DDX6, Mov10, APOBEC3G (A3G), Dcp1a/Dcp2 y Xrn1¹¹. Estudios recientes del >>>

ensamble de cápsides inmaduras, han demostrado que los intermediarios formados durante el proceso contienen Gag junto a proteínas relacionadas con PB, incluyendo a AGO2 y DDX6, las cuales se cree catalizan el ensamble de la cápside¹². Por otra parte se ha observado que Mov10 interactúa específicamente con el ARN de VIH-1 y su incorporación en la partícula es tan eficiente como la de A3G. Estudios demuestran que la sobreexpresión de Mov10 puede potencialmente inhibir la replicación de VIH-1 en múltiples etapas, que incluyen la producción del virus, el procesamiento proteolítico de Gag y la transcripción inversa. En otros trabajos se ha señalado que reducciones de niveles de Mov10 endógeno pueden afectar la infectividad lo que sugiere que niveles adecuados de esta proteína celular son necesarios para llevar a cabo la replicación viral.

CONCLUSIONES

El ARNg es esencial para la replicación del VIH por lo que su destino en el núcleo y citoplasma de la célula está altamente regulado por proteínas virales y celulares. Así, este ARN viral se encuentra asociado a múltiples complejos ribonucleoproteicos que le permiten i) ser procesado mediante corte y empalme alternativo; ii) ser exportado a través de la vía alternativa Rev/CRM1, iii) ser traducido eficientemente por mecanismos dependientes e independientes del cap y iv) ser empaquetado por la proteína viral Gag para formar nuevos viriones (Figura 2). Es indispensable entender en profundidad los mecanismos que regulan las diferentes funciones del ARNg y que lo llevan a ensamblarse en diferentes complejos ribonucleoproteicos en asociación a proteínas virales como Rev y celulares como las helicasas de ARN DDX3, RHA, DDX6 o Mov10. Es relevante también comprender como el ensamble de complejos macromoleculares como los SGs y PBs y la interacción del virus con diferentes de sus componentes regulan diferentes etapas del ciclo replicativo viral, como la transición traducción-empaque. Estos conocimientos

nos permitirán identificar nuevos blancos terapéuticos que permitirán bloquear la expresión génica viral y/o el ensamblaje de nuevas partículas virales.

BIBLIOGRAFÍA

- Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 10, 279–90 (2012).
- Purcell, D. F. & Martin, M. a. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 67, 6365–6378 (1993).
- Cullen, B. R. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* 28, 419–424 (2003).
- Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T & Pavlakis GN. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1495–1499 (1989).
- Cochrane, A. W., Chen, C. H. & Rosen, C. A. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1198–202 (1990).
- Rojas-Araya, B., Ohlmann, T. & Soto-Rifo, R. Translational Control of the HIV Unspliced Genomic RNA. *Viruses* 7, 4326–4351 (2015).
- Spriggs, K. a, Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A. E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100, 27–38 (2008).
- María Gabriela Thomas, Mariela Loschi, M. A. D. and G. L. B. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23, 324–334 (2011).
- Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 33, 141–50 (2008).
- Valiente-Echeverría, F. et al. eEF2 and Ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP1) modulate stress granule assembly during HIV-1 infection. *Nat Commun* 5, 4819 (2014).
- Jain, S. & Parker, R. *The Discovery and Analysis of P Bodies. Ten Years of Progress in GW/P Body Research SE - 12* 768, (2013).
- Reed, J. C. et al. HIV-1 Gag co-opts a cellular complex containing DDX6, a helicase that facilitates capsid assembly. *J Cell Biol* 198, 439–456 (2012). ■