



Doctorado en Ciencias m/ Microbiología UCH/USACH

Título: **Caracterización de la traducción IRES-dependiente del mRNA de *Denguevirus*; rol de la proteína PTB como ITAF.**

**DOCUMENTO DE TESIS**

Autor: **Leandro Fernández García**

Tutor: **Prof. Marcelo López Lastra**

**Leandro Fernández García**

**Prof. Marcelo López Lastra**

# **Caracterización de la traducción IRES-dependiente del mRNA de *Denguevirus*; rol de la proteína PTB como ITAF.**

**Leandro Fernández García**

**Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Dr. Marcelo Andrés López-Lastra de la Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, de la Pontificia Universidad Católica de Chile y aprobado por la comisión de seguimiento.**

---

Dr. Marcelo López Lastra

---

Dr. Eugenio Spencer Ossa

---

Dr. Ricardo Soto Rifo

---

Dr. Fernando Valiente Echeverria

## **Agradecimientos**

**"El sol quema con la misma luz con que alumbra. El sol tiene manchas. Los agradecidos ven la luz. Los desagradecidos ven las manchas". (José Martí, Cuba, 1853-1895)**

Primero que todo, quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Marcelo López Lastra por la guía en este proceso, por dejarme ser, por todas las enseñanzas que no solo han sido útiles en la ciencia, algunas también me las llevo para la vida.

A mi madre por ser única, por perdonarme cuando no estuve presente y era necesario, por su apoyo incondicional en este en todos los sueños de mi vida. A mi padre por respetar mis decisiones, por exigirme siempre y dar lo mejor que tiene para mí. A mis abuelos y hermanos por estar en la distancia, por comprender la ausencia.

A mis amigos Alberto y Gaby, amigos de Cuba, de la juventud, amigos de Chile, amigos de siempre. Muchas gracias por ser mi familia, por escucharme, por darme aliento, por todo el apoyo material y espiritual. A Roger Marcano por el tiempo que estuvo, por lo que fue mientras duró, por comprender y apoyarme, por estar presente todas las veces que fue necesario.

Jorge y Jenny, para mi ustedes también fueron tutores, les agradezco muchísimo todo el tiempo y la formación, los concejos, los cafés, las muchas horas de terraza, también los carretes y los buenos momentos fuera del laboratorio. También a Karla Pino, a Karlita, por escuchar, por ser oportuna, por dar concejos y apoyo. A Aldo y Hade por ser compañeros de laboratorio, de tesis y de fiestas, por todos los momentos compartidos.

A la Dra. Tania Herrera Martínez, por motivarme a elegir Chile como destino para mi formación doctoral, por ser amiga incondicional.

Leandro Fernández García (Santiago, Chile, agosto 2020)

## Índice

• Resumen.....	1
• Introducción	
i) Dengue y Dengue hemorrágico.....	2
ii) Dengue en Chile.....	3
iii) Importancia del estudio de Denguevirus. Antivirales y vacunas.....	4
iv) <i>Denguevirus</i> .....	5
v) Inicio de la traducción del mRNA de <i>Denguevirus</i> .....	8
vi) Estudio de los IRES.....	14
vii) Proteína de unión al tracto de Polipirimidinas (PTB) y <i>Denguevirus</i> .....	15
• Problema.....	17
• Hipótesis.....	17
• Objetivos.....	17
• Materiales y Métodos	
i) Plásmidos.....	18
ii) Cultivo celular e infecciones.....	18
iii) Transcripción <i>in vitro</i> .....	19
iv) Traducción <i>in vitro</i> .....	20
v) Transfección de DNA.....	21
vi) Transfección de RNA y siRNA.....	21
vii) Ensayo con el Virus Reportero Dengue 2 y PTBs.....	22
viii) Actividad Luciferasa.....	23
ix) Extracción de RNA y RT-qPCR.....	23

x) Actividad citotóxica.....	24
xi) Microscopía de fluorescencia.....	24
xii) Western blots.....	25
xiii) Secuencias y análisis estadístico.....	26
• Resultados	
i) La región 5´UTR del mRNA de DENV permite la traducción Cap- independiente en un sistema <i>in vitro</i> .....	27
ii) La región 5´UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES <i>in vitro</i> .....	29
iii) El DENV IRES es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa L de FMDV.....	33
iv) La actividad IRES de DENV es sensible a Edeína.....	37
v) El mRNA de DENV posee actividad cap-independiente marginal en células BHK 21 y Vero E6.....	39
vi) La región 5´UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES marginal en células de mamíferos.....	41
vii) Los mRNA bicistrónicos de DENV generados a partir de la transfección de plásmidos presentan actividad IRES.....	45
viii) La actividad FLuc mediada por la región 5´UTR del mRNA de DENV no se explica por la presencia de un promotor críptico o por la generación de variantes de splicing.....	47
ix) La traducción IRES dependiente del mRNA de DENV 2 es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa 2A de Rhinovirus en células.....	50
x) La infección por DENV 2 New Guinea C produce cambios en la localización celular de PTB.....	54

xi) Las isoformas de PTB tienen un impacto en la traducción del mRNA de un reportero de <i>Denguevirus</i> .....	55
xii) Las isoformas de PTB impactan la traducción de un mRNA <i>viral like</i> de forma diferencial.....	58
xiii) Estudio del efecto de las isoformas de PTB sobre la actividad del DENV IRES.....	61
xiv) PTB se localiza en el citoplasma cuando es sobre expresada en células BHK21.....	62
xv) La sobreexpresión o silenciamiento de PTB no afecta la viabilidad celular en células BHK21.....	64
xvi) El silenciamiento de PTB endógeno impacta sobre la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV en BHK 21.....	65
xvii) Las isoformas de PTB son ITAF del IRES de DENV en BHK 21.....	66
xviii) La estimulación de la traducción IRES-dependiente producida por PTB requiere diferentes motivos de unión a RNA en cada isoforma.....	68
• Discusión.....	71
• Conclusiones.....	77
• Referencias bibliográficas.....	78

## RESUMEN

*Denguevirus* (DENV) es un virus envuelto, con genoma de RNA, simple hebra y polaridad positiva, que pertenece a la familia *Flaviviridae*. El mRNA viral tiene una estructura 5' m7GpppN (cap), un sitio interno de reclutamiento de ribosomas (IRES), y carece de una cola de poly (A). El mRNA de DENV puede por tanto iniciar su traducción siguiendo un mecanismo cap-dependiente, o bien, mediante IRES, DENV-IRES. La traducción del mRNA de DENV requiere de la participación de proteínas celulares de unión al RNA (RBP). La proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB), es una proteína ubicua, de localización principalmente nuclear, que ha sido descrita como un factor que participa en el ciclo replicativo de DENV. PTB participa en la iniciación de la traducción de diversos mRNAs virales. Sin embargo, su potencial rol en la traducción mediada por el DENV IRES es desconocida. Basado en los anterior, en este trabajo de investigación se propuso caracterizar el mecanismo de iniciación de la traducción dependiente del DENV IRES, determinando el posible rol de la proteína PTB como un factor trans-activador de IRES (ITAF). Mediante el uso de vectores mono- y bicistrónicos se establece que el DENV IRES es funcional *in vitro* y en células, además que depende del tipo celular. Se muestra que la localización de PTB endógena en células infectadas es citoplasmática, mientras que en las no infectadas es principalmente nuclear. En acuerdo con un posible rol citoplasmático se estableció que el silenciamiento de PTB endógeno impacta de manera negativa sobre la actividad del DENV IRES. Se evaluó el rol de las tres isoformas de PTB: PTB1, PTB2 y PTB4 sobre la traducción mediada por el DENV IRES, estableciéndose que todas las isoformas de PTB estimulan al DENV IRES siendo PTB1 la proteína con mayor impacto, seguido de PTB2 y PTB4. En conclusión, en este estudio, se caracteriza el DENV IRES y se establece que PTB actúa como ITAF de éste IRES.

## Introducción

### Dengue y Dengue hemorrágico

El Dengue es una enfermedad infecciosa transmitida por artrópodos, principalmente de la especie *Aedes aegypti* y *A. albopictus*, cuyo agente etiológico es el virus del dengue, miembro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Dentro de la especie *Denguevirus* se han descrito 4 serotipos virales (DENV1-4), los cuales son agentes causales de Dengue. En todo el mundo, se estima que 2.500 millones de personas viven en áreas endémicas o de alto riesgo, aproximadamente 975 millones de estos viven en zonas urbanas (tropicales y países subtropicales) en el sudeste asiático, el Pacífico y las Américas (Figura I). También ha sido documentada la transmisión de Dengue en África y el Mediterráneo Oriental (Figura I) (1). Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por *Denguevirus* cada año, de los cuales 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (2).



**Figura I. Países y zonas geográficas con Dengue o riesgo de transmisión de Dengue.**

Las líneas rojas delimitan los límites geográficos de los hemisferios norte y sur con



*Dengue o con alto riesgo de transmisión de Dengue (presencia del vector Aedes aegypti).*

*Modificado de (3).*

Según la organización mundial de salud (OMS), la clasificación revisada y aceptada para la enfermedad del Dengue, lo clasifica en: Dengue sin síntomas de alarma, Dengue con síntomas de alarma y Dengue grave(4). La enfermedad se manifiesta de forma sistémica y progresiva, incluyendo síntomas graves y no graves. La fase aguda se caracteriza por fiebre entre los 37,5-40°C, eritema, petequias, dolor corporal, mialgias y dolores de cabeza. Los casos más graves incluyen hemorragias en formas de sangrados de mucosas y gastrointestinales. Además, se presenta un aumento en el tamaño del hígado y disminución en el conteo de plaquetas totales. La pérdida de fluidos o la perfusión de órganos como los de la cavidad respiratoria y del corazón, producen un choque multiorgánico y la muerte (3,5,6).

### **Dengue en Chile**

Durante el siglo XX, el mosquito *A. aegypti* se distribuyó en Chile desde la frontera norte hasta la Región de Atacama. El Dengue, apareció en las provincias de Antofagasta, Tarapacá y Arica, propagándose extensamente. Desapareció en la década de 1940 cuando comenzó a erradicarse el vector. Sin embargo, a fines de 2000 se identificó la presencia del mosquito en Rapa Nui (7). Chile continental y Uruguay permanecen como los únicos países de la región donde hasta ahora no se ha registrado circulación de este virus. Por tanto, en Chile, desde 1999 es una enfermedad de vigilancia universal e inmediata (Decreto Supremo N° 158)(8). En el 2002 se produce un brote en la Isla de Pascua por el serotipo 1 de este virus (DENV1)(9). Posteriormente, en el año 2009 se detecta la presencia del serotipo 4 (DENV4) también en la Isla de Pascua (10). En el 2019

se detectaron larvas de *A. aegypti* en Iquique, sin embargo ningún caso de Dengue autóctono ha sido notificado a la fecha (11).

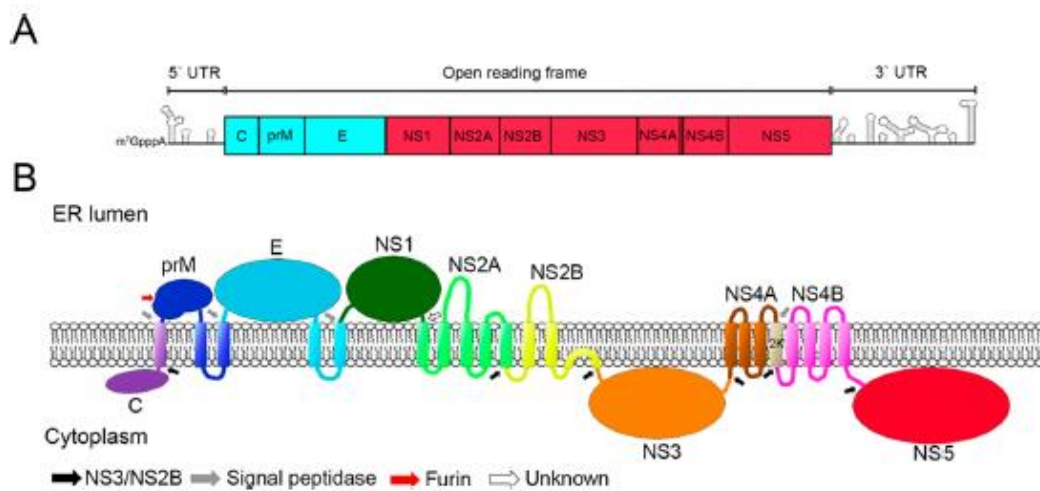
### **Importancia del estudio de *Denguevirus*. Antivirales y vacunas.**

A pesar del impacto global del Dengue y la severidad de los cuadros clínicos de esta enfermedad, en la actualidad no existe ningún fármaco antiviral para su tratamiento específico y efectivo. Por lo anterior, la Organización Mundial de la Salud ha motivado a la búsqueda de candidatos antivirales que tengan como blanco procesos celulares específicos en la interacción virus-hospedero (3). Teniendo en cuenta que el principal obstáculo para el desarrollo de una vacuna exitosa para Dengue, es la diferencia en la respuesta de anticuerpos para cada serotipo (1). Ha sido documentada que la infección secundaria por un serotipo diferente al de la infección primaria (infección heterotípica), conlleva a un aumento de la probabilidad de muerte. Esto se debe a la Amplificación dependiente de anticuerpos (ADE, del inglés *antibody-dependent enhancement*), dado que los anticuerpos producidos frente a un serotipo no neutralizan la infecciones heterotípicas, incluso potencian la entrada del virus a los macrófagos y con esto su diseminación(12). Históricamente, la ADE ha dificultado el desarrollo el desarrollo de vacunas profilácticas para el Dengue (12). En la actualidad, solo una vacuna (Dengvaxia, SanofiPasteur) ha sido licenciada y aceptada para su uso en algunos países. Esta vacuna tiene baja eficacia y su uso ha sido muy controversial (13). En Filipinas los niños menores de 9 años vacunados y que no presentaban inmunidad previa sufrieron mayores números de hospitalizaciones y muertes respecto a los no vacunados. Es por esto que la OMS realizó nuevas recomendaciones y restricciones para el uso de Dengvaxia (13). En resumen, en la actualidad no existen alternativas seguras y eficientes para el

tratamiento y la prevención del Dengue. El estudio del ciclo replicativo viral y la interacción virus-hospedero son aproximaciones que contribuyen al desarrollo de futuras alternativas para el control y prevención de esta enfermedad.

### **Denguevirus**

*Denguevirus* (DENV), es un virus envuelto de 40-60 nm de diámetro que presenta un genoma de RNA de simple hebra y polaridad positiva de aproximadamente 10,7 Kb (14) (Figura II). DENV es transmitido a los humanos y primates no-humano a través de mosquitos del género *Aedes* spp, su vector. DENV infecta y replica principalmente en células de linaje hematopoyético como son células dendríticas (DC), macrófagos, Linfocitos T y B (15).

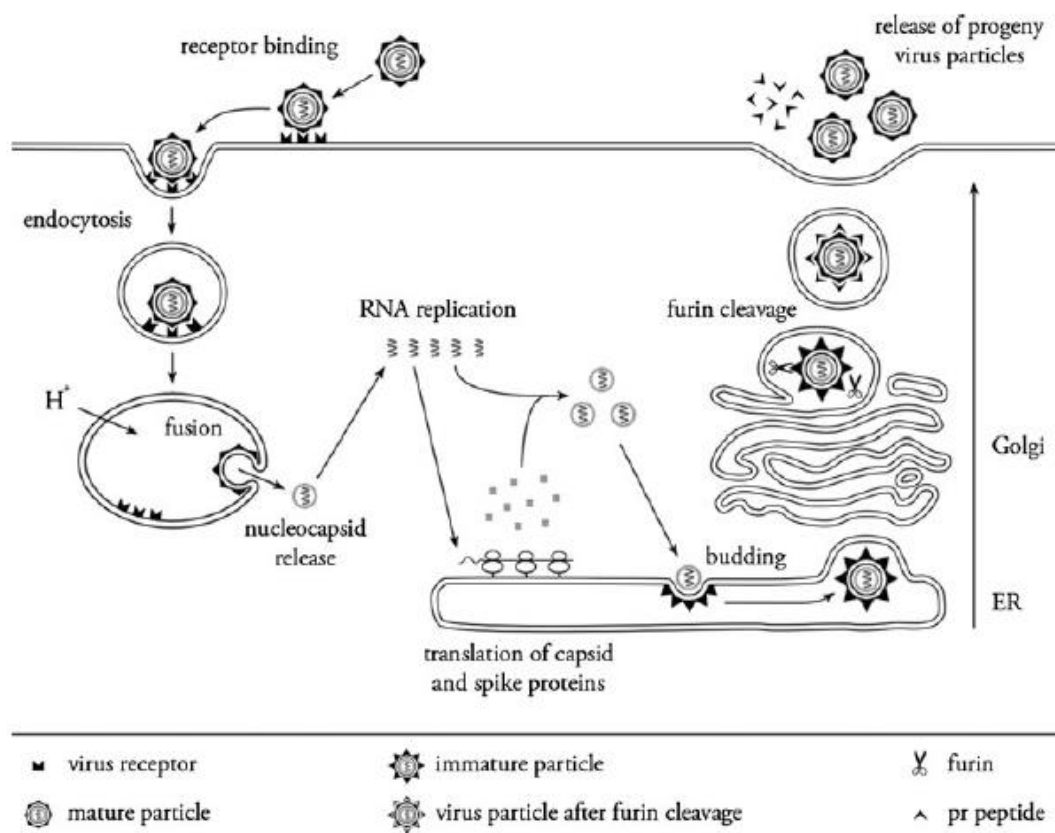


**Figura II. Genoma y poliproteína viral.** (A) Genoma. Los flavivirus tienen un genoma de ARN simple cadena y polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. La región 5' presenta una estructura cap tipo 1, mientras que el extremo 3' no es poliadenilado. El marco abierto de lectura (ORF) codifica tres proteínas estructurales (azul) y siete no estructurales (rojo). Los UTRs, 5' y 3' son altamente estructurados y conservados, con varias horquillas, que son importantes para la traducción, síntesis de ARN y formación

*de sfRNA. (B) Poliproteína viral. La poliproteína de los Flavivirus está integrada en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER). Las proteínas virales prM, E y NS1 son principalmente en el lado luminal, mientras las proteínas C, NS3 y NS5 en el lado citoplasmático. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B presentan varios dominios transmembranas. El procesamiento de la poliproteína ocurre de manera co- y post-traducciona l en múltiples sitios. La proteólisis en el lado citoplasmático es realizada por la proteasa viral NS3 y su cofactor NS2B, mientras que en el lado de la luz del RER se realiza mediante el complejo de peptidasas señal. La poliproteína también tiene un sitio de corte furin proteasa en la región prM que da lugar a la proteína M. Entre NS1 y NS2A existe un sitio de corte que es reconocido por una enzima desconocida. Modificado de (16).*

El ciclo replicativo viral comienza con el reconocimiento del receptor celular (17)(18) (Figura III). Entre receptores putativos se han identificado glicosaminoglicanos, DC-SIGN, CLEC5, TIM-1, HSP-90, HSP-70 y GRP-78 (19). DENV ingresa a la célula mediante un proceso de endocitosis. La acidificación del endosoma induce la fusión de membranas y la liberación del RNA genómico (gRNA) al citoplasma celular (20). El gRNA asociado al retículo endoplasmático rugoso es directamente utilizado como mRNA para la síntesis de proteínas virales (21). El mRNA viral presenta en su extremo 5', una estructura cap (m7GpppN), una región 5' no traducida (UTR), que posee un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES) (22), seguido del marco de lectura abierto (ORF) que codifica para la poliproteína viral y una región 3'UTR. A diferencia de los mRNA celulares, el mRNA de DENV carece de cola PolyA (14). El producto de la traducción del mRNA viral es una poliproteína, que mediante procesamientos co- y post-traduccionales, da origen a 3 proteínas estructurales (Cápside, Envoltura, Membrana) y 7 no estructurales (NS1,

NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (23) (Figura II). Una vez que la RNA polimerasa, RNA dependiente (RNAP<sub>RNA</sub>d) (NS5) es generada, se inicia la replicación del gRNA asociada a compartimientos membranosos, para el posterior ensamblaje de la partícula viral, proceso que ocurre asociado al RER (21). Finalmente, las partículas virales maduran durante el tránsito por el complejo de Golgi, para la posterior liberación de los viriones al medio extracelular (24) (Figura III).



**Figura III. Ciclo replicativo viral.** Los viriones se unen a la superficie de la célula hospedera para el posterior ingreso por endocitosis mediada por receptores. La acidificación de la vesícula endosómica desencadena cambios conformacionales en el virión, dando lugar a la fusión de la envoltura de la partícula viral con la membrana del endosoma. El genoma viral una vez liberado en el citoplasma es traducido y procesado co y postraduccionalmente por proteasas virales y celulares. La replicación del genoma

*ocurre en las membranas del RER. Estas partículas "inmaduras" no son infecciosas y se transportan a través de la red trans-Golgi (TGN). La maduración ocurre por el procesamiento mediado por las furin proteasas, dando lugar a partículas maduras e infecciosas. Los viriones maduros se liberan posteriormente por exocitosis. Modificado de (20)*

### **Inicio de la traducción del mRNA de *Denguevirus***

La síntesis de proteínas para DENV se asocia con el tropismo viral (25). La productividad de infección por diferentes variantes naturales de DENV2 en células humanas mostró estar correlacionada con la eficiencia de traducción del mRNA viral, determinada por variaciones en los UTRs (25).

El inicio de la traducción del mRNA de DENV ocurre principalmente de forma cap-dependiente y es compartimentalizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER)(26) (27).

El inicio de la traducción es un proceso secuencial, el cual tiene por finalidad posicionar al RNA de transferencia iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>) en el sitio peptidil (P) del ribosoma (80S).

El inicio de la traducción cap-dependiente comienza con el reconocimiento de la estructura 5' cap del mRNA por el complejo de iniciación de la traducción el cual posiciona a la subunidad ribosomal 40S en proximidad del extremo 5' del mRNA. Esto requiere de la formación de un complejo de pre-iniciación 43S (PIC), compuesto por el complejo ternario (TC): eIF2, GTP, met-tRNA y la subunidad ribosomal 40S (asociada a eIF1, eIF1A, y eIF5). La interacción del PIC con el mRNA es mediada por eIF3 que interactúa con la subunidad 40S ribosomal y con el complejo de iniciación eucariótico F (eIF4F). eIF4F está conformado por una RNA helicasa, eIF4A, la proteína de unión a cap,

eIF4E, y la proteína de andamiaje, eIF4G. Vía interacción proteína-proteína, eIF4G interactúa con el factor eIF3, la cual a su vez está asociada al complejo 43S, atrayendo la subunidad ribosomal 40S hacia el mRNA. Esto establece las bases moleculares de la iniciación de la traducción cap-dependiente. Este mecanismo de reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, el cual es dependiente del reconocimiento de la estructura 5'cap por medio del complejo eIF4F, es la principal estrategia utilizada por los mRNAs celulares para dar inicio a su traducción (28). Además, de establecer un vínculo con eIF4E, eIF4A, y eIF3, eIF4G interactúa con la proteína de unión a poli(A), PABP, asociada a la cola poli(A) de los mRNAs. La interacción de eIF4F (via eIF4G)-PABP induce la circularización del mRNA mediante una interacción proteína-proteína y proteína-RNA (29). La circularización del mRNA mediada por la interacción cap-eIF4F-PABP-Poly(A) estimula de iniciación de la traducción dependiente del extremo 5'cap. Es importante notar que a pesar de carecer de una cola Poli(A), se ha descrito que la región 3'UTR del mRNA de DENV es reconocido por PABP. A su vez PABP interactúa con eIF4F en el extremo 5' del mRNA viral induciendo la circularización del mRNA viral de manera cap-dependiente y Poly(A) -independiente. Este proceso de circularización del mRNA viral de manera Poly(A) independiente modula positivamente la traducción cap-dependiente del mRNA de DENV (30).

Luego de su reclutamiento en proximidad al extremo 5' del mRNA la subunidad 40S migra en sentido 3' hasta encontrar el codón de inicio en un proceso de "búsqueda" del codón de inicio, denominado "*scanning*". El codón de inicio es identificado y decodificado por el RNA de transferencia (tRNA<sub>i</sub>) iniciador (met-tRNA<sub>i</sub>) interacción dependiente de los factores asociados a la subunidad 40S ribosomal eIF1 y eIF1A. Una vez posicionado sobre el codón de inicio (complejo 48S), se genera la hidrólisis

(promovido por eIF5) del GTP asociado a eIF2 y la liberación de los factores eIF1, eIF1A, eIF2-GDP y eIF5. El factor eIF5B favorece el reclutamiento de la subunidad 60S, dando lugar al ensamblaje del complejo 80S, competente para iniciar la etapa de elongación en el proceso de la síntesis proteica (31)(32).

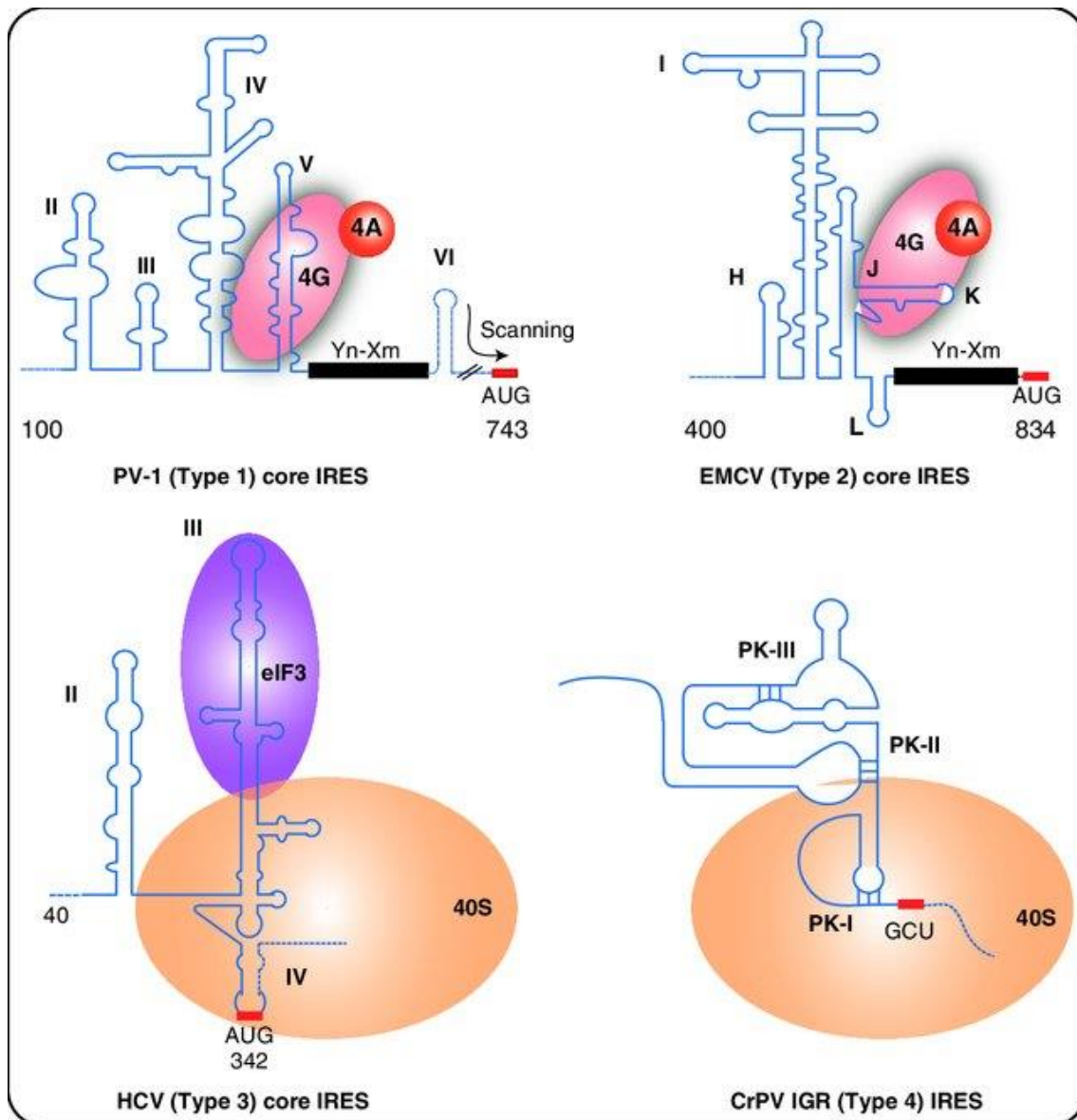
Para el caso de la traducción del mRNA de DENV, también se ha descrito un mecanismo de iniciación cap-independiente e IRES-dependiente (33). Se ha documentado que en células donde la traducción cap-dependiente se encuentra farmacológicamente inhibida por medio de la droga LY294002, la síntesis de proteínas virales, así como el título viral de DENV, no se ven afectados (33). LY294002, es un flavonoide inhibidor de la familia enzimática fosfatidylinositol 3-kinases (PI3Ks)(34). La inhibición de PI3K afecta la fosforilación de mTOR1 (mammalian target of rapamycin complex 1) vía AKT (Protein kinase B), produciendo la hipofosforilación de 4E-BP (4E binding protein), gatillando la unión de 4E-BP-eIF4E (35,36). eIF4E es el factor de inicio menos abundante entre las proteínas que participan en el inicio de la traducción, siendo un punto en la regulación de este proceso (37). 4EBP y eIF4G compiten por el mismo sitio de unión a eIF4E, dado que poseen motivos similares en sus secuencias aminoacídicas. Cuando 4EBP está hipofosforilado incrementa su afinidad por eIF4E. La interacción eIF4E-4EBP impide la interacción eIF4E-eIF4G disminuyendo así la disponibilidad de eIF4E para la formación del complejo eIF4F, dando lugar a la inhibición de la traducción cap-independiente(37,38). Por tanto, puesto que la traducción del mRNA de DENV es resistente a la acción de LY294002 se sugiere que esta puede ser mediada por un mecanismo cap-independiente. Esto permitiría al virus asegurar la síntesis de sus proteínas en condiciones donde algunos factores canónicos de inicio de la traducción, como es el caso de eIF4E, no se encuentran accesibles (33) (39). Estos estudios



determinaron que la traducción cap-independiente del mRNA de DENV es modulada y dependiente de ambas regiones UTRs del mRNA, así como de proteínas accesorias de origen celular. El estudio de variantes de DENV 2 que muestran diferencias en la eficiencia de síntesis de proteínas virales presentan cambios específicos en la región 3', indicando que esta es importante para la traducción del mRNA viral (25). También ha sido documentado que la infección por DENV2 en horas tempranas produce una disminución de la síntesis global de proteínas en células de mamíferos (26). Estudios de traducción global basado en perfiles de ribosomas, evidencian una disminución en el número de polisomas totales, así como una baja del mRNA de GAPDH (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) traduccionalmente activo de 85 a 40%, en condiciones de infección. En estas mismas condiciones se observó que la síntesis de proteínas virales y la presencia de mRNA en polisomas no se veía afectada, lo cual refuerza la presencia de un mecanismo de traducción alternativo a la traducción cap-dependiente (26). El modelo de traducción cap-independiente e IRES-independiente propone un cambio en el mecanismo traduccional del mRNA de DENV cuando eIF4E o posiblemente otros factores de inicio tienen una disponibilidad reducida (33). Se sugiere que en estas condiciones se produce un reordenamiento de los complejos ribonucleoproteicos, que facilitan la interacción de los extremos 5' y 3'. En esta conformación, estructuras o secuencias del 3'UTR estabilizan o promuevan el reclutamiento de factores como eIF4G y eIF4A al extremo 5'UTR, sin el requerimiento de eIF4E. Proteínas como La, PTB, YB-1, hnRNP A1 o Q son RBP celulares distintas a los factores de inicio propuestas como candidatos para el "andamio" entre los extremos UTR(33).

Adicionalmente, la región 5'UTR del mRNA de DENV posee actividad IRES (DENV IRES)(22), lo que permite a los mRNA virales generar partículas virales infecciosas en células C6/36 y BHK 21 a pesar de carecer de la modificación 5'cap funcional. Sin embargo, cuando la actividad del DENV IRES fue evaluada en el contexto de vectores bicistrónicos, se observó dependencia del tipo celular en el cual se conducían los experimentos (22). A la fecha el IRES de DEVN ha sido identificado pero aun no ha sido caracterizado y la manera en la cual interactúa con la maquinaria de traducción del hospedero permanece sin ser establecida.

En general los IRESs se definen como regiones de RNA capaz de promover el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S de manera independiente a los extremos 5' y 3' del mRNA (40). Sin embargo, para ser funcionales, algunos IRES requieren de proteínas adicionales que de manera genérica se denominan factores trans-activadores de IRES (ITAF). Los ITAF, en su mayoría, son proteínas de unión a RNA (RBP) que a través de la unión proteína-RNA o proteína-proteína pueden regular el reclutamiento de la maquinaria traduccional al mRNA o bien impactan sobre la estructura funcional del mRNA (41). La proteína de unión al tracto de poli pirimidina (PTB) ha sido descrita como un ITAF estimulador de varios IRES virales como son aquellos presentes en los mRNA de los miembros de la familia *Picornaviridae* así como para algunos IRES presente en otros mRNAs virales y celulares (41).



**Figura IV. Representación esquemática de los tipos de IRES (1-4) y su interacción con la maquinaria traduccional.** Las estructuras en los IRES: stem-loop (II-VI en PV-1, H-L en EMCV y II-IV en HCV) y los pseudoknots (PK-I, II y III en CrPV IGR) están indicadas en la figura. Los rectángulos rojos representan el codón de inicio AUG. Yn-Xm representan el tracto de oligopirimidinas en la región 3' terminal. Modificado de (42).

Los IRES virales se han agrupado o clasificado en 4 grandes de acuerdo con su estructura y el requerimiento de factores de inicio de la traducción (Figura IV). Sin embargo, otros IRES no pueden ser ubicados en estas categorías (42). Estos tipos de IRES carecen de una

estructura similar y difieren también en la forma de reclutamiento de los ribosomas. En los IRES tipo 1 como los de PV y HRV, el codón de inicio debe ser encontrado por el complejo 43S mediante el proceso de scanning. Los IRES tipo 2, como el de EMCV pueden reclutar la subunidad ribosomal en la cercanía del AUG sin el requerimiento de scanning. Tanto el tipo 1 como el tipo 2 interactúan con la subunidad 40S indirectamente a través de eIF4G. Los tipos 1y 2 requieren de todos los factores canónicos de inicio de la traducción con excepción de eIF4E (ejemplo: eIF1, 1A, 2, 3, 4A, 4B, 4G, 5 y 5A). En contraste, los IRES tipo 3 o IRES tipo HCV no usan eIF4G/A como adaptador para el reclutamiento de la subunidad 40S. El ensamblaje del complejo 48S en este IRES requiere solamente la subunidad 40S, met-tRNA<sub>i</sub>, eIF3 y eIF2. Los IRES tipo 4 se han descrito en la región codificante en los miembros de *Dicistroviridae*. Estos RNAs adoptan una estructura similar al tRNA iniciador lo que permite el reclutamiento directo del ribosoma, incluso sin met-tRNA<sub>i</sub> o un codón de inicio AUG (42)(40).

### **Estudio de los IRES**

Debido a que no existe consenso de secuencia ni de estructura que permita identificar o definir un elemento IRES, en la actualidad los IRESs son definidos exclusivamente mediante ensayos funcionales (43). Estos ensayos funcionales permiten establecer que una región de RNA puede reclutar ribosomas de forma interna e independiente de los extremos (43). El ensayo más utilizado para la identificación de IRESs corresponde al uso de vectores bicistrónicos (43), en el cual la región de RNA a evaluar se inserta en la región intercistrónica del vector. Estos vectores permiten la síntesis de un mRNA bicistrónico, el cual posee dos cistrones reporteros separados por una región intercistrónica, que codifica para dos proteínas reporteras. En este contexto la traducción del primer cistrón

es dependiente de la estructura 5'cap, mientras que la traducción del segundo cistrón sólo puede ocurrir si la región de RNA inserta en el espacio intercistrónico es capaz de reclutar a la subunidad 40S ribosomal de manera interna (44)(43).

Los IRESs también pueden ser estudiados *in vitro*, en sistemas libre de células. El lisado de reticulocito de conejo (RRL) es probablemente el sistema más empleado para este propósito (43). *In vitro* la síntesis de proteínas es dependiente de sales de potasio (K+) y magnesio (Mg+) (45,46). Las concentraciones óptimas de estas sales varían según el tipo de mRNA en estudio. Los IRESs de HCV, PV, HRV, HAV, FMDV y EMCV han presentado diferencias notables en los requerimientos de sales óptimas para la traducción de sus respectivos mRNAs. Para el caso de los Picornavirus, se ha demostrado que la estimulación de la traducción IRES-dependiente mediada por la presencia de la cola de Poly(A) es afectada por las concentraciones de estas sales (47). Para el caso del K+ se ha propuesto que este participa en la desestabilización de estructuras secundarias en el ARN, facilitando el *scanning* por las subunidades ribosomales 40S(48).

### **Proteína de unión al tracto de Polipirimidinas (PTB) y Denguevirus**

La traducción del mRNA de DENV depende de proteínas de unión a RNA (RBP) celulares (49). Dentro de la gran familia de RBP estudios han mostrado que PTB interactúa con la hebra positiva del RNA de DENV durante la infección de células HuH7; adicionalmente el silenciamiento transitorio de PTB se asocia a una disminución de la producción de partículas virales (49). PTB, miembro de la familia de las hnRNPs, reconoce secuencias de pirimidinas como UCUU y CUCUCU, mediante 4 motivos de unión a RNA (RRM) (50). PTB presenta localización preferentemente nuclear, pero en determinadas condiciones se ha descrito su traslocación al citoplasma (51). En células Vero la infección por DENV

induce un cambio en la localización celular de PTB, desde el núcleo al citoplasma (52). Además, este trabajo establece que PTB se colocalizaba con las proteínas virales NS1 y NS5 en el RER. Ensayos de silenciamiento transitorio y sobreexpresión muestran que PTB tiene un rol en el ciclo replicativo de DENV (52). En la célula PTB media diversos procesos del metabolismo como la regulación del *splicing*, la poli-adenilación de mRNAs, estabilidad de mRNA y regulación del inicio de la traducción (53). Producto de un proceso de *splicing* alternativo en células se generan tres isoformas de PTB. La isoforma menor corresponde a PTB1 la cual presenta 521 aminoácidos, las isoformas PTB2 y PTB4 contienen 19 y 26 aminoácidos adicionales, respectivamente, entre los RRM2 y RRM3 (54). Interesante para este trabajo es el hecho que PTB ha sido descrito como un modulador de la traducción IRES-dependiente para los IRESs de poliovirus (PV) (55) y el virus de la hepatitis C (HCV) (56)(57). Se ha establecido además que PTB interactúa directamente con la región 5'UTR del virus del tumor mamario murino (MMTV) y que sus isoformas modulan de forma diferencial la traducción IRES dependiente de este mRNA viral (58). A la fecha el impacto de PTB sobre la traducción mediada por el DENV IRES no ha sido determinada.

## **Problema**

El mRNA de DENV puede iniciar traducción de manera cap- y IRES-dependiente; sin embargo, el IRES de DENV ha sido descrito, pero no ha sido caracterizado. Por otra parte, se ha establecido que proteínas celulares distintas a los factores de inicio de la traducción participan en la traducción del mRNA de DENV. Es por ello que en esta tesis se propone estudiar la traducción IRES-dependiente del mRNA de DENV y evaluar el posible rol de PTB como ITAF del DENV IRES.

## **Hipótesis:**

La traducción del mRNA de DENV es mediada por un IRES, siendo PTB un ITAF del mismo.

## **Objetivo General:**

Caracterizar la traducción IRES dependiente del mRNA de *Denguevirus* y establecer el impacto de las isoformas de PTB sobre su regulación.

## **Objetivos específicos:**

1. Caracterizar el mecanismo de iniciación de la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV.
2. Determinar el impacto de PTB1, PTB2 y PTB4 sobre la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV.

## **Materiales y Métodos**

### **Plásmidos**

Los vectores dl  $\Delta$ EMCV (59), dl HCV 1b (referido como dl HCV IRES) (60) y dl PV IRES (59) han sido previamente descritos. El vector Glo-FLuc fue donado por Dr. Ricardo Soto-Rifo (Universidad de Chile, Chile). Los plásmidos que expresan tanto la versión funcional (wild-type) de la proteasa 2A de Rinovirus humano (genotipo A16) o la versión inactiva (mutante) fueron donados por Dr. Ann C. Palmenberg y Dr. Kelly Watters (University of Wisconsin-Madison, USA). EL vector pGL5'3'DV (61) donado por la Dra. Andrea Gamarnik (Fundación Instituto Leloir, Argentina). Para generar los vectores bicistrónicos (dl), dl  $\Delta$  EMCV 5'UTR DENV y dl 5'UTR DENV, la región 5'UTR fue recuperada por PCR usando los primers DEN 5 UTR F Eco RI (CTCAAAGAATTCAGTTGTTAGTCTACGTGG) y DENV 5UTR R NcoI (CTCAAACCATGGCAGAGATCTGCTCTCTAA) a partir del templado pGL5'3'DV. Los productos de PCR fueron digeridos enzimáticamente con EcoRI y NcoI (ThermoFisher Scientific) y clonados en la región intercistrónica del dl HIV IRES (59) previamente digerido con EcoRI/NcoI y NcoI/XbaI, como ha sido descrito previamente (62). Para generar el vector  $\Delta$ SV40 dl 5'UTR DENV, el dl 5'UTR DENV fue digerido con MluI y Eco147I (StuI) (ThermoFisher Scientific) y posteriormente re-ligado usando T4 ligasa (ThermoFisher Scientific). Los plásmidos que codifican para las isoformas de PTB: PTB1-His, PTB2-His, PTB4-His, PTB4-Flag y las versiones mutantes en los motivos de reconocimiento de RNA (RRM) fueron descritas previamente (58).

### **Cultivo celular e infecciones**

*Denguevirus* type 2 strain 16681 fue donado por Andrea Gamarnik (Fundación Instituto Leloir, Argentina). Las líneas celulares: HEK 293T (ATCC CRL-11268), HeLa (ATCC CRM-



CCL-2), HuH7 donadas por R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany), Vero E6 (ATCC CRL-1586), A549 (ATCC CCL-185), MDCK (ATCC PTA-6500) and BHK 21 (ATCC CCL-10) fueron crecidas en Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; ; #SH30022, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, Utah, USA) suplementado con 10% fetal bovine serum (#SH30910, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 1% penicillin-streptomycin (1000 U/ mL) (#SV30010, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), y 1% amphotericin B (25 mg/ml) (#SV30078.01, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences). El medio de cultivo de las células HuH7 fue suplementado con MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (ThermoFisher Scientific #11140050). Las células de mosquitos, *Aedes albopictus* clone C6/36 fueron donadas por Andrea Gamarnik (Fundación Instituto Leloir, Argentina). Las células Jurkat (ATCC TIB-152) y las C6/36 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 Medium (ThermoFisher Scientific # 12633020). Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C en una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, con excepción de las células C6/36 que fueron cultivadas a 28°C.

### **Transcripción *in vitro***

Para la transcripción *in vitro* todos los plásmidos bicistrónicos fueron linealizados por digestión enzimática con Bam HI, exceptuando el dl PV IRES que fue linealizado con XhoI y Glo-FLuc con EcoRI. Para obtener los mRNAs reporteros monocistrónicos de DEN, el vector pGL5'3'DV fue digerido con BamHI y con XbaI para eliminar la región 3'UTR. Los RNA fueron sintetizados usando mMESSAGING mMACHINE™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher Scientific #AM1344) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los mRNAs con la modificación 5'UTR (Acap) fueron sintetizados en presencia del análogo de cap no funcional A(5') ppp(5')A. La poli-adenilación *in vitro* se realizó con el kit Poly(A)

Tailing Kit (ThermoFisher Scientific #AM1350) según las recomendaciones del fabricante. Posterior a la reacción de transcripción, los RNA fueron tratados con 2 U de Turbo DNase (#AM2238) por 30 min a 37°C. Estos RNAs fueron precipitados con 2.5 M de LiCl por 1 h a -20°C with, y centrifugados a 16 000 g por 30 min a 4°C, washed with 70% etanol, para finalmente ser resuspendidos en 50µL de agua libre de nucleasas. La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría empleando un nanospectrophotometry (N60-Implen Nanophotometer, Westlake Village, CA, USA), adicionalmente la integridad del RNA fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa.

### **Traducción *in vitro***

Las reacciones de traducción *in vitro* se llevaron a cabo en el sistema comercial lisado de reticulocito de conejo tratado (RRL; #L4960; Promega) como ha sido descrito anteriormente (63). Los ensayos de reclutamiento de la sub-unidad ribosomal 40S se realizaron en presencia de edeina, droga donada por I. Brierley (University of Cambridge, UK), donde se empleó el protocolo descrito con anterioridad (62). Las sales óptimas para la traducción *in vitro* del dl HCV IRES (100mMKCl and 0.75 mM MgOAc<sub>2</sub>) y dl PV IRES han sido descritas con anterioridad (60)(62). Para los experimentos de inhibición de la traducción cap-dependiente *in vitro*, la proteasa L, producida en RRL fue diluida 1:5 o 1:10 en agua libre de nucleasas (IDT), fue añadida a una nueva reacción de RRL 35% (vol/vol), incubada 15 min a 30°C, (a concentraciones finales 1, 3, 6 y 10 % [vol/vol]) para finalmente traducir los mRNA bicistrónicos dl HCV IRES y dl 5'UTR DENV.

## **Transfección de DNA**

Para la transfección de DNA plasmidial, las células fueron sembradas a una confluencia de 70-80% en placas de 24 pocillos 24h antes de la transfección. La transfección de los plásmidos se realizó empleando el reactivo PEI (PEI; GIBCO, ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Para la determinación de la actividad IRES, 200 ng de los vectores bicistrónicos fueron co-transfectadas con 50 ng del vector pcDNA 3.1-LacZ como control de transfección. En la determinación del efecto de PTB sobre la actividad del IRES de DENV, las células BHK 21 fueron transfectadas con 200 ng del dl 5UTR DENV, en conjunto con cantidades crecientes de los plásmidos que codifican para las isoformas de PTB (pcDNA4/HisMax-PTB1, pcDNA4/HisMax-PTB2, and pcDNA4/HisMax-PTB4) o el vector pSP64 Poly(A) (#P1241, Promega Corporation). Los experimentos con la proteasa 2A de HRV, se llevaron a cabo en las líneas BHK 21 and Hek 293T, estas células fueron co-transfectadas con 200 ng del dl 5UTR DENV o el plásmido PciRenilla en conjunto con 500 ng de los vectores HRV p2A-wt o HRV p2A-mut por cada condición en placas de 24 pocillos. En todos los experimentos 24h posterior a la transfección el medio de cultivo fue removido y las monocapas se lisaron empleando Passive Lysis buffer, Dual-Luciferase® Reporter Assay System (#E1960, Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

## **Transfección de RNA y siRNA**

Para la transfección de RNA siRNA las células fueron sembradas 24h antes del experimento para obtener una confluencia de 90% en placas de 24 pocillos. En los ensayos con los reporteros monocistrónicos y bicistrónicos 0.5 pmol de los RNAs

transcritos *in vitro*, fueron transfectados usando Lipofectamine 2000 system (#11668019; ThermoFisher Scientific). 4h posterior a la transfección las células fueron colectadas para la determinación de la actividad luciferasa. Para el silenciamiento de RLuc en los ensayos de promotor críptico, se realizó la transfección de DNA 200 ng del dl 5UTR DENV en conjunto con 50 nM de un siRNA control Silencer Select Negative Control N°1 siRNA (Ambion; Cat# 4390844; Thermo Fisher Scientific) o con un siRNA específico para el ORF de RLuc (Renilla siRNA, 5'-UAUAAGAACCAUUACCAGAUUUGCCUG-3'; IDT) empleando Lipofectamine 2000 (58). El silenciamiento de las isoformas de PTB (PTB1, PTB2, and PTB4), se llevó a cabo en células BHK 21 a una confluencia de 60–70% en placas de 24 pocillos. Para esto, 200 ng del dl 5UTR DENV fueron co-transfectados con 75 nM de un siRNA control Negative Control N°1 siRNA (Thermo Fisher Scientific) o con una mezcla de siRNAs anti-PTB (25 nM de cada uno): siRNA PTBP1; 5'-AACUCCAUCAUCCAGAGAA-3', siRNA PTBP2; 5'-GAGAGGAUCUGACGAACUA-3', y SMART pool siGENOME PTBP1 siRNA (# M-003528-02, GE Healthcare Dharmacon Inc, Piscataway, NJ, USA) usando Lipofectamine 2000. Las actividades de RLuc y FLuc fueron medidas 24h posterior a la transfección (58). Para el silenciamiento de PTB en células Hek 293T, se emplearon los mismos siRNA anti PTB descritos anteriormente, estos fueron co-transfectados con el reportero viral pGL53DV (transcrito y capeado *in vitro*), la actividad de FLuc fue medida 24 y 48 posterior a la transfección.

### **Ensayo con el Virus Reportero Dengue 2 y PTBs**

Los experimentos sobre efecto de las isoformas de PTB en la traducción del reportero viral se realizaron en el Laboratorio de Virología Molecular del Instituto Leloir, Buenos

Aires, Argentina. El RNA viral correspondiente al virus reportero (64) fue transcrito y capeado *in vitro* como se describió anteriormente. Las células Hek 293T fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para las isoformas de PTB o pSP64 Poly(A) como se describió anteriormente. 24h posterior a la transfección de los plásmidos, el RNA correspondiente al reportero viral fue transfectado usando Lipofectamina 2000 y la actividad del reportero RLuc fue medida 4 y 8h posterior a la transfección.

### **Actividad Luciferasa**

Las actividades enzimáticas de Firefly luciferase (FLuc) y Renilla luciferase (RLuc) fueron determinadas mediante el reactivo comercial DLR<sup>®</sup> Assay System (#E1960, Promega Corporation) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para esto 20 µL del lisado celular se mezclaron con 15 µL del reactivo para inmediatamente medir la actividad luciferasa en Sirius Single Tube Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH). Los datos son expresados en forma de Relative Luciferase Activity (RLA) o Relative Translation Activity (RTA) (63)(62)(58).

### **Extracción de RNA y RT-qPCR**

La extracción de RNA se llevó a cabo por la metodología que ha sido previamente en nuestro laboratorio (65). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS 1X (#SH30256, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences) y tratadas en hielo con 500 µL de TRIzol reagent (#15596018, Life Technologies Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc.), el RNA fue obtenido de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA extraído fue resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas y tratado con DNase (#AM1907, Ambion, Thermo-Fisher Scientific Inc.). La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría (N60-Implen Nanophotometer, Westlake Village, CA, USA). Las

reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo con el sistema comercial Brilliant II SYBR Green RT-qPCR one Step Master Mix (#600835, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En todos los experimentos se incluyó una reacción No-RT-qPCR como control de contaminación por DNA. La detección del RNA que codifica para FLuc se realizó con los cebadores firefly sense (5'-ACTTCGAAATGTCCGTTCCGG-3') y firefly antisense (5'-GCAACTCCGATAAATAACGCG-3'), para el mRNA de GAPDH GAPDH sense (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3') y GAPDH antisense (5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'), para el rRNA 18S se emplearon los cebadores 18S sense (5'-GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3') y 18S antisense (5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3') como se ha descrito anteriormente (66). El análisis de datos se realizó por el método  $\Delta\Delta C_t$  descrito anteriormente (67)(68).

### **Actividad citotóxica**

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de reducción del MTS usando el sistema comercial CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (#G358A, Promega Corporation) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células BHK 21 cells fueron sembradas a una confluencia de 70-80% en placas de 96 pocillos y transfectadas con los plásmidos que codifican para las PTBs o sc/siRNAs para el silenciamiento de PTB endógeno. 24h después se añadió el reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, y se incubó a 37°C por 2 h, la absorbancia fue medida a 495nm en Biochrom EZ Read 400 microplate reader (Biochrom, Holliston, MA, USA).

### **Microscopía de fluorescencia**

La obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia se llevó a cabo en

Olympus BX51 Microscope usando el objetivo de inmersión 60X NA 1.42 Oil PlanApo N. El software MBF Stereo Investigator 11 fue empleado para la adquisición de las imágenes. En los experimentos de localización celular de PTB las células A549 fueron infectadas o no (mock) con DENV 2, 24h posterior a la infección los covers fueron fijados con 4% paraformaldehyde (PFA, Merck Millipore), permeabilizados con PBS-Tr (PBS-Triton X-100 (0.03%)) y bloqueados con 10% BSA en PBS-Tr. La detección de PTB endógeno se realizó con el anticuerpo Anti-PTBP1 (#8776, Cell signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) a una dilución de 1: 250. La infección por DENV 2 fue monitoreada mediante el anticuerpo anti-cápside (dilución 1:500) el cual fue donado por la Dra. Andrea Gamarnik (Fundación Instituto Leloir, Argentina). Para la determinación de la localización celular de las isoformas PTB en sobreexpresión, las células BHK 21 fueron transfectadas con 500ng de los vectores que codifican para estas proteínas en conjunto con 200ng del dl 5UTR DENV. La detección de estas proteínas se realizó usando un anticuerpo anti-His (Sigma-Aldrich, #H1029) a una dilución de 1:500. En todos los casos como medio de montaje se empleó Vectashield H1200 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010, USA) con 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI). Los anticuerpos secundarios conjugados AlexaFluor anti-Rabbit 488 y anti-mouse 555 fueron usados en dilución 1:250.

### **Western blots**

Para los ensayos de western blot las células fueron lisadas con Passive Lysis 5X Buffer (#E1941, Promega Corporation) y la concentración de proteínas totales se determinó por un ensayo de Bradford usando Bio-Rad Protein Assay (#5000006, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). En todos los casos 40 µg de proteínas totales

fueron resuelto en geles de 12% Glycine SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa 0.45  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane (#10600002; GE Healthcare Bio-Sciences 100 Results Way, Marlborough, MA 01752, USA). Las membranas se bloquearon con TBS, 5% de leche y 0.1% de Tween-20 por 1 h a temperatura ambiente e incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios fueron empleados en la siguientes diluciones: anti-eIF4G (sc-11373, H-300; Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:1000, anti-GADPH (#MA5-15738; Thermo Fisher Scientific Inc.), anti-polyhistidine antibody (#H1029, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dilución 1 : 5000, anti-Flag antibody (#F3165, Sigma-Aldrich) dilución 1 : 500 dilución y anti-PTBP1 antibody (#8776, Cell signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) dilución 1 : 1000. Los anticuerpos secundarios conjugados: Goat anti-mouse y Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) (#AP308P, #AP132P; Merck, Darmstadt, Germany) se ocuparon a una dilución de 1:10,000. La visualización de los westerns blots se realizó por una reacción de quimioluminiscencia usando 4-hydroxycinnamic acid (#800237, Merck) y luminol (#09253, Sigma-Aldrich) o SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34096, Thermo Fisher Scientific Inc.).

### **Secuencias y análisis estadístico**

La generación de los gráficos, así como los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando GraphPad Prism, versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), usando las herramientas t-test o ordinary one-way test para las comparaciones de grupo. EL software Serial Cloner v2.6.1 fue usado para el diseño de partidores, alineamiento y análisis de secuencias.



## Resultados

### Objetivo #1.

Caracterizar el mecanismo de iniciación de la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV.

### **La región 5'UTR del mRNA de DENV permite la traducción Cap-independiente en un sistema *in vitro***

Un estudio reciente establece que la región 5'UTR del mRNA de DENV posee actividad IRES (Song *et al.*, 2019). Sin embargo, esta observación resulta controversial al considerar una publicación anterior que descarta la presencia de un IRES en el mRNA de DENV (33). Dada esta controversia iniciamos este estudio evaluando si la región 5'UTR del mRNA de DENV posee actividad IRES. Para esto, se generaron mRNAs monocistrónicos en los cuales se reemplazó la región codificante de las proteínas virales por un gen reportero que codifica para la luciferasa de luciérnaga (FLuc) (Fig1. A). Se generó un mRNA "virus-like" que presenta una estructura 5'cap, seguido de la región 5'UTR del mRNA de DENV, parte de la región codificante estructurada en marco con el reportero FLuc, y la región 3'UTR del mRNA de DENV (m7GpppG\_3UTR). Además, se generó un mRNA igual al anterior pero que contiene un Acap (ApppA\_3UTR) y otro mRNA donde se reemplazó la región 3'UTR de DENV por una cola poly(A). El Acap corresponde a una estructura "cap" no-funcional que no es reconocido por eIF4E (69). Como control se empleó el mRNA reportero que expresa FLuc mediado por la región 5'UTR del mRNA de globina. En este contexto la traducción es cap-dependiente. Este mRNA control se sintetizó *in vitro* con un cap funcional (m7GpppG) en el extremo 5'UTR o bien con un Acap (ApppA). Los mRNAs fueron traducidos *in vitro*, en lisado de

reticulocito de conejo (RRL, Promega). Posterior a la reacción de traducción se determinó por un lado la actividad luciferasa reportera y también se determinó los niveles de RNA mediante una reacción de RT-qPCR (Fig. 1).

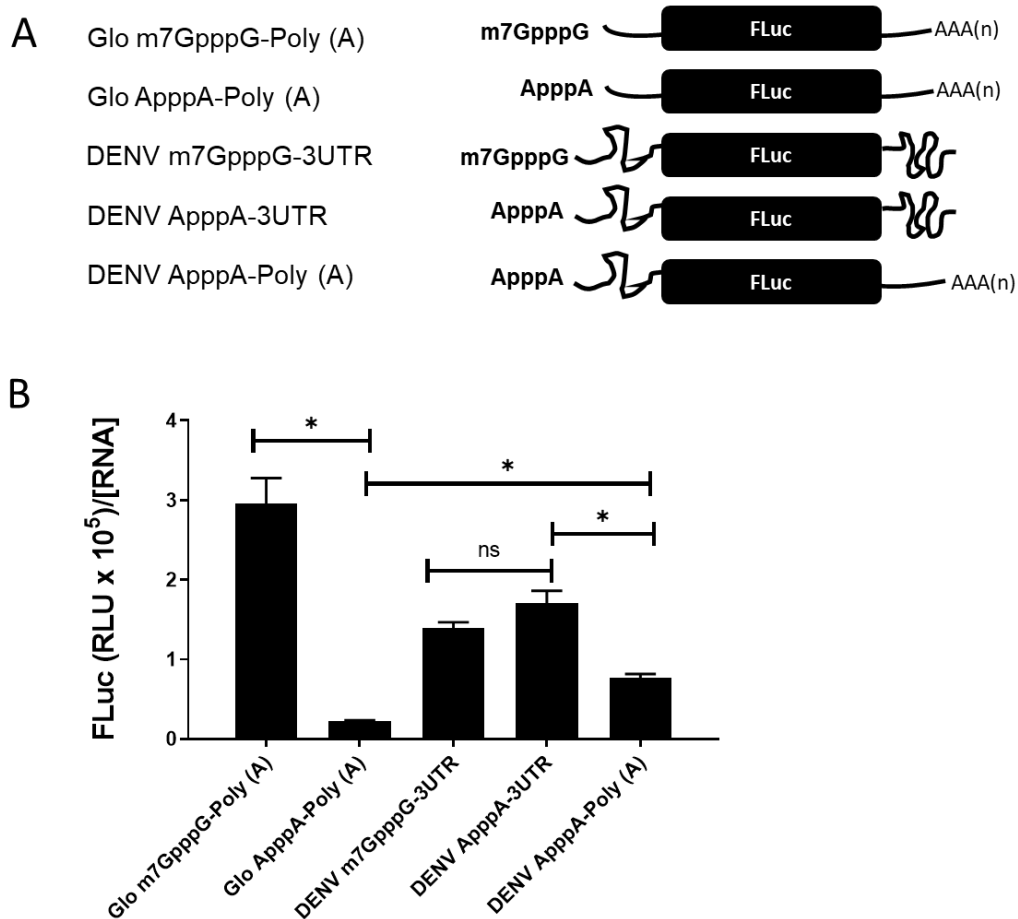


Figura 1. La traducción del mRNA de DENV puede ocurrir de manera cap-dependiente y cap-independiente en un sistema de traducción in vitro. A) Representación esquemática de los reporteros virales y celulares empleados en los ensayos de traducción in vitro. B) Actividad traduccional de los reporteros en RRL normalizados por cantidad de RNA. Los RNA transcritos in vitro fueron traducidos en RRL (35%), luego de 90 minutos de reacción, se midió la actividad FLuc, así como los niveles de RNA reporteros relativos al rRNA 18S. Los datos corresponden al promedio (+/- SEM) de 3 repeticiones independientes, cada una por duplicado. EL análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba de t test.

Los resultados muestran que la traducción del mRNA celular de Globina ocurre de manera cap-dependiente (Figura 1B), lo cual se evidencia cuando la estructura 5'cap se reemplaza por un Acap. En presencia de la estructura Acap, disminuye la traducción de este mRNA en un 93%. Sin embargo, al comparar el mRNA *viral like* de DENV con cap y Acap, se observa que el mRNA con Acap es un 27% mayor que la traducción cap-dependiente. Al sustituir la región 3'UTR del mRNA de DENV por una cola de Poly (A) se observa una reducción del 44%, lo que sugiere que la región 3'UTR también participa en la traducción cap-independiente (Figura 1B). A pesar de esto, nuestros resultados sugieren que la región 5'UTR, independientemente del extremo 3', puede sustentar el inicio de la traducción no-canónica de este mRNA *in vitro*.

#### **La región 5'UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES *in vitro*.**

Los resultados anteriores confirman de manera parcial las observaciones de Song *et al.* (2019), indicando que la región 5'UTR del mRNA de DENV es capaz de mediar de manera eficiente una traducción cap-independiente *in vitro*. Con el fin de profundizar estos resultados, la región 5'UTR de DENV2 fue clonada en un vector bicistrónico como se ha descrito previamente (63). Como la región 3'UTR participa en un posible mecanismo alternativo de traducción independiente del cap (Figura 1b), decidimos omitirla en la construcción del vector bicistrónico, con el objetivo de estudiar solamente la región 5'. El vector utilizado permite la síntesis de un mRNA que codifica para la proteína reportera Luciferasa de Renilla (RLuc), de manera cap-dependiente, y para la proteína Luciferasa de Luciérnaga (FLuc) de manera IRES-dependiente. Adicionalmente se generó el vector dl  $\Delta$ EMCV 5UTR, que posee río abajo del gen que codifica para RLuc la estructura  $\Delta$ EMCV, seguido de la región 5'UTR de DENV2. El fin de esta construcción fue evaluar el procesos

denominado “*read-through*”, mediante el cual ribosomas que han traducido el primer cistrón, RLuc, pasan por alto la señal de terminación del primer cistrón y continúan la traducción hacia el segundo cistrón (FLuc) (70). Como control de actividad IRES, en estos ensayos se utilizó un vector bicistrónico que posee el elemento IRES de HCV genotipo 1b (dl HCV IRES) (60). Como controles negativos de actividad IRES se utilizó el RNA dl  $\Delta$ EMCV y el dl HCV 266/268, los cuales carecen de actividad IRES (62)(60).

Los vectores fueron linealizados y transcritos mediante el promotor T7 para posteriormente ser traducidos en el sistema de traducción *in vitro* Lisado de Reticulocito de Conejo (RRL).

*In vitro* la actividad IRES es dependiente de sales de potasio y magnesio(46,47). Esta observación nos llevó a evaluar el impacto de estas sales en la actividad IRES de DENV. Con este fin la reacción de traducción *in vitro* fue suplementada con diferentes concentraciones de sales en un rango de concentración que abarca de 40 a 160 mM de cloruro de potasio (KCl) y 0.25-2 mM de acetato de magnesio (MgOAc). Ha sido descrito, para el caso del K<sup>+</sup> que el uso de las sales de cloruro tienen un efecto restrictivo para la traducción, dado que en altas concentraciones de Cl<sup>-</sup> se afecta el reconocimiento del mRNA por la subunidad 40S (71)(72). Sin embargo, el uso de Acetato de Potasio (KOAc) si bien permite evaluar mayores concentraciones de K<sup>+</sup>, produce la síntesis de productos no específicos y aberrantes debido a la iniciación de la traducción en otros sitios (48). Por este motivo para el estudio de la influencia del catión K<sup>+</sup> se eligieron sales de Cl<sup>-</sup>.

Los resultados se expresaron relativos a la actividad del dl 5UTR DENV, donde las actividades enzimáticas correspondiente a las proteínas reporteras RLuc y FLuc obtenidas en las condiciones basales de sales presentes en el RRL (40 mM de K<sup>+</sup> y

0,25mM de  $Mg^{2+}$ ), fueron llevadas a 100%. Se observó que la actividad óptima del IRES de DENV *in vitro* ocurre en presencia de 60 mM final de  $K^+$  (Figura 2 A, panel derecho) y 0,25 mM de  $Mg^{2+}$  (Figura 2B, panel derecho). Además, la traducción cap-dependiente es afectada de forma equivalente en los tres mRNA evaluados a distintas concentraciones de potasio y magnesio (Figura 2 A y B, panel izquierdo). Las actividades RLuc y FLuc mostraron diferentes respuestas a las variaciones de potasio y magnesio, sugiriendo que en RRL la traducción de estos cistrones es independiente una de la otra.

Una vez establecidas las concentraciones de sales óptimas para el IRES de DENV, se procedió a evaluar su actividad en comparación con un elemento IRES conocido (HCV 1b) y dos controles negativos de actividad IRES (dl  $\Delta$ EMCV y dl HCV 266/268). Como era de esperar en todos los mRNA se observó actividad RLuc, indicando que la traducción cap-dependiente es funcional en este sistema (Figura. 3 A). Los resultados muestran que la actividad de RLuc en dl  $\Delta$ EMCV fue significativamente mayor respecto al resto de los mRNAs, sugiriendo que mayor templado de RNA fue usado en esta condición. Para el resto de los mRNAs incluidos en este experimento no se observaron diferencias significativas (Figura. 3 A). La actividad FLuc de los reporteros de DENV (dl 5UTR DENV y dl dEMCV 5UTR DENV) fue superior 13 y 7 veces a los controles negativos dl  $\Delta$ EMCV y dl HCV 266/268 respectivamente (Figura. 3 B).

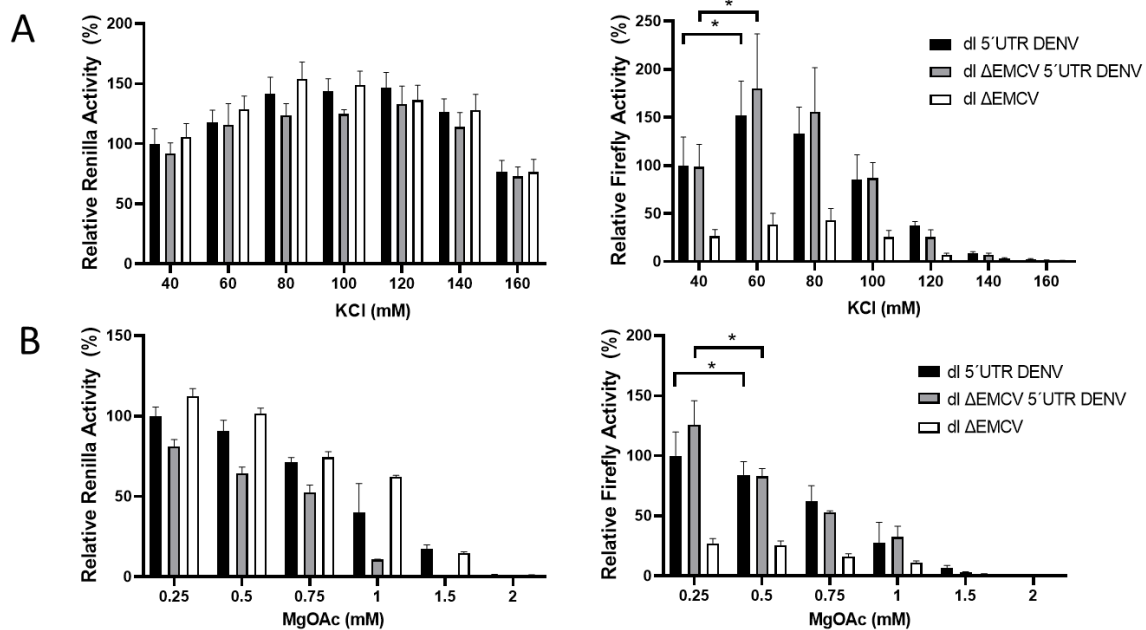
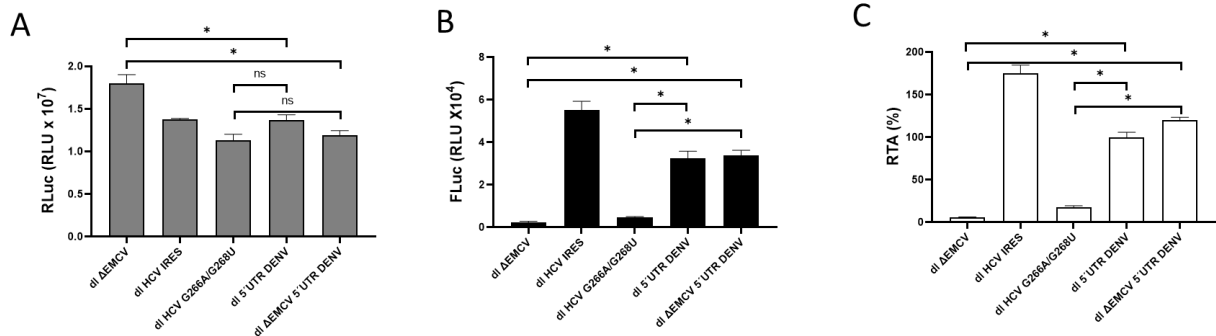


Figura 2. Impacto de sales de potasio (KCl) y magnesio (MgOAc) en la actividad IRES de DENV *in vitro*. Los mRNAs bicistrónicos (dl 5UTR DENV, barras negras), (dl ΔEMCV 5UTR DENV, barras grises) y (dl ΔEMCV barras blancas) fueron traducidos *in vitro* en presencia de distintas concentraciones finales de KCl (A) o MgOAc (B). La actividad enzimática obtenida para RLuc y FLuc en condiciones basales de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$ , y en presencia del RNA bicistrónico dl 5UTR DENV fue llevada arbitrariamente a 1. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un t-test (\* $P < 0.05$ ).

La relación FLuc/RLuc (RTA; Actividad traduccional relativa) fue representada relativo al dl 5UTR DENV (100%) (Figura 3 C). Los valores de RTA del dl 5UTR DENV fueron superiores a los controles negativos, dl ΔEMCV en 95% y al dl HCV 266/268 en 82%. La traducción del HCV IRES resultó ser superior a la del DENV IRES en un 77%. La actividad traduccional del dl 5UTR DENV y dl ΔEMCV 5UTR DENV fueron similares entre sí, esto descarta que la actividad IRES de DENV se explique por un proceso de *read-through*

(Figura 3 C). Por tanto, estos resultados en conjunto permiten concluir que en efecto la región 5'UTR del mRNA de DENV posee un IRES que es funcional *in vitro*, de aquí en adelante DENV IRES.



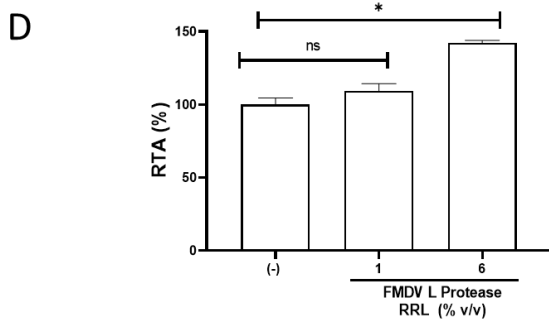
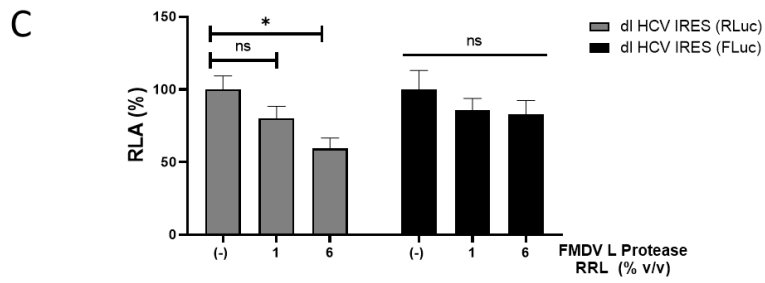
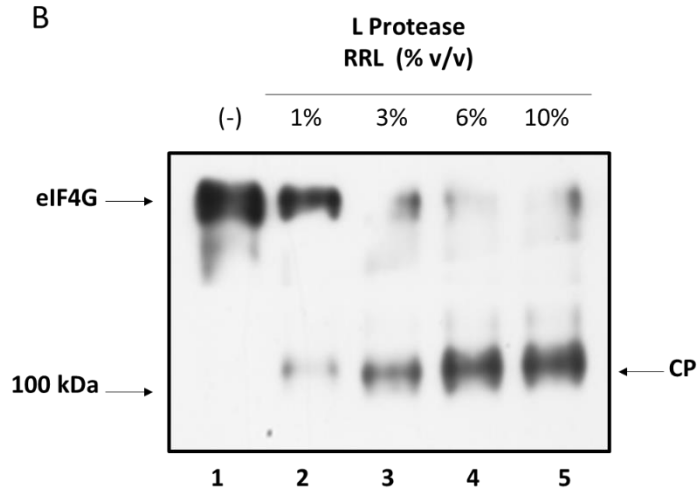
**Figura 3.** La región 5'UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES *in vitro*. Actividad en unidades relativas de luz (RLU) de los cistrones RLuc (A) y FLuc (B) respectivamente. C) Índice de Actividad Traduccional Relativa, RTA, expresado relativo a la actividad del dl 5UTR DENV. Cada RNA fue traducido en RRL en condiciones de sales óptimas para cada elemento IRES por 90 min a 30°C. Posteriormente se determinó la actividad enzimática de las proteínas reporteras RLuc y FLuc. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido de una comparación múltiple por una prueba de Tukey (\* $P < 0.05$ ).

### El DENV IRES es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa L de FMDV.

Con la finalidad de validar aún más los resultados obtenidos, se decidió evaluar el efecto de la proteólisis de eIF4G sobre la actividad del DENV IRES en RRL. La proteasa L de FMDV proteoliza eIF4G inhibiendo la traducción cap-dependiente pero no la IRES dependiente

(73). La proteasa L fue sintetizada *in vitro* y utilizada para tratar el RRL a un volumen final de 1 y 6% (v/v) según protocolos descritos anteriormente (63). Como control en estos ensayos se utilizó el RNA dl HCV IRES (Figura 4 C y D). El RRL tratado con la proteasa fue luego incubado con el RNA bicistrónico dl 5UTR DENV (Figura 4 E y F). La proteólisis del factor eIF4G fue monitoreada mediante ensayos de Western blot, utilizando un anticuerpo contra eIF4G (Figura 4 B). La actividad de RLuc y FLuc fue expresada en porcentajes con respecto a la condición ausente de proteasa L, la cual fue llevada arbitrariamente a 100%. Se observa que el corte de 4G produce una disminución en la traducción cap-dependiente (RLuc, barras grises), mientras que la actividad IRES de HCV y DENV no es afectada (FLuc, barras negras). Los resultados también se graficaron en forma de RTA, donde los valores de RTA en ausencia de la proteasa L se tomaron como 100%. Para el IRES de HCV observamos un incremento de actividad de ~10% (1 % v/v) y ~43% (6% v/v), mientras que la actividad IRES de DENV se vio estimulada en ~52% (1% v/v) y ~124% (6% v/v) (Figura 4 D y F). En conjunto, estos resultados validan que la región 5'UTR de DENV puede iniciar la traducción de forma IRES-dependiente *in vitro*, independiente de la interacción eIF4E-eIF4G. Además, los resultados indican que la actividad IRES de DENV incrementa cuando la traducción cap-dependiente es inhibida por la proteasa L.





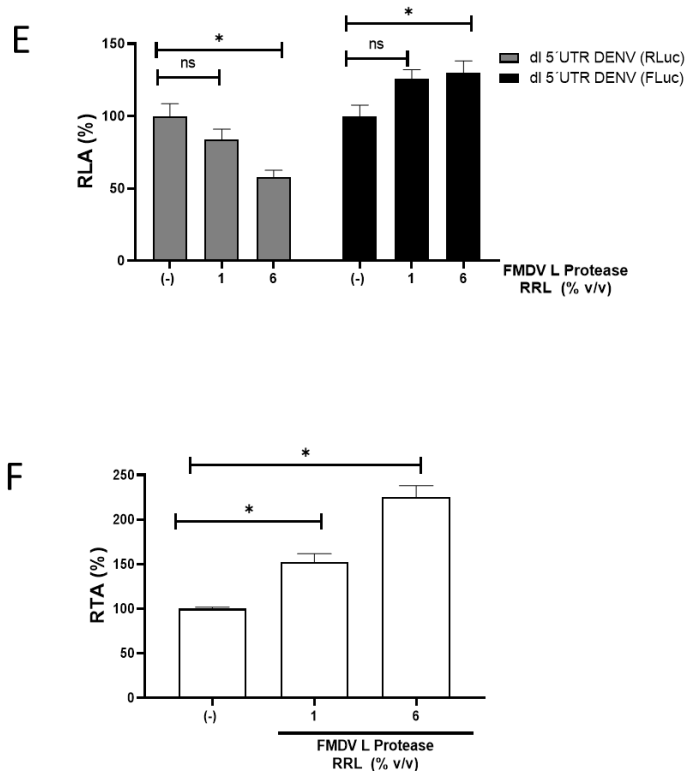


Figura 4. La traducción IRES dependiente del mRNA de DENV 2 es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa L de FMDV en RRL. A) Representación esquemática de los mRNAs reporteros empleados en los ensayos de traducción in vitro. B) Representación del producto de corte de eIF4G mediante western blot. C) Efecto del corte de eIF4G sobre RLuc y FLuc en el mRNA dl HCV IRES. D) RTA del dl HCV en IRES en concentraciones crecientes del tratamiento con la proteasa L. E) Efecto del corte de eIF4G sobre RLuc y FLuc en el mRNA dl 5UTR DENV IRES. F) RTA del dl 5UTR DENV IRES en concentraciones crecientes del tratamiento con la proteasa L. Los resultados de RLuc y FLuc se presentan en RLA, donde la ausencia de proteasa L se llevó arbitrariamente a 100%. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado. EL análisis estadístico se llevó a cabo mediante un ANOVA seguido de una comparación múltiple de Dunnett.

### **La actividad IRES de DENV es sensible a Edeína.**

Una vez que se establece el funcionamiento del DENV IRES *in vitro* nos preguntamos la forma en la que este elemento recluta la subunidad 40S. Algunos elementos IRES, como por ejemplo el elemento IRES de PV, reclutan la subunidad ribosomal 40S río arriba del codón de inicio seguido del proceso de *scanning*, mientras que otros, como por ejemplo el IRES de HCV, lo hacen directamente sobre el codón de inicio sin requerir *scanning* (62)(63).

Basados en estos antecedentes, se evaluó si el DENV IRES recluta la subunidad 40S sobre o río arriba del codón de inicio. Para realizar el ensayo, se utilizó RRL suplementado con distintas concentraciones de edeína, un antibiótico oligopeptídico que es capaz de inhibir el reconocimiento del codón de inicio por parte de las subunidades 40S ribosomales que se encuentran realizando *scanning* (74).

Para validar nuestro sistema experimental, los RNAs bicistrónicos sintetizados *in vitro*, dl PV IRES y dl HCV IRES fueron traducidos *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de edeína (0.06-0.5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5 A y B). Se observa que a medida que se incrementa la concentración de edeína, la traducción cap-dependiente disminuye (Fig. 5). Para el RNA dl PV IRES la traducción del segundo cistrón, también es inhibida lo cual es consistente con el mecanismo de reclutamiento por *scanning* de la subunidad 40S ribosomal utilizado por el IRES de PV (Figura 5B). Cuando se utilizó el RNA dl HCV IRES, no se observa una inhibición en la traducción de la proteína reportera FLuc a las concentraciones de 0.06-0.25  $\mu\text{M}$  de edeína (Figura 5A), lo cual es consistente con el mecanismo de reclutamiento directo de la subunidad 40S ribosomal utilizado por el IRES

de HCV. Sin embargo, se observa que a altas concentraciones de edeína (0,5  $\mu\text{M}$ ) se produce una inhibición en la traducción del segundo cistrón, lo cual está en acuerdo a observaciones que indican que a esta concentración, la droga inhibe la etapa de elongación de la síntesis de proteínas (75). Al evaluar el efecto de edeína sobre la actividad del DENV IRES, observamos que en presencia de la droga se produce una inhibición en la actividad FLuc a partir de 0,06  $\mu\text{M}$  de Edeína (Figura 5C). Estos resultados sugieren que la subunidad ribosomal 40S es reclutada río arriba del codón de inicio y que requiere del proceso de *scanning*.

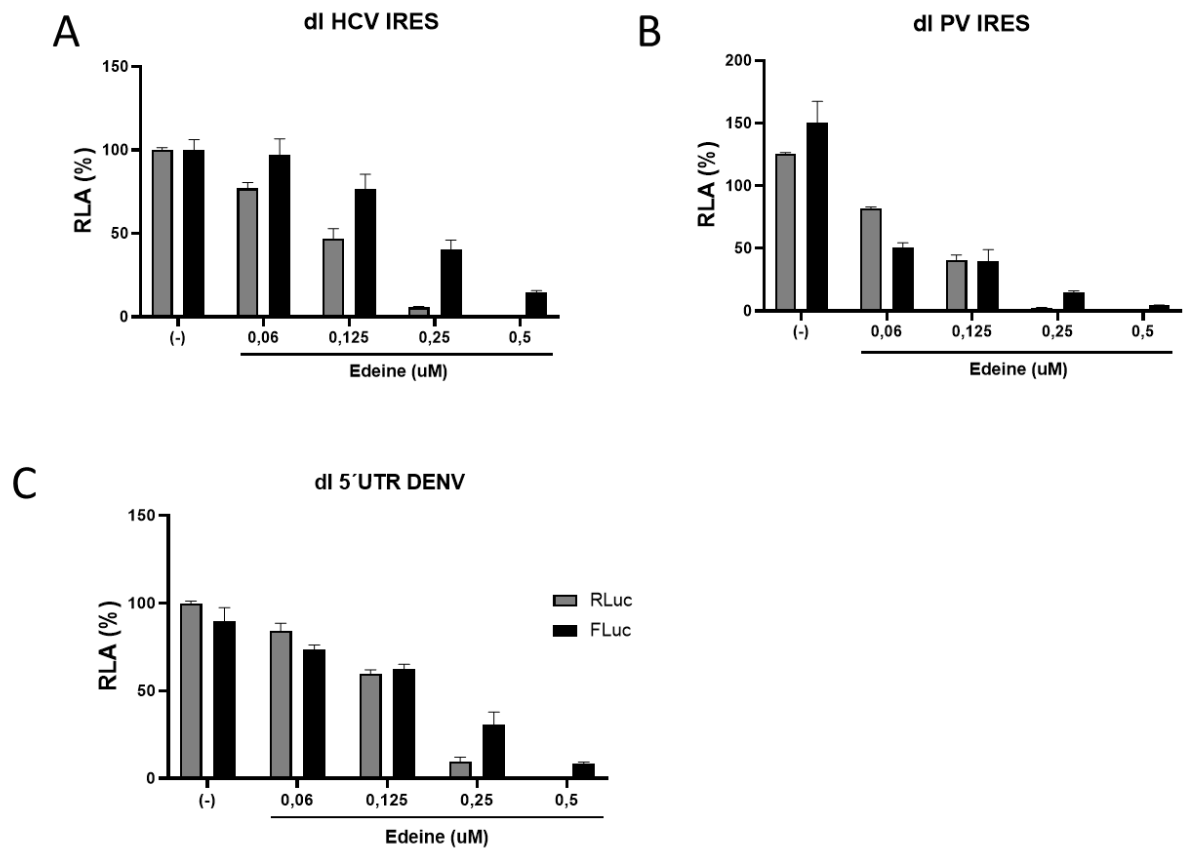


Figura 5. La actividad IRES de DENV es sensible a Edeína. Los RNAs bicistrónicos dl HCV IRES (A); dl PV IRES (B) y dl 5UTR DENV(C) fueron traducidos in vitro (RRL) en ausencia o

*presencia de concentraciones crecientes de Edeína (0.06, 0.125, 0.25 y 0.5  $\mu$ M). La actividad de RLuc y FLuc fueron graficadas en RLA y relativas a las obtenidas en ausencia del antibiótico Edeína, la cual fue llevada arbitrariamente a 1 para cada dl RNA. El gráfico es el resultado de 3 experimentos independientes.*

### **El mRNA de DENV posee actividad cap-independiente marginal en células BHK 21 y Vero E6**

Habiendo validado la actividad del IRES en RRL se procedió a evaluar la actividad del IRES de DENV en experimentos de transfección en líneas celulares eucariontes. Para esto, células Vero E6 y BHK 21 fueron transfectadas con los mRNAs monocistrónicos reporteros de Globina con una estructura cap o una estructura Acap, los mRNA reporteros de DENV con cap o Acap en conjunto con el normalizador de transfección Pci Renilla (Figura 6A). Posterior a la transfección (4h) las células fueron lisadas para determinar las actividades de RLuc y FLuc, además, en paralelo se realizó la cuantificación relativa de RNA por RT-PCR. Los resultados fueron expresados en RLA normalizado por los niveles de RNA.

En las células Vero E6 al reemplazar el cap por Acap (mRNA de Globina) lleva a una disminución de la actividad traduccional de un 99%; permitiendo validar el modelo experimental y la utilización del Acap.

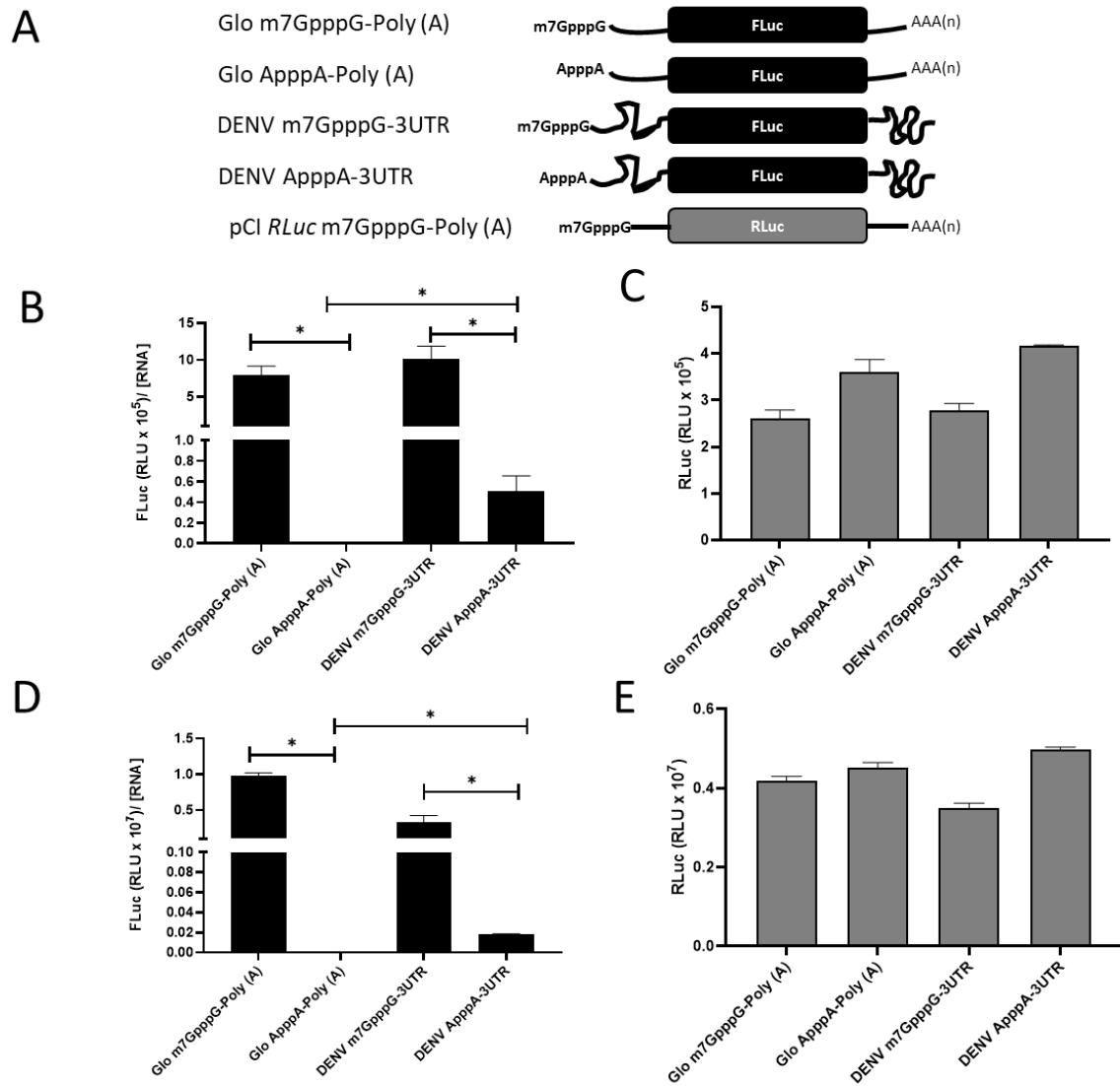


Figura 6. En células BHK 21 y Vero E6 el mRNA de DENV presenta actividad marginal cap-independiente A) Representación esquemática de los mRNA reporteros empleados en el estudio. B, D) Actividad traduccional de los mRNAs de Globina y Dengue, con Cap y Acap en células Vero y BHK 21 respectivamente. C, E) Actividad traduccional del mRNA Pci Renilla en células Vero y BHK 21 respectivamente. 0.5 pmoles de RNA se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000. Luego de 4 horas post transfección, las células fueron lisadas y se procedió a medir la actividad enzimática de FLuc y RLuc. Los datos corresponden al promedio (+/- SEM) de 3 repeticiones independientes, cada una por duplicado. EL análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de t test.

Para el caso del mRNA de DENV ApppA\_3UTR se obtuvo una reducción del 95% de actividad respecto al mRNA reportero con Cap (Figura 6B). En las células BHK 21, los resultados fueron similar a los obtenidos en Vero E6. Para el mRNA de Globina se obtuvo una reducción del 99% de actividad FLuc en el reportero con Acap, mientras que en el caso de DENV también se observó una reducción del 94% de la actividad traduccional (Figura 6 C). En todas las condiciones evaluadas y en ambas líneas celulares, no se obtuvieron variaciones en el control Pci Renilla, lo que indica que las diferencias de actividad FLuc no pueden ser explicadas por distintas eficiencias de transfección (Figura 6 C y E). Los resultados de este ensayo difieren a los obtenidos en los experimentos en RRL en los cuales la región 5'UTR del mRNA de DENV es capaz de sustentar el inicio de la traducción de manera cap-independiente (Fig. 1B). A pesar de que el 5% de actividad del mRNA DENV ApppA\_3'UTR es considerablemente mayor a la actividad del mRNA Glo ApppA\_Poly(A) (control negativo) en ambas líneas celulares, la actividad del DENV IRES es marginal en un contexto monocistrónico.

#### **La región 5'UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES marginal en células de mamíferos.**

Como aproximación alternativa se decidió evaluar la actividad IRES potencial de la región 5'UTR del mRNA de DENV2 en un contexto bicistrónico en células de mamíferos. Con este fin se transfectaron los RNAs bicistrónicos dl HCV 266/268 como control negativo, dl HCV IRES como control positivo y dl 5UTR DENV en diferentes líneas celulares. Las líneas celulares fueron seleccionadas puesto que son susceptibles y permisivas a la infección y replicación de DENV (76).

Tabla 1. Actividad relativa de los cistrones FLuc y RLuc en las líneas celulares evaluadas.

Cell Type	IRES	FLuc (RLU)	RLuc (RLU)
<b>Vero</b>	HCV 266/268	1,75E+03	6,07E+06
	HCV	4,50E+04	8,60E+06
	DENV	4,10E+03	5,89E+06
<b>Hek 293T</b>	HCV 266/268	1,17E+04	1,27E+07
	HCV	4,79E+05	1,63E+07
	DENV	3,19E+04	1,31E+07
<b>BHK 21</b>	HCV 266/268	4,65E+03	1,40E+07
	HCV	2,54E+05	1,68E+07
	DENV	1,62E+04	1,42E+07
<b>A549</b>	HCV 266/268	5,17E+02	9,32E+05
	HCV	1,76E+04	1,47E+06
	DENV	1,20E+03	1,07E+06
<b>Jukat</b>	HCV 266/268	1,65E+02	8,60E+04
	HCV	1,19E+03	1,44E+05
	DENV	2,39E+02	1,45E+05
<b>HuH7</b>	HCV 266/268	2,43E+03	8,10E+06
	HCV	7,87E+04	1,07E+07
	DENV	6,58E+03	8,82E+06
<b>HeLa</b>	HCV 266/268	5,02E+03	4,11E+06
	HCV	2,42E+05	6,00E+06
	DENV	1,20E+04	4,40E+06
<b>MDCK</b>	HCV 266/268	6,29E+02	1,16E+06
	HCV	4,84E+03	1,52E+06
	DENV	5,08E+02	9,84E+05
<b>C6/36</b>	HCV 266/268	5,75E+02	2,83E+06
	HCV	9,94E+02	4,53E+06
	DENV	1,14E+03	4,58E+06



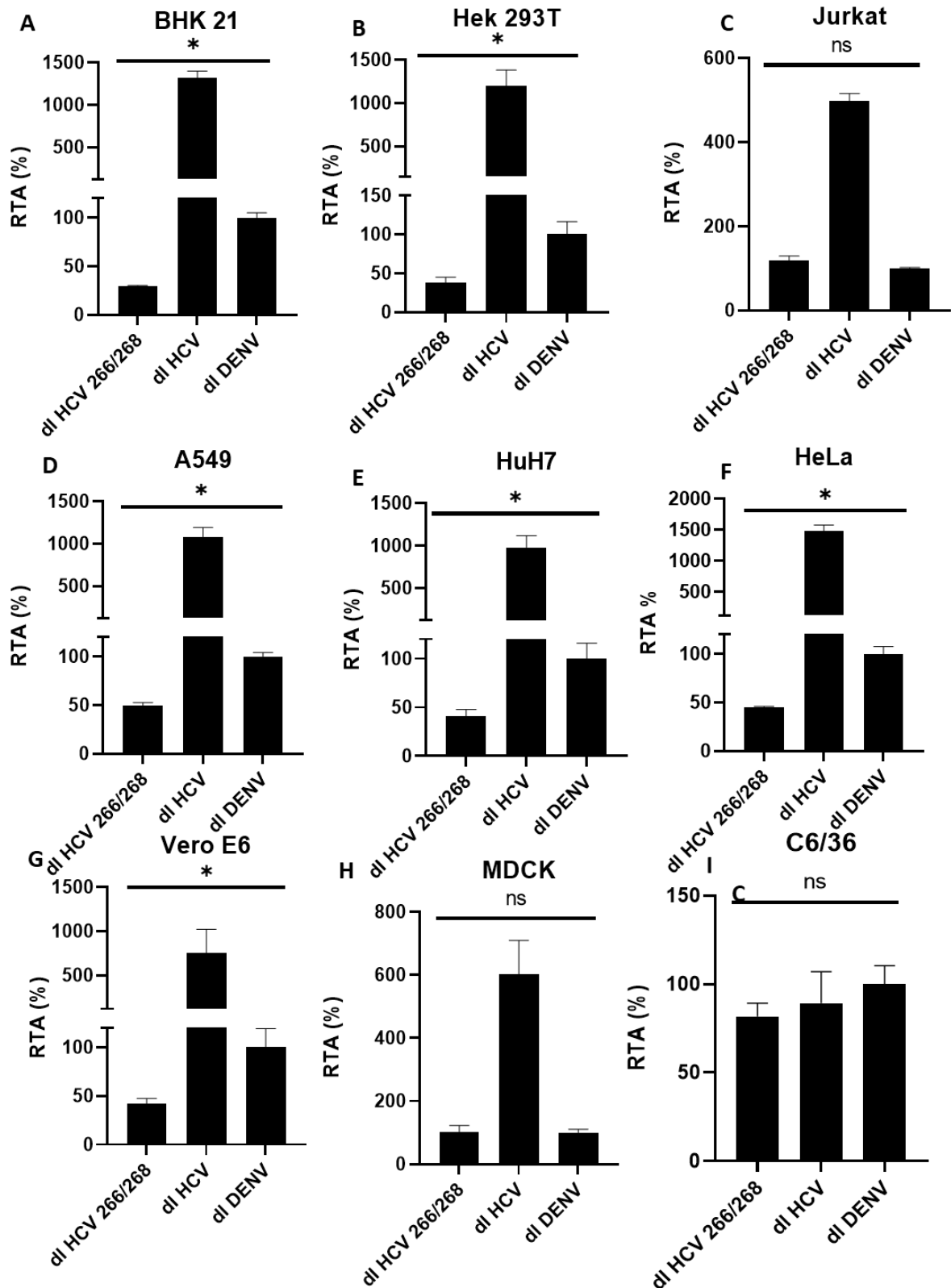


Figura 7. La región 5'UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES marginal en células. Resultados de la relación FLuc/RLuc en términos de actividad traduccional

*relativa (RTA) en diferentes líneas celulares: BHK 21 (A), Hek 293T (B), Jurkat (C), A549 (D), HUH7 (E), HeLa (F), Vero E6 (G), MDCK (H), C6/36 (I). 0.5pmoles de RNA transcrito in vitro se transfectó utilizando Lipofectamina 2000. Luego de 4 horas post transfección, las células fueron lisadas y se procedió a medir la actividad RLuc y FLuc. Los valores de RTA del dl 5UTR DENV fueron llevados de forma arbitraria a 100%. Los datos corresponden al promedio (+/- SEM) de 3 repeticiones independientes, cada una por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un t de student entre la actividad traduccional del dl HCV 266/268 y dl 5UTR DENV.*

Los resultados muestran que la traducción cap-dependiente (RLuc) es similar para todas las construcciones en cada línea celular (Tabla 1). Sin embargo, la actividad FLuc de la construcción dl 5UTR DENV es superior a la del control negativo, según el tipo celular, pero significativamente menor que la traducción mediada por el IRES de HCV en todas las líneas celulares (Tabla 1). Al normalizar los resultados con respecto a la traducción cap-dependiente mediante la razón FLuc/RLuc (RTA) (Figura 7), se observa que la región 5'UTR de DENV es capaz de sustentar la traducción del segundo cistron de forma significativa en comparación al control negativo, solo en algunos tipos celulares como BHK 21 (3,5 veces sobre el control negativo), Hek 293T (3 veces sobre el control negativo), Vero E6 (2,4 veces sobre el control negativo), A549 ( 2 veces sobre el control negativo), HeLa (2.3 veces sobre el control negativo), Huh7 (2,5 veces sobre el control negativo) (Figura 7). No se observó actividad IRES en las líneas Jurkat, MDCK y C6/36 (Figura 7). Este experimento sugiere la presencia de un elemento IRES, de pobre actividad y dependiente del tipo celular, en la región 5'UTR del mensajero de DENV.

## **Los mRNA bicistrónicos de DENV generados a partir de la transfección de plásmidos presentan actividad IRES**

La región 5'UTR del mRNA de DENV presenta actividad IRES (DENV IRES) débil cuando es evaluada en el contexto de mRNAs bicistrónicas. A pesar de ello, se decidió caracterizar en mayor profundidad esta actividad IRES. Sin embargo, la transfección de RNAs resulta compleja, e ineficiente en algunos tipos celulares, lo cual complica la recolección de datos experimentales. Por ello, se decidió continuar los estudios transfectando los DNA plasmidiales que codifican para los mRNAs bicistrónicos  $\Delta$ EMCV y dl 5UTR DENV. Con el fin de establecer si la transfección de los vectores que generan los mRNAs bicistrónicos es un método viable para el estudio del IRES de DENV, estos DNAs "bicistrónicos" se transfecaron en las líneas celulares BHK21, Vero E6 y Hek 293T. Reproduciendo los resultados obtenidos al transfectar RNA, los resultados muestran que la región 5' UTR de DENV presenta actividad IRES marginal pero significativa en comparación al control negativo, en BHK21 (7,6 veces sobre el control negativo) y Vero E6 (9 veces sobre el control negativo) (Figura 8 A y B). Sin embargo, un resultado inesperado de este experimento fue que, a diferencia de los resultados obtenidos en la transfección de mRNA, en las células Hek 293T no se observó actividad IRES alguna cuando el dl 5UTR DENV fue transfecado en forma plasmidial (Figura 8 C).

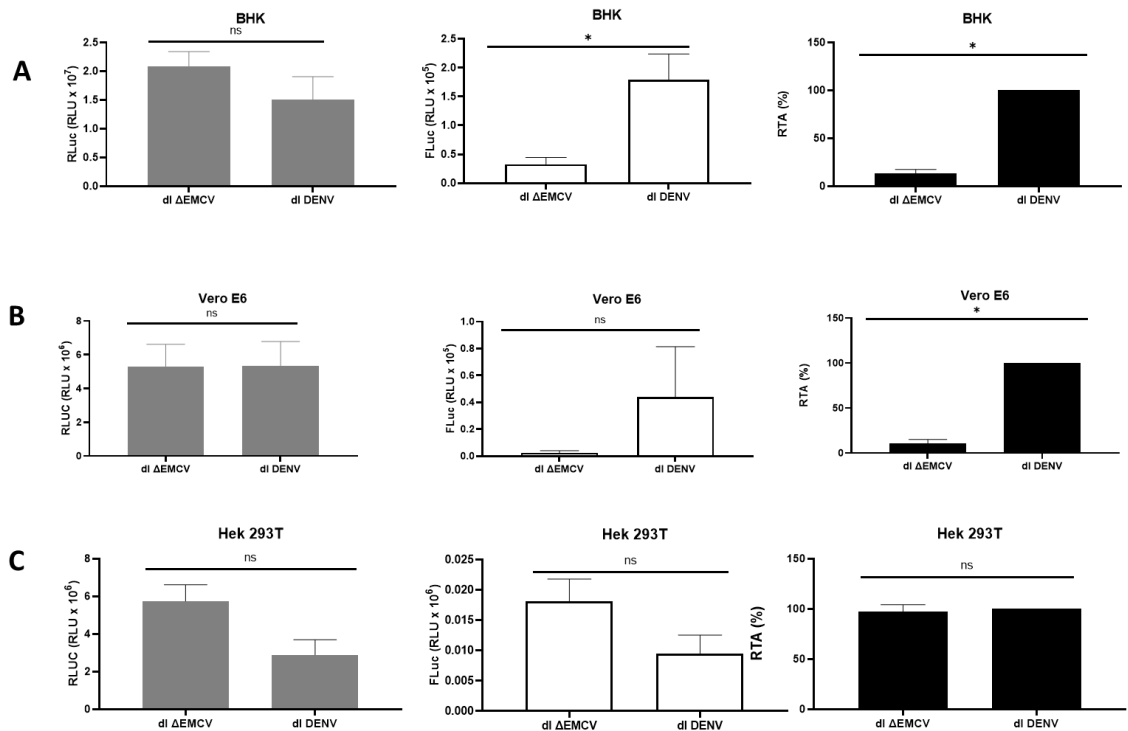


Figura 8. Actividad IRES de la región 5'UTR del mRNA de DENV en transfección de plásmidos que codifican para mRNAs bicistrónicas. Células BHK 21 (A), Vero E6 (B) y Hek 293T (C) fueron transfectadas con 300ng de cada vector dl y adicionalmente con 25 ng del vector normalizador Beta Galactosidasa utilizando PEI como reactivo de transfección. Posterior a 24 horas las células fueron lisadas en Buffer Pasivo y se midió la actividad luciferosa. Las actividades de cada cistrón por separado (RLuc; barras grises y FLuc; barras blancas) se presentan en RLA normalizados por la actividad Beta Gal. En negro se presentan los valores de RTA, donde el RTA del dl 5'UTR DENV se tomó como el 100%. El análisis estadístico se realizó mediante un t de student entre la actividad traduccional del dl ΔEMCV y dl 5'UTR DENV. Cada figura corresponde a tres experimentos diferentes, cada uno conducido por duplicado.

**La actividad FLuc mediada por la región 5'UTR del mRNA de DENV no se explica por la presencia de un promotor críptico o por la generación de variantes de splicing**

Un problema reconocido con el uso de DNAs que codifican para un mRNA bicistrónico en la caracterización de IRESs es la generación de un mRNA monocistrónico con cap y poly(A) que codifica para FLuc debido a la presencia de un promotor críptico en la región intercistronica o bien asociado a un proceso de splicing alternativo (43). Con el fin de establecer si la actividad traduccional medida por la región 5'UTR del mRNA de DENV podría corresponder a un artefacto del sistema, se decidió evaluar la presencia de un promotor críptico en los vectores utilizados. Para esto se generaron las mismas construcciones evaluadas anteriormente, pero con la delección del promotor SV40, las cuales se denominaron  $\Delta$ SV40 (Figura 9 A). Los resultados evidencian que en las células VERO existe un 8% de actividad de promotor críptico (Figura 9 C), mientras que en BHK 21 no se observó esta actividad (Figura 9 B). Con estos resultados podemos concluir que la actividad FLuc observada en estas líneas celulares no se debe a la generación de un mRNA monocistrónico con cap y poly (A) debido a la presencia de un promotor críptico en el DNA utilizado en los ensayos.

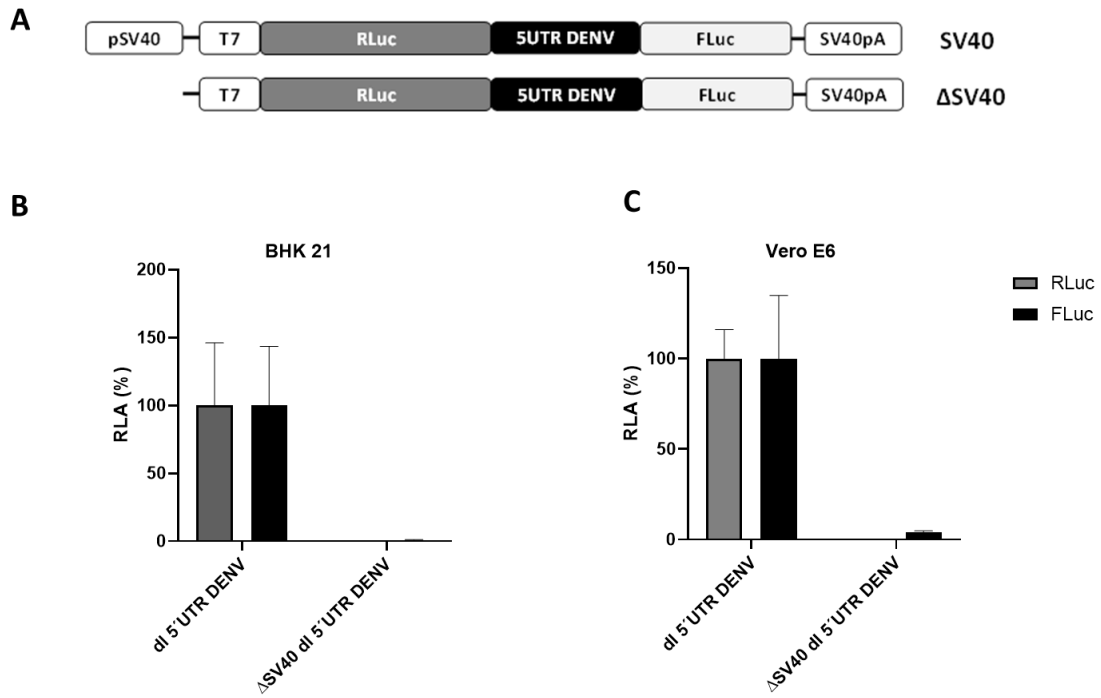
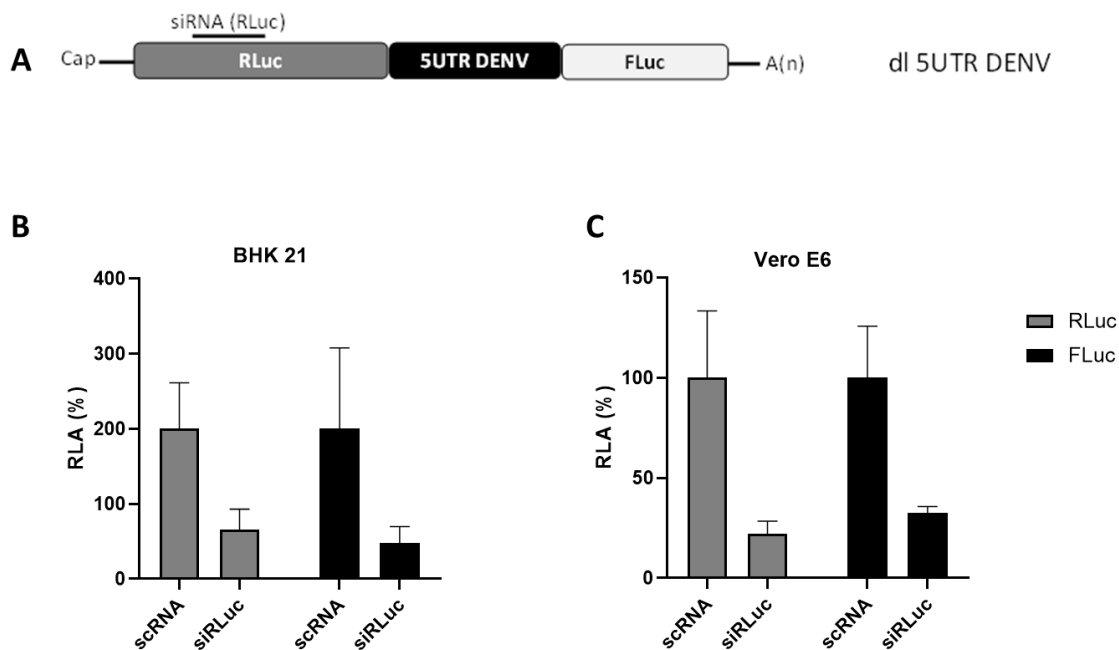


Figura 9. La región 5'UTR de DENV no presenta actividad de promotor críptico. A) Representación de los vectores usados para evaluar actividad de promotor críptico. El vector dl 5'UTR DV con o sin promotor SV40, fue transfectado en células BHK21 (B) y VERO (C). Las actividades de RLuc y FLuc fueron determinadas 24 h postransfección. La actividad enzimática de RLuc y FLuc fue expresada de forma relativa respecto al vector que contiene el promotor SV40. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado.



*Figura 10. La actividad IRES de DENV en células no puede ser explicada por la generación de variantes de splicing. A) representación esquemática de los vectores usados para evaluar variantes de splicing. El vector dl 5UTR DENV fue transfectado en presencia de un siRNA contra RLuc en células BHK21 (B) y VERO E6 (C). A las 24 Hrs post transfección se determinó la actividad enzimática de las proteínas reporteras. Los resultados fueron expresados en RLA. Las actividades de RLuc y FLuc fueron llevadas arbitrariamente a 100% en presencia del siRNA control random (-). El gráfico es el resultado de 3 experimentos independientes realizados en duplicado.*

Para evaluar la posible generación de mRNAs monocistrónicas que codifican para FLuc mediante un proceso de splicing alternativo, el vector dl 5UTR DENV fue co-transfectado con un siRNA específico para la región codificante de RLuc (Figura 10A). Como control negativo se utilizó un siRNA no relevante. Los resultados evidencian que al silenciar el mRNA en la región codificante para RLuc se observa una disminución equivalente en la actividad de ambos reporteros, RLuc y FLuc, en las líneas celulares evaluadas (Figura 10

B y C). Estos resultados sugieren que RLuc y FLuc están siendo generados a partir del mismo transcrito, por lo tanto, descartamos la generación de mRNAs monocistrónicos cap/poly(A) que codifiquen para FLuc a partir del vector dl 5UTR DENV. Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión de FLuc en nuestro sistema ocurre exclusivamente a partir del mRNA bicistrónico, sugiriendo la presencia del DENV IRES.

**La traducción IRES dependiente del mRNA de DENV 2 es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa 2A de Rhinovirus en células.**

Hasta ahora los resultados sugieren que la actividad del IRES de la región 5'UTR del mRNA de DENV solo sería funcional en RRL o en un contexto bicistrónico para sólo en algunas líneas celulares. Estos resultados son difíciles de interpretar y cuestionan la existencia de un IRES en el mRNA de DENV. Considerando resultados obtenidos con otros IRESs virales débiles, como el IRES presente en la región 5'UTR de los mRNAs de virus de la inmunodeficiencia felina o del de virus de la inmunodeficiencia humana los cuales sólo se activan en condiciones de inactivan la traducción cap-dependiente (77)(78), se decidió evaluar la actividad traduccional mediada por la región 5'UTR de DENV cuando la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida. Para esto se determinó la actividad traduccional de la región 5'UTR del mRNA de DENV cuando eIF4G se encuentra proteolizada por la proteasa 2A de Rhinovirus (79)(73). Con este fin, células BHK21 fueron transfectadas con el vector dl 5UTR DENV junto a plásmidos que codifican para la proteasa 2A de Rhinovirus (*wild type*; 2AP Wt) o bien una mutante inactiva de la proteasa (2AP mut)(80). Como control de traducción cap-dependiente se empleó el vector PCI Renilla (PCI RLuc) (Figura 11 A), el cual codifica para RLuc. El corte proteolítico de eIF4G se evidenció mediante western blot en presencia de la proteasa 2AWT y no así



en el caso de 2A mut (Fig. 11 B). En acuerdo con el efecto de la proteasa de Rhinovirus, la actividad RLuc del control PCI RLuc disminuyó en presencia de 2AWT (Figura 11 C), así también, disminuyó la actividad RLuc obtenida a partir del dl 5UTR DENV (Figura 11D). Sin embargo, para el caso del segundo cistrón, FLuc, que da cuenta de la actividad IRES, se observó un incremento de la actividad FLuc en presencia de la proteasa 2AWT comparada con la proteasa 2Amut (Figura 11 E). Inesperadamente se observó que en presencia de 2AWT la actividad FLuc mediada por la región 5'UTR de DENV aumenta 46,5 veces (Figura 11 E), obteniéndose una estimulación de este IRES.

Los resultados anteriores sugieren que en condiciones donde la traducción cap-dependiente se ve disminuida, la región 5'UTR del mRNA de DENV es capaz de sustentar la traducción mediante un IRES. Teniendo en cuenta estos resultados nos preguntamos qué sucedía con la traducción mediada por la región 5'UTR del mRNA de DENV, en el contexto de células HEK 293T donde el IRES no es funcional, en presencia de la proteasa 2A de Rhinovirus (Figura 12 G). En acuerdo con los resultados anteriores observamos el corte de eIF4G (Figura 11 B), así como la disminución de la actividad cap-dependiente (Figura 12 C, D). Al inhibir la traducción cap-dependiente en células HEK-293T se observa un incremento/activación de la actividad de FLuc, el indicador de actividad IRES, a partir del vector dl 5UTR DENV (Figura 12 E). En presencia de 2A mut la región 5'UTR del mRNA de DENV no presentó actividad IRES (Figura 12 E). Estos resultados sugieren que en células HEK 293T cuando la traducción cap-dependiente es inhibida, la traducción IRES-dependiente de la región 5'UTR del mRNA de DENV se ve estimulada, pasando de un estado "inactivo" a un estado "activo".

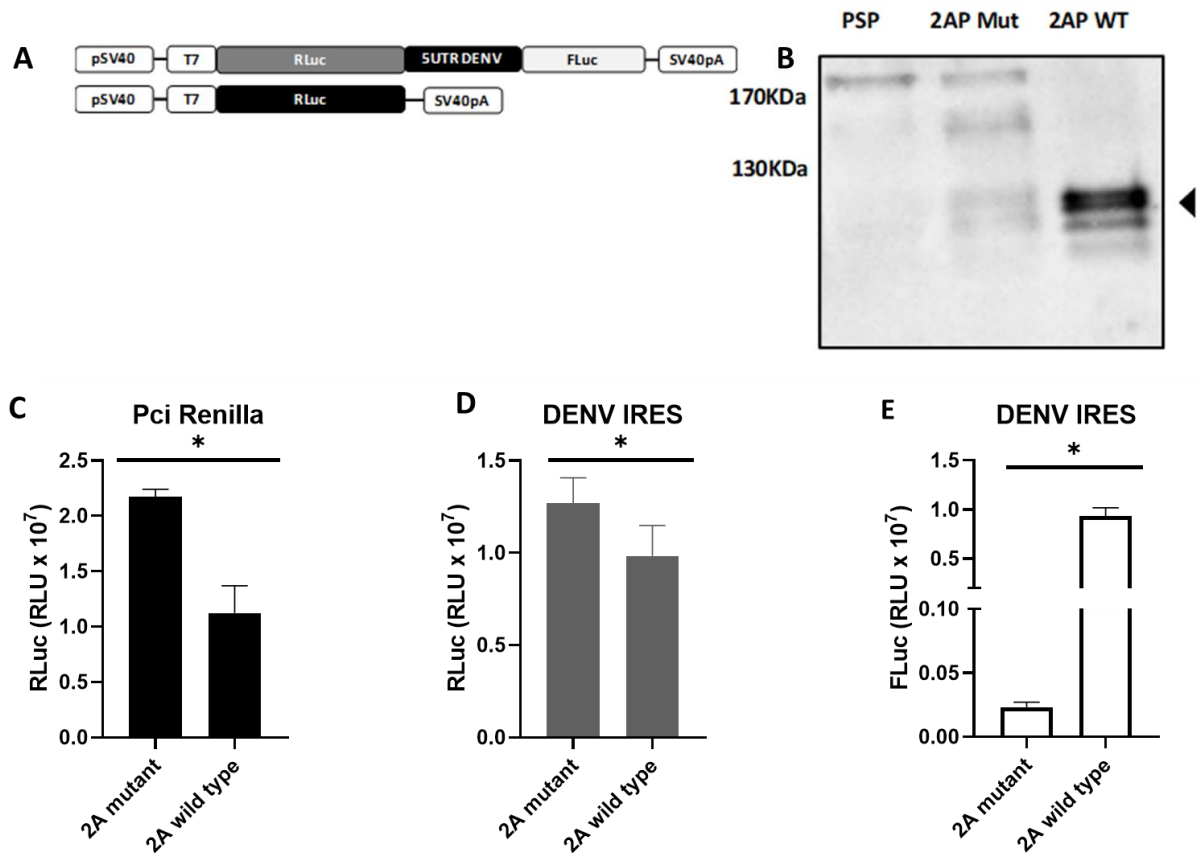


Figura 11. La traducción IRES dependiente del mRNA de DENV 2 es resistente al corte de eIF4G producido por la proteasa 2A de Rinovirus. A) Representación esquemática de los vectores reporteros que fueron co-transfectados en BHK21 con la proteasa 2A Wild type (2AP WT) o la versión mutante (2AP Mut). B) Representación del producto de corte de eIF4G mediante western blot. C) Efecto del corte de eIF4G sobre la traducción cap-dependiente (vector PCI RENILLA). D y E) Efecto del corte de eIF4G sobre del vector dl 5UTR DV. Se presentan los resultados de RLuc y FLuc en RLU. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t test.

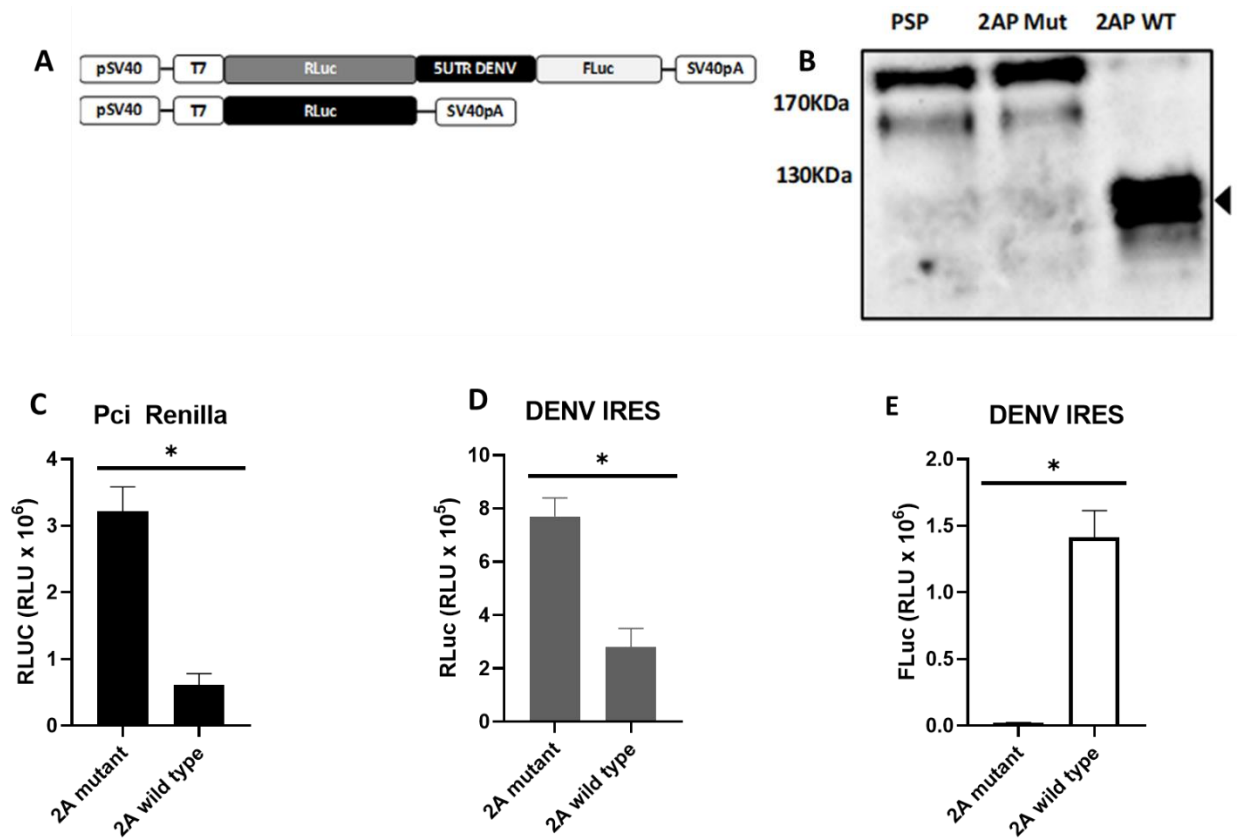


Figura 12. La traducción IRES dependiente del mRNA de DENV 2 es estimulada por el corte de eIF4G producido por la proteasa 2A de Rinovirus. A) Representación esquemática de los vectores reporteros que fueron co-transfectados en HEK 293T con la proteasa 2A Wild type o la versión mutante. B) Representación del producto de corte de eIF4G mediante western blot. C) Efecto del corte de eIF4G sobre la traducción cap-dependiente (vector PCI RENILLA). D y E) Efecto del corte de eIF4G sobre la traducción del dl 5'UTR DV. Se presentan los resultados de RLuc y FLuc de forma independiente en RLU. El gráfico es el resultado de 3 repeticiones independientes, cada una de ellas realizadas en duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t test.

## **Objetivo 2**

**Determinar el efecto de PTB1, PTB2 y PTB4 como ITAF del IRES presente en el mRNA de DENV.**

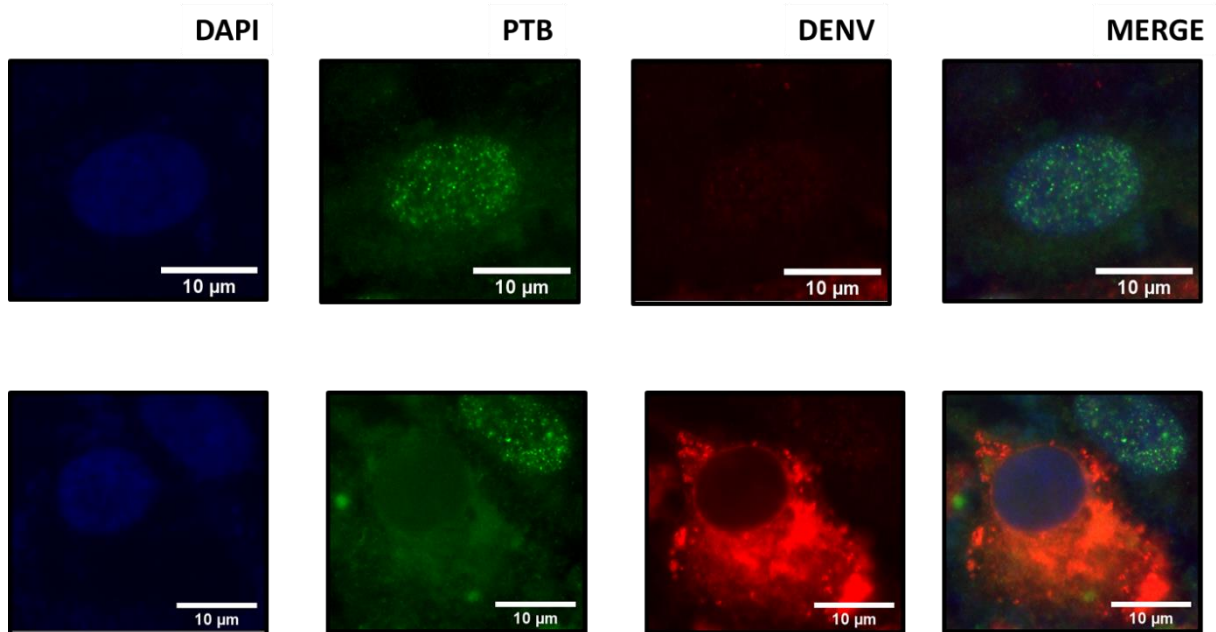
Los resultados del objetivo 1 validan la existencia de un elemento IRES en la región 5'UTR del mRNA de DENV el cual es predominantemente funcional en células cuando la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida. En este punto se decidió evaluar si la actividad del DENV IRES requiere de factores trans-activadores de IRES (ITAFs). Considerando que PTB (polypyrimidine tract-binding protein) es una proteína celular que actúa como ITAF para múltiples IRESs virales (41) y que además ha sido descrita como necesaria para el ciclo replicativo de DENV, se decidió evaluar el rol de PTB en la traducción IRES-dependiente de DENV (52).

Para caracterizar el efecto de PTB y sus tres isoformas sobre el inicio de la traducción del mRNA de DENV se emplearon los vectores que codifican para estas proteínas con un "tag" de histidina o Flag que han sido previamente descritos en nuestro laboratorio (58).

**La infección por DENV 2 New Guinea C produce cambios en la localización celular de PTB.**

Como la traducción es un proceso citoplasmático y PTB es de localización preferentemente nuclear en condiciones de homeostasis (81); se decidió analizar la localización de PTB endógeno en células A549 en condiciones de infección con DENV2. En la figura 13 panel superior se puede observar que la localización de PTB en células no infectadas es fundamentalmente nuclear. Mientras que, en el panel inferior, en presencia del virus (determinación por la proteína de cápside) se observa un cambio de PTB desde el núcleo hasta el citoplasma. Estos resultados sugieren que la infección por

DENV2 NGC afecta la localización celular de PTB, lo cual es coherente con la función de PTB en la traducción del mRNA viral propuesta en este trabajo.

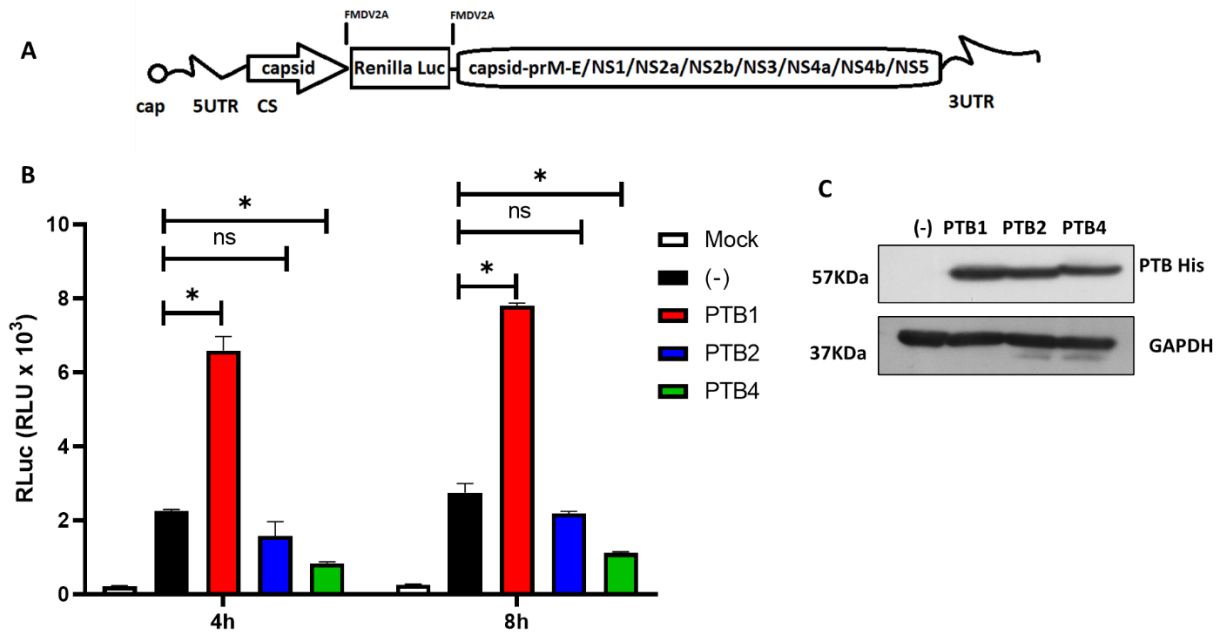


*Figura 13. La infección por DENV 2 New Guinea C produce cambios en la localización celular de PTB en células A549. El panel superior muestra las células que no fueron infectadas por DENV2 NGC, donde el núcleo (columna 1) se observa de color azul, PTB (columna 2) de color verde y el marcador de infección viral (Cápside) (columna 3) en rojo. En el panel inferior se muestran los mismos canales, pero en presencia de la infección por DENV2 NGC. Las cuartas columnas muestran el merge de los tres canales.*

***Las isoformas de PTB tienen un impacto en la traducción del mRNA de un reportero de Denguevirus***

Con el fin de establecer al posible rol de las PTBs sobre la traducción en el contexto de la replicación viral, se decidió evaluar el impacto de estas proteínas sobre la actividad de un clon infeccioso de virus reportero de DENV2 (figura 14 A). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Virología Molecular, de la Fundación

Instituto Leloir, BA, Argentina, bajo la dirección de la Dra. Andrea Gamarnik donde se realizó una estadía Doctoral. Como se conoce que la traducción del mRNA ocurre entre las 4 y 8h posterior a la infección (64), decidimos evaluar el efecto de PTB en estos tiempos. Para esto, las células Hek 293T fueron transfectadas con los plásmidos que codifican las PTBs, con PSP64 como control de transfección y se incluyó una condición de vehículo de transfección como condición “mock”, es decir ausencia de proteínas o RNA viral. 24h posterior a la transfección, fue transfectado el mRNA viral reportero. Este mRNA tiene una inserción de RLuc en el ORF viral (figura 14 A), sin embargo al codificar todas las proteínas virales es capaz de replicar y formar partículas infectivas (64)(82). La sobre expresión de las isoformas de PTB con tag de histidina fue monitoreada mediante western blot (figura 14 C). Los resultados de este experimento muestran que la transfección del mRNA reportero es capaz de producir RLuc en rangos superiores a los niveles basales obtenidos en la condición mock, permitiendo validar la actividad del reportero (figura 14 A). Tanto a las 4h como a las 8h posterior a la transfección se observa un incremento significativo en la síntesis de RLuc promovida por PTB1 (figura 14 A, barras negras vs barras rojas). La isoforma PTB2 no produjo cambios en la traducción del reportero viral respecto al control (figura 14 A, barras negras vs barras azules), mientras que PTB4 produjo una disminución en la síntesis de RLuc (figura 14 A, barras negras vs barras verdes). Estos resultados sugieren que las isoformas de PTB tienen un efecto diferencial sobre la traducción del mRNA de DENV en un contexto biológico. Siendo PTB1 un modulador positivo y PTB4 un modulador negativo.



**Figura 14. Las isoformas de PTB impactan diferencialmente la traducción de un clon infeccioso reportero de DENV2.** A) Representación esquemática del mRNA de DENV 2 reportero transcrito y capeado *in vitro*. B) Efecto de PTB1, PTB2 y PTB4 sobre la traducción viral a 4 y 8h post-transfección. C) Western blot representativo de la expresión de PTB a las 24h. Células HEK 293T fueron transfectadas con 1 $\mu$ g de cada vector codificante para PTB o PSP64 como control negativo, 24h pos-transfección del DNA, fue transfectado el mRNA viral con Lipofectamina 2000 y se midió la actividad RLuc a las 4 y 8h. La condición mock se refiere a células que fueron tratadas con los vehículos y reactivos de transfección, sin plásmidos o RNA viral. Estos resultados corresponden a dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA, seguido de una comparación múltiple de Tukey.

Las isoformas de PTB impactan la traducción de un mRNA *viral like* de forma diferencial.

Con el fin de validar los resultados obtenidos con el reportero viral y las PTBs, decidimos evaluar el efecto de estas proteínas sobre la traducción de un mRNA *viral like*. Dado que PTB se une a secuencias de polipirimidina, especialmente a secuencias UCUU, CCU y UUC (53). Fue de interés determinar si existen sitios putativos de unión a PTB en la región 5'UTR y 3'UTR del mRNA de DENV. Es así como mediante un análisis de secuencia y estructura encontramos que la región 5'UTR del mRNA presenta 5 sitios putativos de unión a PTB, mientras que la región 3'UTR presenta 9 sitios putativos de unión a esta proteína (Figura 15).

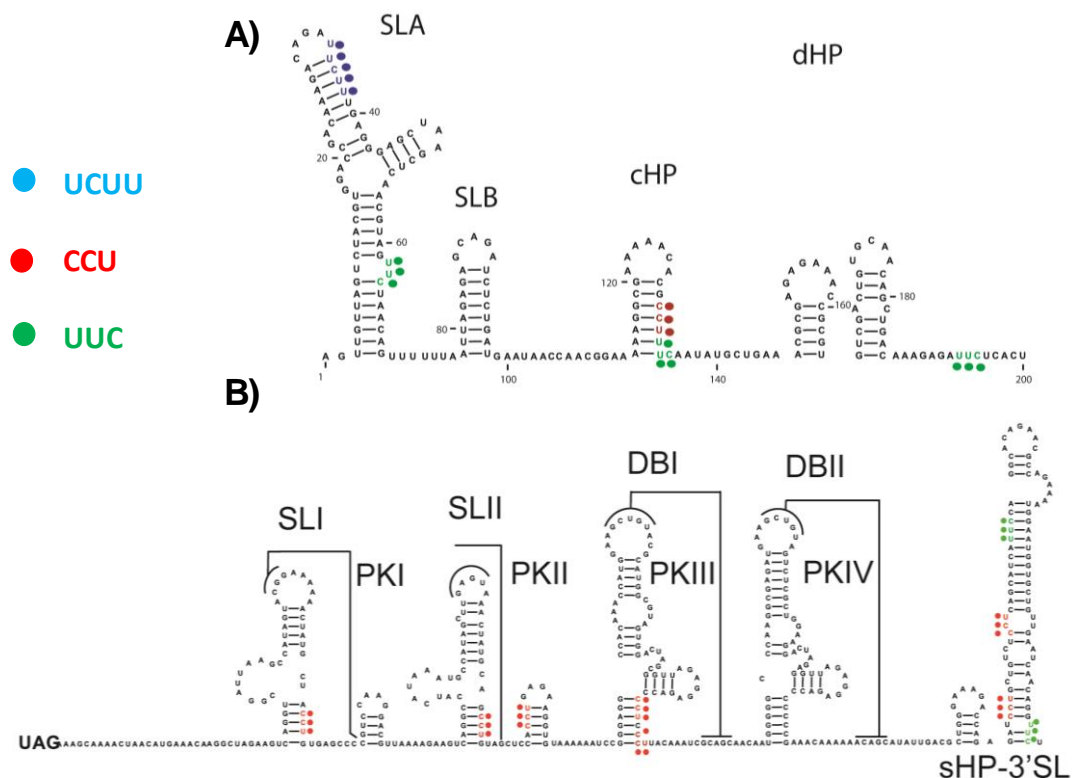
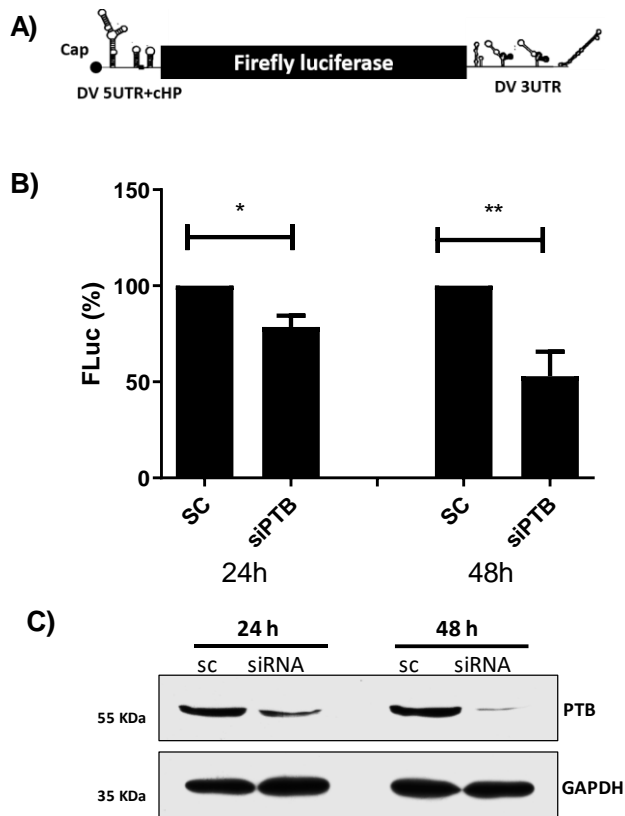


Figura 15. Las regiones 5'UTR y 3'UTR del mRNA de DENV presentan sitios de unión a PTB. A) Estructura de la región 5'UTR. B) Estructura de la región 3'UTR.



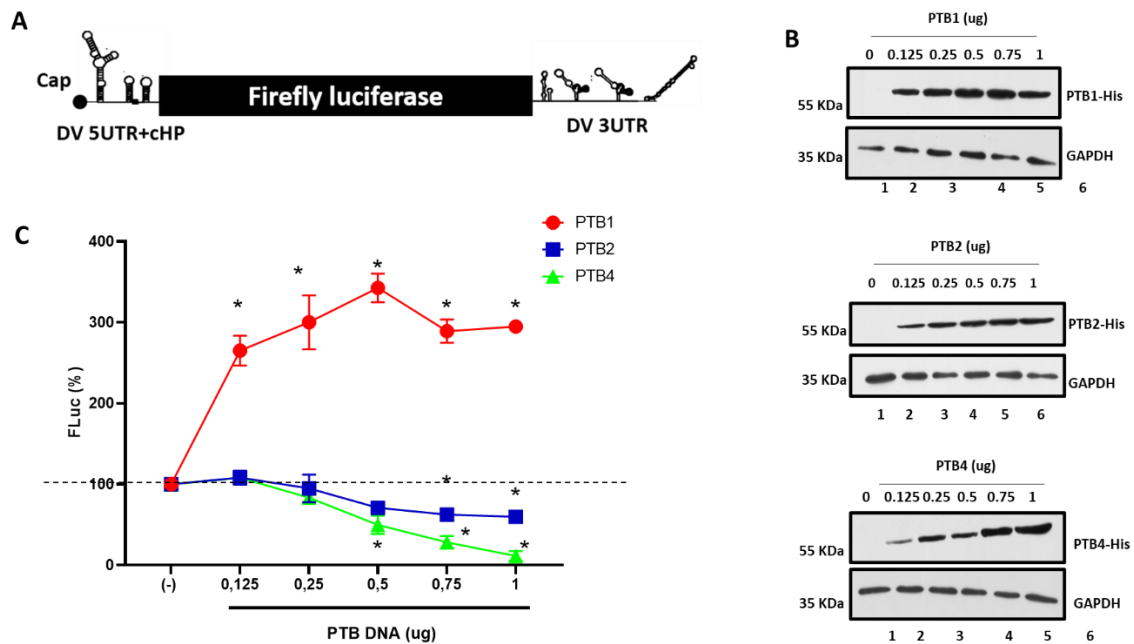
Para determinar el impacto de PTB sobre la traducción del mRNA *viral like* de DENV se procedió al silenciamiento transitorio de PTB endógeno en células HEK 293T. Para este fin, se empleó un reportero *viral like* sintetizado *in vitro* como el descrito en la figura 1 del primer objetivo de esta tesis (Fig. 16 A).



**Figura 16. EL silenciamiento endógeno de PTB en HEK 293T afecta la traducción del mRNA viral like de DENV.** A) Representación esquemática del reportero de DENV. B) Actividad relativa de FLuc a 24 y 48 h post silenciamiento de PTB. C) Western blot para la detección del silenciamiento de PTB a 24 y 48h. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes cada uno conducido por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t test.

El silenciamiento de PTB endógeno fue visualizado mediante western blot (figura 16 C), donde se observó la disminución de la señal de esta proteína a 24 y 48 h. Los ensayos

de actividad luciferasa muestran que tanto a 24 como 48h posterior al silenciamiento hay una disminución de la actividad traduccional (22 y 48 % respectivamente) de este mRNA comparado con el control negativo de siRNA (figura 16 C). Validando que, en efecto, PTB tiene un rol en la traducción de este mRNA.



**Figura 17. La sobreexpresión de las isoformas de PTB afectan diferencialmente la traducción del mRNA viral like.** A) Representación esquemática del mRNA reportero. B) Detección de la sobreexpresión de PTB1-his, PTB2-his y PTB4-his respectivamente mediante western blot. C) Actividad de FLuc en función de las diferentes concentraciones de PTBs (0.125-1ug) evaluadas. Los resultados están presentados en %, donde la ausencia de PTB se asumió arbitrariamente como el 100%. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes cada uno conducido por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido de una comparación múltiple de Tukey.

Como el silenciamiento de PTB con siRNA afecta la expresión de todas las isoformas, decidimos evaluar la aproximación complementaria, es decir el efecto de la sobreexpresión de estas isoformas sobre la traducción del mRNA *viral like*. Para esto, células Hek 293T fueron transfectadas con los vectores que codifican para las PTBs con tag de histidina. 24 horas posterior a la transfección de las proteínas, se transfectó el mRNA reportero por 4h. La sobreexpresión de estas proteínas fue confirmada mediante western blot (figura 17 B). Los resultados mostraron un efecto estimulador significativo en la síntesis de FLuc mediado por PTB1 (figura 17 C líneas rojas). Sin embargo, tanto PTB2 como PTB4 no mostraron diferencias respecto al control sobre la actividad FLuc en las concentraciones de plásmidos transfectados de 0,125 y 0,25ug (figura 17 C líneas azules y verdes respectivamente). En el rango de concentraciones de 0,5-1ug se observa una disminución significativa de la actividad de FLuc mediada por PTB2 y PTB4 (figura 17 C líneas azules y verdes respectivamente). Estos resultados son similares a las observaciones obtenidas con el clon infeccioso de DENV 2 (figura 14), donde la síntesis de proteínas es promovida por PTB1, no afectada por PTB2 y disminuida por PTB.

### **Estudio del efecto de las isoformas de PTB sobre la actividad del DENV IRES**

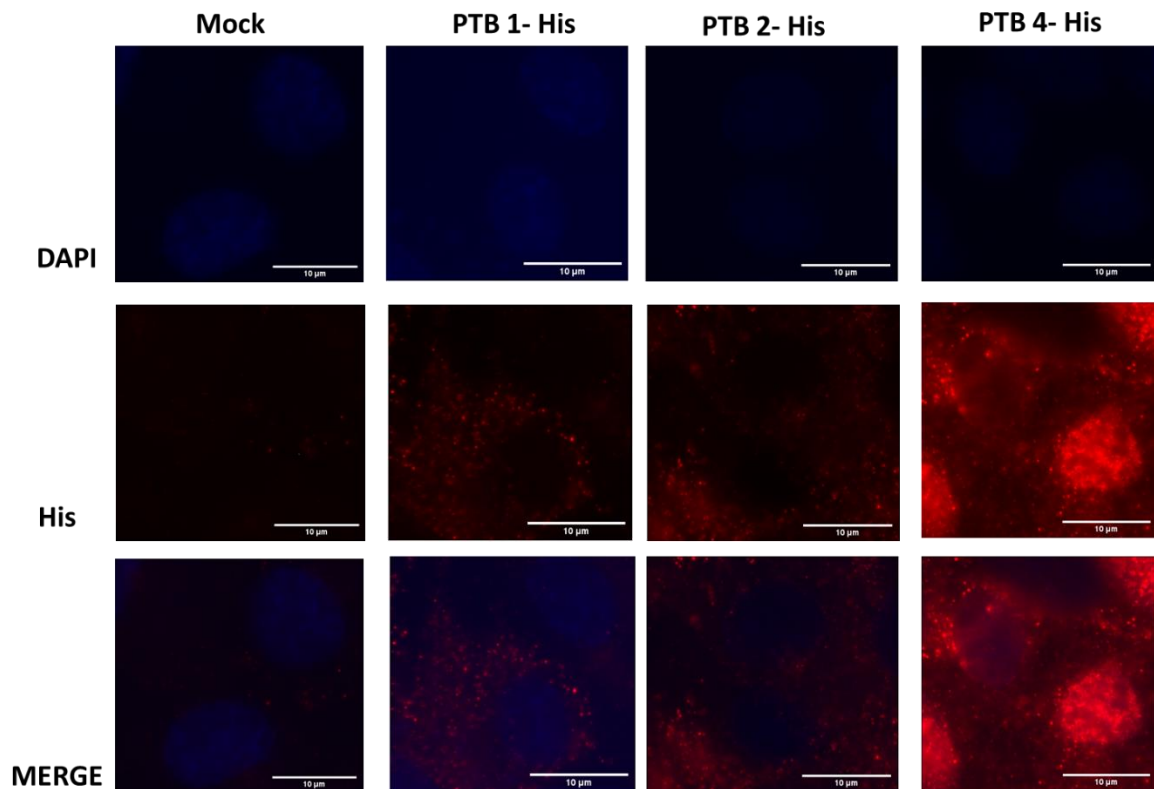
Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que existe una relación entre las isoformas de PTB y la síntesis de proteínas virales en un contexto biológico y en reportero artificial *viral like*. Sin embargo, es importante destacar que estas herramientas de RNA presentan una estructura cap en la región 5' y la región 3'. Como se demostró anteriormente (resultados objetivo 1) la traducción del mRNA viral ocurre fundamentalmente mediante un mecanismo cap-dependiente, teniendo una actividad IRES-dependiente débil o marginal en condiciones de homeostasis. Por este motivo se

decidió evaluar el efecto de las PTBs sobre la traducción IRES dependiente en un contexto bicistrónico, donde la traducción de FLuc ocurre exclusivamente por el reclutamiento interno de ribosomas. Para esto seleccionamos las células BHK 21, dado que en estas observamos buenos valores de actividad IRES y son fácilmente transfectables.

### **PTB se localiza en el citoplasma cuando es sobre expresada en células BHK21.**

Como se muestra en la figura anterior PTB es una proteína de localización principalmente nuclear (81). Esto nos llevó a determinar la localización celular de PTB-His en células BHK 21 mediante inmunofluorescencia (Figura 18). Para ellos los plásmidos que codifican para PTB1, PTB2, PTB4 o PSP64 (como control negativo) fueron co-transfectados con el vector dl 5UTR DENV y 24 h posterior a la transfección se determinó la localización de PTB por microscopía. Los resultados muestran que la sobre expresión de esta proteína provoca la localización de PTB1 y PTB2 en el citoplasma, mientras que en PTB4 se observó tanto en citoplasma como en núcleo (Figura 18). El tráfico nucleocitoplasmático de PTB está determinado por la presencia de un NLS en el extremo N-terminal y los RRM1 y RRM2 (51); los vectores que codifican para PTB empleados en este estudio poseen tanto el NLS como los RRM en sus formas nativas. A pesar de la presencia de la señal de exporte nuclear (NES) (presente también en nuestros vectores), se ha descrito que el exporte de PTB desde el núcleo hasta el citoplasma puede estar mediado por la oligomerización con otras PTB o por la asociación con RNAs (83). Teniendo en cuenta que este experimento fue realizado en presencia de un exceso de RNA exógeno, la asociación de PTB al dl 5UTR DENV pudiera explicar la localización

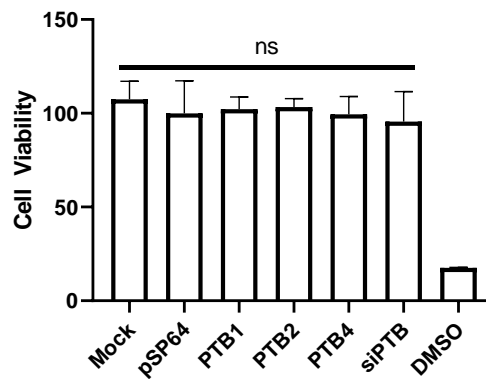
de esta proteína en el citoplasma, sin embargo, más controles son necesarios para apoyar esta observación.



*Figura 18. PTB se localiza en el citoplasma y en el núcleo celular cuando es sobre expresada en células BHK 21. Células HEK 293T fueron transfectadas con PSP 64 (columna1) o PTB1, PTB2 y PTB4 (columna 2 a 4 respectivamente) en conjunto con el vector dl 5UTR DENV. La localización se determinó mediante microscopia de fluorescencia 24h post-trasfección utilizando un anticuerpo primario dirigido contra el tag de Histidina. La figura muestra un campo representativo del experimento.*

**La sobreexpresión o silenciamiento de PTB no afecta la viabilidad celular en células BHK21.**

Dado que la localización de las PTBs sobre expresadas es citoplasmática, se decidió establecer si esta localización tiene un impacto sobre la viabilidad celular. El ensayo de reducción del MTS (Cell Proliferation Assay, Promega) para determinar la viabilidad celular, no mostró diferencias en el total de células viables a las concentraciones evaluadas de los plásmidos que codifican para PTB o en presencia del conjunto de siRNA específico para el mRNA de PTB (Figura 19).



*Figura 19. La sobreexpresión o silenciamiento de PTB no afecta la viabilidad celular en células BHK 21. Células de BHK 21 fueron transfectadas con 500 ng de plásmidos que codifican para las tres isoformas de PTB, un plásmido pSP64 o un conjunto de siRNA específicos para el mRNA de PTB. 24h post-trasfección se evaluó la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTS. Los resultados se presentan relativos a la condición no tratada, la cual se asumió como el 100% de viabilidad. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes cada uno conducido por duplicado.*

## El silenciamiento de PTB endógeno impacta sobre la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV en BHK 21.

Posteriormente se evaluó el potencial rol de PTB como ITAF del IRES de DENV. Para determinar el posible impacto de PTB sobre la traducción IRES-dependiente de DENV se procedió al silenciamiento transitorio de PTB endógeno en células BHK 21. Para este fin, se empleó un conjunto de siRNA específicos para todas las isoformas de PTB, el cual fue co-transfectado con el vector dl 5utr DENV. El silenciamiento de PTB en células BHK fue corroborado mediante western blot (Figura 20A). Los resultados de este experimento muestran que 24h posterior al silenciamiento de PTB la traducción cap-dependiente (RLuc) no es afectada, mientras que la actividad IRES (FLuc) disminuyó en un 56% respecto a la condición control (Figura 20 B).

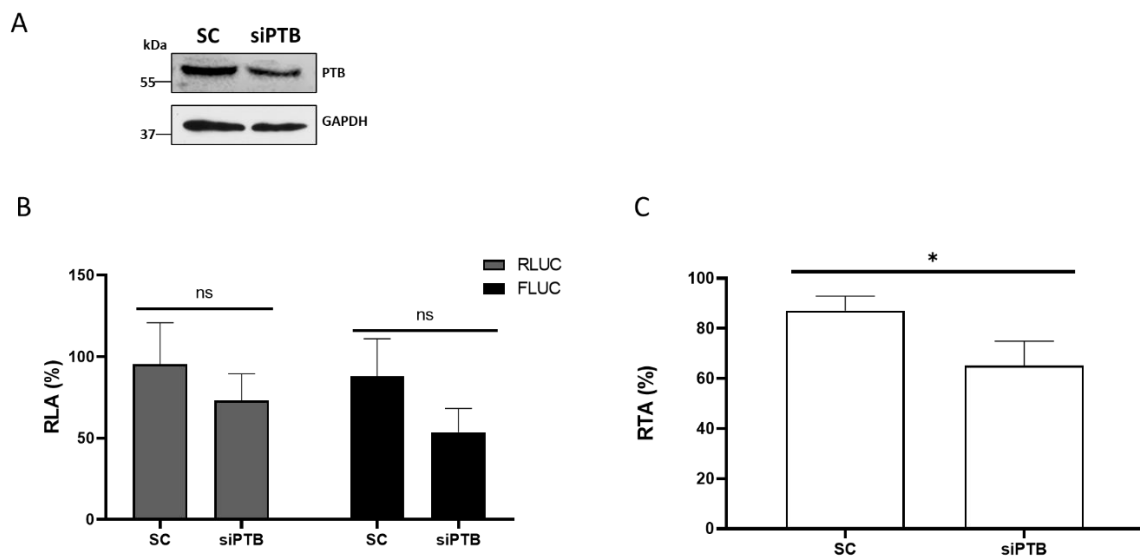


Figura 20. EL silenciamiento endógeno de PTB en BHK 21 afecta la traducción IRES dependiente del mRNA de DENV. A) Detección de PTB en células BHK mediante western blot. B) Actividad traduccional relativa en presencia de un siRNA no relevante (SC) o siRNA específico para el mRNA de PTB (siPTB). C) Representación de la actividad IRES

*dependiente en condiciones de silenciamiento de PTB endógeno. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T de Student. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes cada uno conducido por duplicado.*

Al analizar los valores de RTA en presencia o ausencia del siRNA de PTB, se obtuvo una disminución significativa de la actividad IRES de un 23% respecto al control (Figura 20 C). La disminución de la actividad de este IRES en condiciones donde PTB endógeno se encuentra silenciado sugiere fuertemente que PTB participa en la traducción mediada por la región 5'UTR del mRNA de DENV.

#### **Las isoformas de PTB son ITAF del IRES de DENV en BHK 21.**

Usando la aproximación complementaria al experimento anterior se realizó la sobreexpresión de las 3 isoformas de PTB y se evaluó el efecto sobre el IRES de DENV en un contexto bicistrónico. Los resultados obtenidos muestran que las tres PTBs estimulan al DENV IRES de forma diferencial (Figura 21 A). La detección de las proteínas con tag de histidinas fue monitoreada mediante western blot (Figura 21 B). El efecto diferencial se evidencia dado que PTB1 induce un incremento significativo de la síntesis de FLuc de forma dosis dependiente, mientras que PTB2 estimuló la traducción solamente en el rango 100-300 ng de la transfección de vectores (Figura 21; líneas rojas y azules respectivamente). Por otra parte, PTB4 induce un incremento significativo de FLuc en las máximas concentraciones evaluadas (Figura 21; líneas verdes).



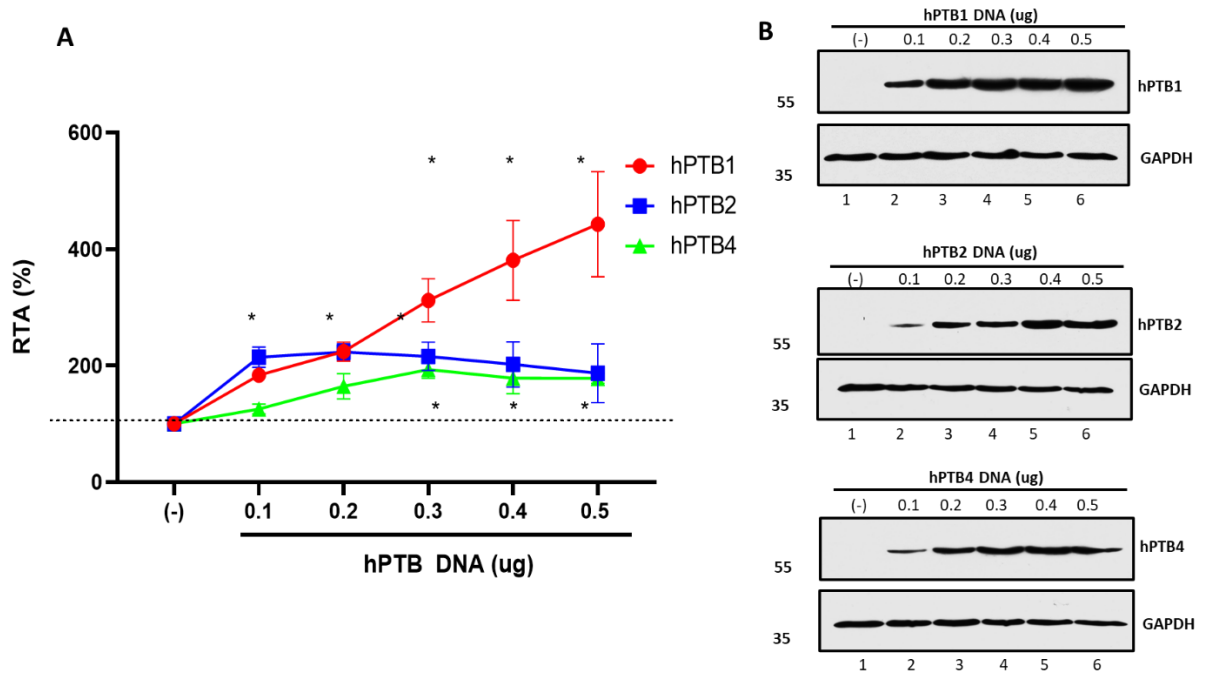


Figura 21. Las isoformas de PTB son ITAF del IRES de DENV 2. A) Actividad traduccional graficada en RTA para PTB1, PTB2 y PTB4. B) Detección de las proteínas mediante western blot PTB1, PTB2 y PTB4 respectivamente. Células BHK21 fueron co-transfectadas con las concentraciones crecientes que se indican en la figura de los plásmidos que codifican para PTB 1, 2 y 4 y 200 ng dl 5'UTR DENV. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA. Los resultados muestran 3 experimentos independientes cada uno conducido por duplicado.

Este experimento demuestra que, en efecto, las tres isoformas de PTB son ITAF del DENV IRES. Las PTBs poseen un efecto estimulador en la síntesis de proteínas mediada por la 5'UTR de mRNA viral, siendo PTB1 la proteína con mayor impacto, seguido de PTB2 y PTB4.

## **La estimulación de la traducción IRES-dependiente producida por PTB requiere diferentes motivos de unión a RNA en cada isoforma**

Con el objetivo de profundizar sobre el efecto de las distintas isoformas de PTB sobre la actividad del DENV IRES se generaron mutantes de unión a RNA en cada una de estas isoformas. Como ha sido descrito que los motivos de reconocimiento de RNA (RRM) 1 y 2, así como el 3 y 4 funcionan como pares coordinados, se desarrollaron las mutantes PTB mut 1.2 y PTB mut 3.4 (Figura 22A). Los sitios de mutaciones han sido caracterizados previamente y se ha documentado que estas mutantes no tienen la capacidad de unir RNA (84). Para evaluar el efecto de los RRM sobre la actividad ITAF, los plásmidos que codifican para las proteínas en su versión *wild type* o los plásmidos que codifican para las proteínas mutantes fueron co-transfectados con el dl 5UTR DENV. El análisis de las mutantes de PTB1, evidenció que tanto las PTB1 mut 1.2 como las mut 3.4 afectan la actividad estimuladora producida por la PTB1 WT, produciendo los mismos valores obtenidos en ausencia de la proteína (Figura 22B). Para el caso de PTB2 no se obtuvieron diferencias entre la estimulación producida por la PTB2 WT y PTB2 mut 1.2 o PTB2 mut 3.4 (Figura 22C). Finalmente, PTB4 mut 1.2 no mostró diferencias respecto a la PTB4 WT, mientras que la PTB4 mut 3.4 afecto la estimulación que es producida por la versión WT de esta proteína (Figura 22D).

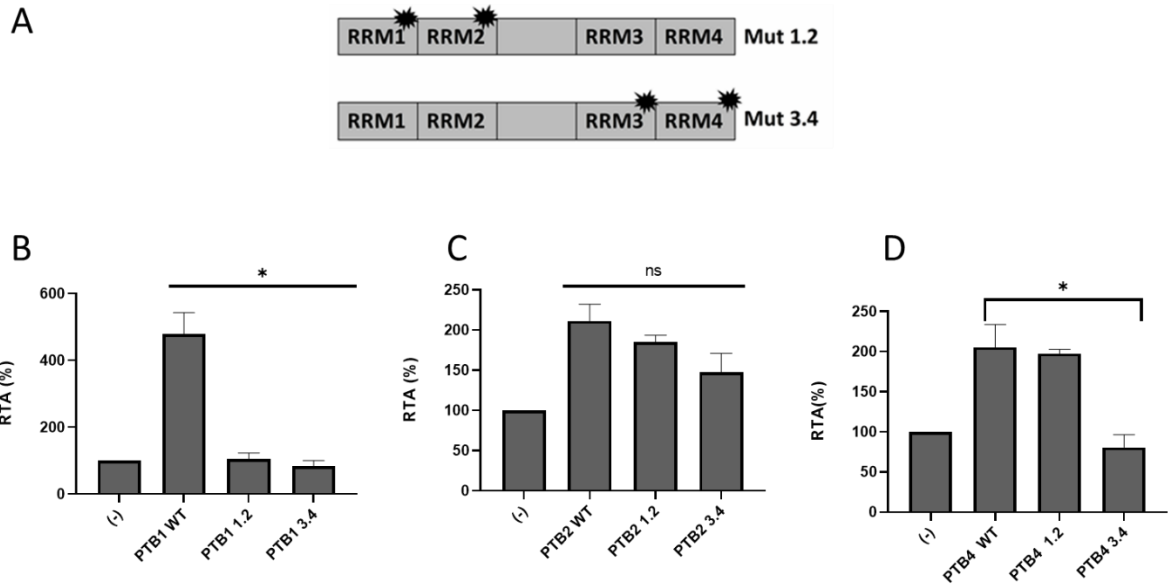


Figura 22. Las isoformas de PTB requieren diferentes RRM para actuar como ITAF del IRES de DENV 2. A) Representación esquemática de las mutantes de PTBs en los RRM. La actividad traduccional graficada en RTA para las mutantes de PTB1 (B), PTB2 (C) y PTB4 (D) fueron representadas respecto a la condición en ausencia de PTB. Células BHK21 fueron co-transfectadas con las PTBs WT o PTB mutantes y 200 ng dl 5UTR DENV. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA. Los resultados muestran 3 experimentos independientes cada uno conducido por duplicado.

Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que los requerimientos moleculares por los cuales las isoformas de PTB estimulan la traducción IRES-dependiente de DENV no son equivalente entre sí. La evaluación de mutantes de unión a RNA evidenció que la estimulación de PTB1 requiere de la presencia de todos los RRM en su forma WT. Para PTB2, los datos sugieren que basta con la presencia de al menos un par de RRM (RRM 1.2 o RRM 3.4) en su forma WT para que se produzca estimulación de la actividad IRES. Mientras que para PTB4, el análisis de mutantes indica que la estimulación traduccional

es mediado por el par RRM 3.4, mientras que la inactivación del RRM 1.2 no afecta la actividad producida por la PTB4 WT.

## Discusión

La traducción del mRNA de DENV es resistente a la inhibición de la síntesis de proteínas cap-dependiente (33). En concordancia, la infección por DENV2 produce una potente inhibición de la traducción global en las células hospederas (85). Las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo sugieren que la región 5'UTR de DENV 2 presenta actividad IRES (DENV IRES). El estudio de la traducción de mRNAs monocistrónicas en RRL demuestra que existe un mecanismo independiente del cap mediado por la región 5'UTR de DENV y que es independiente de la región 3'UTR del mRNA viral, sin descartar la posibilidad de la contribución de un mecanismo mediado y/o influenciado por el 3'UTR (Figura 1). La actividad del DENV IRES *in vitro* mostró ser igual o más eficiente que el mecanismo cap-dependiente (Figura 1). Los resultados en RRL usando mRNAs bicistrónicos muestran que la actividad del DENV IRES es similar a la traducción del IRES de HCV. Además, descartamos que la actividad FLuc observada no se debe a un proceso de terminación/reiniciación de la traducción (Figura 3). En este sentido, observamos que la traducción IRES dependiente de DENV, no solo no se ve afectada, sino, que es estimulada *in vitro* cuando la traducción cap-dependiente es alterada por el corte proteolítico de eIF4G, sugiriendo que la actividad del DENV IRES a diferencia del HCV IRES es estimulada cuando la canónica es inhibida (Figura 4). Usando el antibiótico edeína, el cual inhibe la iniciación de la traducción a través del bloqueo del reconocimiento del codón de inicio por aquellas subunidades 40S que se encuentran realizando el proceso de *scanning*, establecemos que en el IRES de DENV la subunidad ribosomal 40S es reclutada río arriba del codón de inicio presente en el ORF codificante de la poliproteína viral. Esto sugiere que luego del reclutamiento, el complejo de inicio de la traducción explora la región 5'UTR de DENV en dirección 5'-3'. Este mecanismo es

distinto al descrito previamente en la literatura para el IRES de HCV, en el cual la subunidad ribosomal 40S es reclutada directamente sobre el codón iniciador (44).

Los resultados obtenidos con los mRNA monocistrónicos *in vitro* fueron muy diferentes a aquellos obtenidos cuando fueron transfectados en células Vero E6 y BHK 21. En estas líneas celulares, el DENV IRES presentó una actividad marginal casi despreciable en magnitud respecto al mecanismo canónico. Sin embargo, teniendo en cuenta la actividad del mRNA de Globina con Acap (menor al 1 % de la traducción mediada por el Cap), podemos sugerir que en condiciones de homeostasis existe aproximadamente un 5% de traducción mediada por el DENV IRES (Figura 6). Las diferencias obtenidas *in vitro* y en células pudieran ser explicadas por procesos celulares que gatillan la activación de un mecanismo alternativo de traducción como la inducción de estrés o inhibición de la traducción cap-dependiente. Tampoco se puede descartar el efecto de proteínas celulares requeridas para la traducción vía IRES y/o la existencia de proteínas inhibitoras o moduladoras negativas del IRES. En un contexto bicistrónico empleando 9 líneas celulares diferentes, todas capaces de ser infectadas por DENV (76), el DENV IRES mostró ser marginal, pero significativamente superior al control negativo e inferior al HCV IRES, y dependiente del tipo celular, dado que en células MDCK, Jurkat y C6/36 no se observó actividad del reportero FLuc superior al control negativo (Figura 7). Posteriormente, células BHK 21, Vero E6 y Hek 293T fueron transfectadas con plásmidos que codifican para mRNAs bicistrónicos. En BHK 21 y Vero E6 se obtuvo actividad IRES significativamente superior al control negativo, incluso con un número de veces de actividad mayor al obtenido en las transfecciones de mRNA. Adicionalmente, en aquellas líneas celulares donde se obtuvo actividad IRES se controló la actividad de promotor críptico y variantes de splicing. Salvo en las células Vero E6 que se obtuvo un

8% de actividad promotor críptico, en el resto de las líneas celulares evaluadas no se obtuvieron mRNAs monocistrónicos de FLuc. (Figuras 9 y 10).

Posteriormente, se decidió evaluar la actividad IRES cuando la traducción cap-dependiente esta inhibida. Para abordar esta aproximación, la traducción cap-dependiente fue afectada mediante el corte de eIF4G. En presencia de eIF4G cortado por la proteasa 2A de RV, se obtuvo una disminución de la traducción cap-dependiente (Figura 11 y 12). La traducción del IRES de DENV fue promovida cuando la traducción cap-dependiente fue inhibida en células BHK21 (Figura 11). Una observación interesante, fue la obtenida en células Hek 293T donde el IRES de DENV no es funcional, sin embargo en presencia del corte de eIF4G se observó actividad IRES (Figura 12). Estos resultados coinciden con la propuesta de Edgil *et al*; 2006, donde el mecanismo alternativo podría operar más eficiente o activarse cuando la traducción canónica es inhibida. En este sentido ha sido descrito que el IRES del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) permanece en un estado de “dormancia”, con baja actividad, mientras que en el contexto de infección o estrés térmico se observa una activación de este IRES(77). Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para evaluar si este el caso del DENV IRES. Una observación similar a esta propuesta ha sido descrita para algunos IRES: mecanismos de *Riboswitches* en los cuales pequeñas moléculas o proteínas actúan como ligandos de RNA, pudiendo cambiar la actividad traduccional de ciertos mRNA (86)(87). Además del aumento de ribosomas que favorezcan la traducción de este IRES en condiciones donde la traducción cap-dependiente esta inhibida, los *Riboswitches* pudieran ser una explicación para la ganancia de actividad IRES de DENV en células HEK 293T.

En la actualidad se desconoce el significado biológico de la presencia de un elemento IRES en el mRNA de DENV. Un hecho interesante es que en células HepG2 la infección por DENV induce estrés de ER y activa la respuesta celular a proteínas mal plegadas (UPR) (88). También, como consecuencia de la infección, el virus induce autofagia para evitar la muerte celular y garantizar la replicación y producción de progenie viral (89). Incluso es conocido que durante la infección por DENV se produce una disminución temporal de la síntesis global de proteínas (26). En estas condiciones la presencia de un elemento IRES podría garantizar la síntesis de proteínas virales, aun cuando los procesos canónicos de traducción están inhibidos.

Como ha sido propuesto previamente la participación de proteínas celulares en el mecanismo alternativo de traducción del mRNA de DENV(33), se evaluó si la proteína de unión al tracto de poli pirimidinas, PTB y sus isoformas eran ITAF de este IRES. Debido a que se ha descrito previamente que PTB es un factor que participa en el ciclo replicativo de DENV y que interactúa con la hebra positiva del RNA durante la infección (49), evaluamos el efecto de PTB como ITAF del DENV IRES. Primero mediante un análisis de secuencia, encontramos que ambas regiones 5' y 3' poseen varios sitios putativos de unión a PTB (Figura 15). Teniendo en cuenta la presencia de estos sitios de unión a PTB, mostramos que estas isoformas actúan diferencialmente sobre la traducción del mRNA en el contexto biológico de un virus reportero (Figura 14). Donde la sobreexpresión de PTB1 produjo una potente estimulación de la traducción del mRNA viral (Figura 14). Resultados similares fueron obtenidos al evaluar el efecto de estas proteínas sobre un reportero viral monocistrónico con cap y la región 3' (Figuras 16 y 17). Luego, para analizar el efecto específico de PTB como ITAF del IRES de DENV, se empleó el vector bicistrónico dl 5UTR DENV, de manera que se pudiera estudiar exclusivamente la región



5'. El silenciamiento de todas las isoformas de PTB mediante siRNA produjo una disminución en la síntesis de FLuc (Figura 20), lo cual indica que PTB está participando en la traducción mediada por este IRES. Posteriormente se evaluó la función de ITAF en células BHK 21 mediante la sobreexpresión de PTB1, PTB2 y PTB4. La transfección en concentraciones crecientes del plásmido que codifica para las isoformas de PTB muestra que PTB1, PTB2 y PTB4 actúan específicamente como ITAF positivos del IRES de DENV, produciendo un incremento significativo en los niveles de FLuc (Figura 21). Con el fin de caracterizar los requerimientos de RRM para la estimulación de la actividad IRES, se evaluaron PTBs mutantes de unión a RNA. Similar a lo descrito para el IRES de MMTV (58), obtuvimos que los requerimientos moleculares de RRM para la estimulación de la actividad IRES de DENV no son equivalentes para todas las isoformas de esta proteína (Figura 22). Es notable que los resultados obtenidos con PTB1 fueron similares en la traducción del mRNA del clon infeccioso y con los reporteros mono y bicistrónicos. Sin embargo, con las isoformas PTB2 y PTB4 se obtuvieron diferencias entre el mRNA monocistrónico y el bicistrónico. Tanto en el contexto viral como en el mRNA monocistrónicos estas proteínas no tuvieron efecto marcado, o en altas concentraciones manifestaron una tendencia a la disminución de la actividad traduccional. Esto puede sugerir que PTB2 y PTB4 actúan de manera diferente sobre la traducción cap-dependiente o que la presencia de la región 3' afecta el efecto de las PTBs. Ambas alternativas son posibles y no excluyentes, dado que la traducción del mRNA en condiciones de homeostasis ocurre aproximadamente por un mecanismo cap-dependiente y que la región 3' presenta varios sitios de unión a PTB. Sin embargo, otros experimentos son requeridos para dar respuesta a estas alternativas.

Finalmente, como PTB es una proteína nuclear y la síntesis de proteínas es un proceso citoplasmático, evaluamos la localización subcelular de PTB en infección por DENV2 en células de epitelio pulmonar humano como modelo, A549. A diferencias del control de células no infectadas, encontramos que la infección por DENV2 produce un cambio en la localización de PTB desde el núcleo hasta la región perinuclear o citoplasmática (Figura 13). Este hecho pudiera favorecer que PTB sea usado en el citoplasma celular durante el ciclo replicativo viral en los procesos de traducción.

En la actualidad no ha sido descrito ningún ITAF para el IRES de DENV. En este trabajo mostramos que las isoformas de PTB estimulan este IRES viral. Además de ello, no descartamos la posible participación de otras proteínas de unión a RNA (RBP). Futuros experimentos son requeridos para entender el mecanismos y significado biológico de este proceso.

## Conclusiones:

1. La región 5'UTR del mRNA de DENV2 exhibe actividad IRES en RRL.
2. El reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S ocurre río arriba del codón de inicio del ORF viral.
3. La actividad IRES de la región 5'UTR del mRNA de DENV2 es tipo celular dependiente.
4. La actividad IRES de DENV2 es estimulada *in vitro* y *ex vivo* cuando la traducción cap-dependiente es afectada.
5. La infección por DENV2 NGC deslocaliza a PTB desde el núcleo al citoplasma en células A549.
6. PTB1 estimula la síntesis de proteínas del mRNA de DENV mediada por los mecanismos cap e IRES-dependiente.
7. Las isoformas de PTB son ITAF del elemento IRES de DENV2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>
2. OMS OM de la S. Dengue y dengue grave [Internet]. Dengue y dengue grave. Datos y cifras. 2020. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
3. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis* [Internet]. 2009;x, 147. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)
4. OMS/OPS. Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud. Dengue: Información general [Internet]. Clasificación revisada del dengue. 2020. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=es)
5. Gupta P, Khare V, Tripathi S, Nag VL, Kumar R, Khan MY, et al. Assessment of World Health Organization definition of dengue hemorrhagic fever in North India. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2010;4(3):150–5. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/708%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351455>
6. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453–65.

7. Salud M de. No Title [Internet]. Jornada de Actualización Enfermedades vectoriales por mosquito: Dengue, Chikungunya y ZIKA. 2020. Available from: <https://www.minsal.cl/dengue/>
8. Chile. I de SP de C. Boletín laboratorio y vigilancia al día. 2012;3(1):1–9. Available from: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/BOLETIN 2.pdf>
9. Cáceres C, Yung V, Araya P, Tognarelli J, Villagra E, Vera L, et al. Complete nucleotide sequence analysis of a Dengue-1 virus isolated on Easter Island, Chile. *Arch Virol*. 2008;153(10):1967–70.
10. Fernández J, Vera L, Tognarelli J, Fasce R, Araya P, Villagra E, et al. Detection of dengue virus type 4 in Easter Island, Chile. *Arch Virol*. 2011;156(10):1865–8.
11. Chile M de SG de. Confirman hallazgo de mosquito *Aedes Aegypti* en Iquique [Internet]. 2019. Available from: <https://www.minsal.cl/confirman-hallazgo-de-mosquito-aedes-aegypti-en-iquique/>
12. Deng SQ, Yang X, Wei Y, Chen JT, Wang XJ, Peng HJ. A review on dengue vaccine development. *Vaccines*. 2020;8(1):1–13.
13. Halstead SB, Katzelnick LC, Russell PK, Markoff L, Aguiar M, Dans LR, et al. Ethics of a partially effective dengue vaccine : Lessons from the Philippines. 2020;(January).
14. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Dicistroviridae. *J Gen Virol* [Internet]. 2017;98(3):355–6. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.00075>

15. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Futur Microbiol* [Internet]. 2008;3(2):155–65. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366336>
16. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev*. 2018;118(8):4448–82.
17. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(7):823–9. Available from:  
<http://jem.rupress.org/content/197/7/823.long>
18. Hidari KIPJ, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health* [Internet]. 2011;39(4 Suppl):37–43. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500135>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3317600>
19. Hidari KIPJ, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health* [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Jul 25];39(4SUPPLEMENT):S37–43. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500135>
20. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(16):2773–86.
21. Garcia-blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res* [Internet].

2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.010>

22. Song Y, Mugavero J, Stauff CB, Wimmer E. Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. *MBio*. 2019;10(2):1–16.
23. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13–22.
24. Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(12):745–59. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3916>
25. Edgil D, Diamond MS, Holden KL, Paranjape SM, Harris E. Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. *Virology*. 2003;317(2):275–90.
26. Roth H, Magg V, Uch F, Mutz P, Klein P, Haneke K, et al. Flavivirus infection uncouples translation suppression from cellular stress responses. *MBio*. 2017;8(1):1–18.
27. Chiu W, Kinney RM, Dreher TW. Control of Translation by the 5'UTR and 3'UTR Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *J Virol*. 2005;79(13):8303–15.
28. López-lastra M, Rivas A, Barría MI. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap- independent translation initiation. *Biol Res*. 2005;38(2–3):121–46.
29. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5' - untranslated regions of eukaryotic mRNAs. 2016;352(6292).

30. Polacek C, Friebe P, Harris E. Poly ( A ) -binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol.* 2009;687–92.
31. Hinnebusch AG, Lorsch JR. *The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation : New Insights and Challenges.* Cold Spring Harb Lab Press. 2012;
32. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. 2010;10(FEBRUARY). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2838>
33. Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *J Virol.* 2006;80(6):2976–86.
34. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)- 8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994;269(7):5241–8.
35. Goltsov A, Tashkandi G, Langdon SP, Harrison DJ, Bown JL. Kinetic modelling of in vitro data of PI3K, mTOR1, PTEN enzymes and on-target inhibitors Rapamycin, BEZ235, and LY294002. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 2017;97:170–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.008>
36. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation : Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. 2014;2014.
37. Haghghat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N. Repression of cap-dependent



- translation by 4E-binding protein 1: Competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 1995;14(22):5701–9.
38. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1995;15(9):4990–7.
  39. Manzano M, Reichert ED, Polo S, Falgout B, Kasprzak W, Shapiro BA. Identification of Cis -Acting Elements in the 3' Untranslated Region of the Dengue Virus Type 2 RNA That Modulate Translation and Replication \* □. *J Virol.* 2011;286(25):22521–34.
  40. Mailliot J, Martin F. Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(2).
  41. Lee KM, Chen CJ, Shih SR. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends Microbiol* [Internet]. 2017;xx. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.010>
  42. Svitkin Y V, Siddiqui N, Sonenberg N. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotes: IRES-mediated Internal Initiation. *eLS.* 2015;(September 2017):1–11.
  43. Sunnie Thompson. So You Want to Know if Your Message Has an IRES? *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;3(5):697–705.
  44. Lopez-Lastra M, Ramdohr P, Letelier A, Vallejos M, Vera-otarola J, Valiente-echeverri F. Translation initiation of viral mRNAs. *Rev Med Virol.* 2010;177–95.
  45. Borman AM. Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity

- of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(21):4068–75.
46. PELHAM HRB, JACKSON RJ. An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates. *Eur J Biochem.* 1976;67(1):247–56.
  47. Paulous S, Malnou CE, Michel YM, Kean KM, Borman AM. Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(2):722–33.
  48. Jackson RJ. Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *BBA - Gene Struct Expr.* 1991;1088(3):345–58.
  49. Viktorovskaya O V., Greco TM, Cristea IM, Thompson SR. Identification of RNA Binding Proteins Associated with Dengue Virus RNA in Infected Cells Reveals Temporally Distinct Host Factor Requirements. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(8):1–22.
  50. Oberstrass FC, Auweter SD, Erat M, Hargous Y, Henning A, Wenter P, et al. Structural biology - Structure of PTB bound to RNA: Specific binding and implications for splicing regulation. *Science (80- )*. 2005;309(5743):2054–7.
  51. Kamath R V, Leary DJ, Huang S. Nucleocytoplasmic Shuttling of Polypyrimidine Tract-binding Protein Is Uncoupled from RNA Export. *Mol Biol Cell.* 2001;12(December):3808–20.
  52. Agis-Juárez RA, Galván I, Medina F, Daikoku T, Padmanabhan R, Ludert JE, et al. Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is

- required during dengue virus infection in Vero cells. *J Gen Virol*. 2009;90(12):2893–901.
53. Romanelli MG, Diani E, Lievens PMJ. New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):22906–32.
54. Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2008;36(4):641–7. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0360641>
55. Florez PM, Sessions OM, Wagner EJ, Gromeier M, Garcia-blanco MA. The Polypyrimidine Tract Binding Protein Is Required for Efficient Picornavirus Gene Expression and Propagation The Polypyrimidine Tract Binding Protein Is Required for Efficient Picornavirus Gene Expression and Propagation. *J Virol*. 2005;79(10):6172–9.
56. Ali N, Siddiqui a. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol*. 1995;69(10):6367–75.
57. Anwar A, Ali N, Tanveer R, Siddiqui A. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34231–5.
58. Cáceres CJ, Contreras N, Angulo J, Vera-Otarola J, Pino-Ajenjo C, Llorian M, et al. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the 5' untranslated region of the

- mouse mammary tumor virus mRNA and stimulates cap-independent translation initiation. *FEBS J.* 2016;283(10):1880–901.
59. Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix J-L, 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* [Internet]. 2003;77(7):3939–49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150645&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
60. Barría MI, González A, Vera-Otarola J, León U, Vollrath V, Marsac D, et al. Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in cap-independent translation. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):957–71.
61. Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludueña SJ, Lía I, Gamarnik A V, Lodeiro F, et al. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *J Virol.* 2005;79(11):6631–43.
62. Olivares E, Landry DM, Caceres CJ, Pino K, Rossi F, Navarrete C, et al. The 5' Untranslated Region of the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 mRNA Enables Cap-Independent Translation Initiation. *J Virol* [Internet]. 2014;88(11):5936–55. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00279-14>
63. Joaquín Cáceres C, Angulo J, Lowy F, Contreras N, Walters B, Olivares E, et al. Non-canonical translation initiation of the spliced mRNA encoding the human T-

- cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(20):11030–47.
64. Laura A. Byk, Néstor G. Iglesias, Federico A. De Maio, Leopoldo G. Gebhard, Mario Rossi AVG. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *MBio.* 2016;7(3):1–10.
65. Cáceres CJ, Angulo J, Contreras N, Pino K, Vera-Otarola J, López-Lastra M. Targeting deoxyhypusine hydroxylase activity impairs cap-independent translation initiation driven by the 5'untranslated region of the HIV-1, HTLV-1, and MMTV mRNAs. *Antiviral Res.* 2016;134:192–206.
66. Vera-Otarola J, Solis L, Soto-Rifo R, Ricci EP, Pino K, Tischler ND, et al. The Andes Hantavirus NSs Protein Is Expressed from the Viral Small mRNA by a Leaky Scanning Mechanism. *J Virol* [Internet]. 2012;86(4):2176–87. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.06223-11>
67. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:1–12.
68. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
69. BERGAMINI G, PREISS T, HENTZE MW. Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* [Internet]. 2000;6(12):S1355838200001679. Available from:

[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1355838200001679](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1355838200001679)

70. Ryoji M, Hsia K, Kaji A. Read-through translation. *Trends Biochem Sci.* 1983;8(3):88–90.
71. Weber LA, Hickey ED, Baglioni C. Influence of potassium salt concentration and temperature on inhibition of mRNA translation by 7-methylguanosine5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 1978;253(1):178–83.
72. Baglioni LW, EHPMCB. Inhibition of Protein Synthesis by Cl. *J Biol Chem.* 1977;252:4007–10.
73. Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L. The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G1 Is Cleaved by Different Retroviral Proteases. *J Virol.* 2003;77(23):12392–400.
74. Obrig T, Irvin J, Culp W, Hardesty B. Inhibition of Peptide Initiation on Reticulocyte Ribosomes by Edeine. *Eur J Biochem.* 1971;21(1):31–41.
75. Lancaster AM, Jan E, Sarnow P. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Rna.* 2006;12(5):894–902.
76. Chan JFW, Yip CCY, Tsang JOL, Tee KM, Cai JP, Chik KKH, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(July):e93.
77. Camerini V, Decimo D, Balvay L, Pistello M, Bendinelli M, Darlix J-L, et al. A Dormant Internal Ribosome Entry Site Controls Translation of Feline

- Immunodeficiency Virus. *J Virol.* 2008;82(7):3574–83.
78. Vallejos M, Deforges J, Plank TDM, Letelier A, Ramdohr P, Abraham CG, et al. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(14):6186–200.
79. Borman AM, Kirchweger R, Ziegler E, Rhoads RE, Skern T, Kean KM. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA.* 1997 Feb;3(2):186–96.
80. Proteases R. crossm Differential Disruption of Nucleocytoplasmic Trafficking Pathways. 2017;91(8):1–16.
81. Wang C, Norton JT, Ghosh S, Kim J, Fushimi K, Wu JY, et al. Polypyrimidine Tract-binding Protein (PTB) differentially affects malignancy in a cell line-dependent manner. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20277–87.
82. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 2009;5(10).
83. Li B, Benedict Yen TS. Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10306–14.
84. Kafasla P, Lin H, Curry S, Jackson RJ. Activation of picornaviral IRESs by PTB shows differential dependence on each PTB RNA-binding domain. *Rna.* 2011;17(6):1120–31.
85. Roth H, Magg V, Uch F, Mutz P, Klein P, Haneke K, et al. Flavivirus infection

- uncouples translation suppression from cellular stress responses. *MBio*. 2017;8(1):1–18.
86. Boerneke MA, Hermann T. Ligand-responsive RNA mechanical switches. *RNA Biol*. 2015;12(8):780–6.
87. Breaker RR. *Riboswitches and Translation Control*. 2018;
88. Thepparit C, Khakpoor A, Khongwichit S, Wikan N, Fongsaran C, Chingsuwanrote P, et al. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes* [Internet]. 2013;6(1):1. Available from: *BMC Research Notes*
89. Datan E, Roy SG, Germain G, Zali N, McLean JE, Golshan G, et al. Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. *Cell Death Dis* [Internet]. 2016;7(3):e2127. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cddis.2015.409>