



UNIVERSIDAD DE CHILE

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE
PREGRADO

“Análisis de la interacción entre el ARN genómico de VIH-1 y proteínas lectoras de N⁶-metiladenosina (m⁶A) mediante hibridización *in situ* acoplada al ensayo de ligación proximal (ISH-PLA)”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Álvaro Thadani Acosta

Director de Seminario de
Título:

Dr. Ricardo Soto Rifo
Co-Director:

Dr. Daniela Toro Ascuy

Patrocinante:

Dr. Francisco Chávez
Espinosa

Enero 2018
Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr Alvaro Thadani Acosta**.

“Análisis de la interacción entre el ARN genómico de VIH-1 y proteínas lectoras de N⁶-metiladenosina (m⁶A) mediante hibridización in situ acoplada al ensayo de ligación proximal (ISH-PLA)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Ricardo Soto Rifo

Director Seminario de Título: _____

Dr. Daniela Toro Ascuy

Co-Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Álvaro Ramesh Thadani Acosta, actualmente tengo 24 años. Cursé mi enseñanza básica en el colegio República de Guatemala y enseñanza media en el Liceo San Pedro Poveda, ambos establecimientos pertenecientes a la comuna de Maipú, lugar donde crecí y me crié bajo la supervisión de mi madre y abuela. Una vez terminada mi enseñanza media ingrese a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular con el objetivo de ser un profesional, lo que está cada vez más próximo a cumplirse y constituirse en el punto de partida a objetivos más grandes y ambiciosos mediante el uso de las habilidades, aprendizajes y experiencias obtenidas a lo largo de la vida.

DEDICATORIA

El culmine de la etapa de Pregrado en mis estudios se lo dedico con gran énfasis a mis amigos que hice a lo largo de la carrera, que siempre me han mostrado su apoyo en etapas tanto tristes como felices. Ellos se han convertido en pilares fundamentales en mi vida y en especial en este último tiempo en mi paso por el proceso de tesis. Les dedico más que mi trabajo, mi gratitud y espero que sigamos siendo amigos, pilares de confianza, ya que yo así seré con ustedes. Dentro del grupo de amigos quiero destacar especialmente a las siguientes personas que supieron darme palabras de aliento, apoyo, reflexión, consejo y escarmiento cuando lo necesite; Alejandra Leyva, amiga con visión de mundo que me ha enseñado mucho; Alonso Fariña, gran amigo y partner; Camilo Maldonado, hermano maldadoso, pero de buen corazón; Esteban Valencia, amigo de personalidad errática pero chistoso e incondicional; Fabián Figueroa, amigo que se convirtió en un apoyo y reflejo; Francisca Hofmann, mejor amiga de universidad y persona de gran intelecto; Alessandra Dellarossa, una hermana mayor cariñosa y consejera; Daniela Toro, amiga exitosa, excelente guía y persona; Francisco García, amigo de gran esfuerzo e inteligencia y motivador; Sebastián Riquelme, amigo sin pelos en la lengua y directo; Felipe Velásquez, amigo muy empático, alegre y preocupado de su alrededor, siempre en búsquedas de nuevos horizontes; Camila Pereira, amiga, aunque lo niegue, muy inteligente; Aracely Gaete, amiga muy capaz e inteligente; Natalia Poblete, amiga confidente y muy alegre; Cecilia Rojas, amiga inteligente y capaz en todo; Barbara Rojas, la amiga más ruda que conozco, pero de buen corazón; Marcela Cayazzo, amiga muy alegre y divertida; Miguel Esteban Cuevas, dos amigos motivados tanto en ciencia como en la vida; Nora Penailillo, otra amiga ruda y de buen corazón que se suma a la lista; Alonso Gibson, amigo muy alegre; Dr Ricardo Soto, guía y tutor; Dr Jorge Vera, Primer Cotutor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas que confiaron y me dieron palabras de apoyo a lo largo de la carrera, a aquellos que estuvieron siempre dispuesto a escucharme y a conversar, aquellos que hoy considero familia, me alegran y motivan a seguir cada día e intentar ser mejor persona y humano. Solo quiero dar las gracias y decirles que como ustedes estuvieron para mí, yo estaré para ustedes de forma incondicional.

INDÍCE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDÍCE DE CONTENIDOS	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Regulación epitranscriptómica de la expresión génica	1
1.2. Proteínas y m ⁶ A.....	2
1.3. Proteínas que mantienen y/o modifican m ⁶ A	3
1.4. Proteínas lectoras de m ⁶ A, la Familia YTH.....	4
1.5. Proteínas YTH y su rol sobre ARNms Virales.....	8
1.6. VIH-1	10
1.7. Epitranscriptómica, YTHs y VIH-1.....	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVO ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. Sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en células HeLa.....	17
2.1.1. Cultivo y sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en ausencia de replicación viral de VIH-1 para realización de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	17
2.1.2. Sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en condiciones de replicación viral de VIH-1 para la realización de ISH-PLA.....	18
2.1.3. Transfección en células HeLa con el vector proviral pNL4.3 y el vector pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1 para el análisis del efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 sobre la síntesis de la proteína precursora Gag.....	19
2.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).	21
2.3. Hibridación in situ Fluorescente (FISH) e Hibridación in situ acoplado al Ensayo de Ligación Proximal (ISH-PLA).....	22
2.4. Western Blot de extracto celular	24
2.5. Extracción de ARN Citoplasmático y Total.....	26
2.6. RT, PCR y qPCR.....	27

RESULTADOS	32
3.1. Localización de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en el contexto de replicación de VIH-1 en células HeLa.	32
3.1.1. Hibridación in situ acoplado al Ensayo de Ligación de Proximidad (ISH-PLA) para determinar la proximidad entre el ARNm completo de VIH-1 y las lectoras de m ⁶ A YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1.	38
3.2. Determinación el efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 en la síntesis de Gag.....	40
3.2.1. Western Blot sobre extractos de células que expresan VIH-1 y Flag-YTHDC1 ..	41
3.2.2. Extracción de ARN Citoplasmático y Total	42
3.2.3. RT, -PCR y RT -qPCR.....	44
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	47
Expresión ectópica de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en contexto de la replicación viral en células HeLa.	49
Sobreexpresión transitoria de YTHDC1 en contexto de replicación viral en células HeLa ..	53
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Especificaciones del programa utilizado para el RT.....	28
TABLA 2. Especificaciones del programa utilizado para el PCR convencional en el termociclador.	28
TABLA 3. Especificaciones del programa utilizado para el Q-PCR.	30
TABLA 4. Listado de Partidores utilizados y sus secuencias correspondientes.	30
TABLA 5. Cuantificación del Peak de intensidad Banda para 28s y 18s en cada carril en la Figura 21.....	44

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Principales modificaciones químicas presentes en ARNm eucariontes.	2
FIGURA 2. Regulación de la expresión génica mediado por m ⁶ A.....	3
FIGURA 3. Representación de los dominios estructurales de las 5 proteínas pertenecientes a la familia YTH	5
FIGURA 4. Dinamismo del control post-transcripcional mediado por m ⁶ A y las proteínas YTHDF1, 2 y 3	7
FIGURA 5. Mecanismo de exportación nuclear mediado por YTHDC1	8
FIGURA 6. Representación gráfica de la partícula viral de VIH-1.	11
FIGURA 7. Organización genómica de VIH-1.	12
FIGURA 8. Ciclo replicativo de VIH-1.....	13
FIGURA 9. Esquema del vector pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1	20
FIGURA 10. Inmunofluorescencia indirecta de proteínas YTH en ausencia de VIH-1..	35
FIGURA 11. RNA-FISH, inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal de la localización del ARNm completo de VIH-1 y las proteínas YTH.....	36
FIGURA 12. Puntos de colocalización entre el ARNm completo de VIH-1 y las proteínas YTHs.....	36
FIGURA 13. Gráfico de Intensidad de fluorescencia roja asociada a la presencia y cantidad de proteínas YTH expresadas de manera ectópica en células HeLa.	37
FIGURA 14. Gráfico de Intensidad de Fluorescencia verde asociada a la presencia y cantidad del transcrito viral completo de VIH-1	37
FIGURA 15. Resultado de ISH-PLA.....	38
FIGURA 16. Gráfico de cuantificación de puntos por célula resultantes del ISH-PLA. .	40
FIGURA 17. Evaluación de la sobreexpresión de YTHDC1.	41
FIGURA 18. Western Blot de la Sobreexpresión de YTHDC1.....	42
FIGURA 19. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE1X de las extracciones de ARN.....	43
FIGURA 20. Gráfico del área bajo la curva de la medición de la intensidad de banda. .	44
FIGURA 21. Electroforesis en gel de Agarosa 1% en TBE1X de productos de RT-PCR convencionales mediante el uso de los primers contra Pre-GAPDH y GAPDH.....	45
FIGURA 22. Niveles de expresión relativa del ARNm completo de VIH-1 total y citoplásmico determinados mediante RT-qPCR.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

5'UTR	Región 5' no traducida
3'UTR	Región 3' no traducida
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIV	Virus de la Influenza Tipo A
ALKBH5	Dioxigenasa Número 5 Homologa a ALKB dependiente de Alpha-cetoglutarato
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNg	ARN genómico Viral
ARNm	ARN Mensajero
ARNt	ARN de Transferencia
BSA	Albumina de suero bovino
CAP	Estructura de Caperuza
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
eIF3	Factor Eucariótico de Inicio de la traducción 3
eIF4E	Factor Eucariótico de Inicio de la traducción 4E
FISH	Hibridación in situ Fluorescente
FTO	Proteína Asociada a la Obesidad y Masa Corporal
HCV	Virus de la Hepatitis C
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
METTL3	Proteína 3 de Tipo Metiltransferasa

METTTL14	Proteína 14 de Tipo Metiltransferasa
mg	Miligramo
mM	Milimolar
mL	Mililitro
NP-40	nonyl phenoxy polyethoxy ethanol
NXF1	Factor de Exportación Nuclear de ARN
ORF	Marco de Lectura Abierto
PBS	Buffer Fosfato Salino
PEI	Polietilenimina
PLA	Ensayo de Ligación Proximal
Pre-ARNm	ARNm Precursor
RCA	Amplificación de Círculo Rodante
RRE	Elemento de Respuesta a Rev
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SRSF3	Factor 3 de Corte y Empalme enriquecido en Serina y Arginina
SRSF10	Factor 10 de Corte y Empalme enriquecido en Serina y Arginina
SSC	Citrato de Sodio Salino
TBS	Solución salina Tris-tamponada
TBS-T	Solución salina Tris-tamponada con Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TSS	Sitio de inicio de la Transcripción
Tween 20	Polisorbato 20
Tris-HCL	Tris-Clorhidrato

VRC	Complejos de ribonucleósidos de vanadilo
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1
WTAP	Proteína Asociada al Tumor de Wilms
YTHDC1	Proteína 1 que Contienen el Dominio YTH
YTHDC2	Proteína 2 que Contienen el Dominio YTH
YTHDF1	Proteína 1, Miembro de la Familia de Dominio YTH
YTHDF2	Proteína 2, Miembro de la Familia de Dominio YTH
YTHDF3	Proteína 3, Miembro de la Familia de Dominio YTH
ZKV	Virus Zika
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

La epitranscriptómica es considerada una nueva rama de las ciencias biológicas que tiene como finalidad comprender la regulación de la expresión génica mediada por modificaciones químicas en el ARN. La N⁶-metiladenosina o m⁶A, es la modificación interna más abundante descrita en los ARNm. Los miembros de la familia de proteínas YTH han sido descritos como los principales encargados de reconocer la m⁶A presente en los ARNm y de ejecutar su función. Así, estas proteínas son conocidas como “lectoras” de m⁶A.

En la familia de proteínas YTH existen 5 proteínas de las cuales 4 son citoplasmáticas, (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC2) y una nuclear (YTHDC1). Mientras las proteínas citoplásmicas han sido asociadas con la regulación de la estabilidad, traducción o degradación de los ARNm que poseen m⁶A, el quinto miembro es nuclear y está involucrada con los procesos de corte y empalme alternativo y la exportación nuclear de ARNm metilados.

Debido a que en los últimos años se ha descrito la presencia de m⁶A en ARNm virales, como es el caso de VIH-1, es que ha surgido el estudio de la epitranscriptómica viral, campo donde es necesario investigar las funciones de las proteínas involucradas. En este contexto, existen datos controversiales en donde se ha reportado que YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 promueven la expresión génica de VIH-1 mediante el aumento de ARNm viral en las células infectadas e inhiben las etapas tempranas de la infección al inducir la degradación del genoma viral. Sin embargo, aún se desconoce si YTHDC1 o YTHDC2 regulan alguna etapa de la replicación de VIH-1.

En este trabajo se planteó determinar la localización y proximidad entre las proteínas lectoras de m⁶A y el ARNm de VIH-1 a través de hibridación *in situ* acoplada al ensayo

de ligación proximal (ISH-PLA), de las cuales se obtuvo como resultado que YTHDC1 e YTHDF1 interactúan con el ARNm de VIH-1 en la periferia nuclear y región citoplasmática, respectivamente. Mientras que en el caso de YTHDF2 e YTHDF3, las interacciones observadas, no nos permitieron determinar la localización exacta de estas, mediante ISH-PLA.

Una vez determinado esto, se escogió la proteína YTHDC1 como objeto de estudio. Se determinó el efecto de la sobreexpresión de esta lectora de m⁶A en la expresión génica viral analizando los niveles de la poliproteína Gag mediante Western blot y del ARN genómico mediante RT-qPCR. Aunque no se obtuvo consistencia en los resultados obtenidos, estos sugieren que YTHDC1 posiblemente promueve la exportación nuclear del ARN genómico de VIH-1.

ABSTRACT

The epitranscriptome is considered a new Branch of biology sciences that aims to understand the regulation of gene expression by chemical modifications on the RNA. The N⁶-methyladenosine or m⁶A, it is the most abundant inter modification described on the mRNA. The members of YTH proteins family have been described as the main responsible for recognizing m⁶A present on the mRNA and execute its function. So, these proteins are known as “readers” of m⁶A.

In the YTH protein family exist 5 proteins of which 4 are cytoplasmic, (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC2) and one nuclear (YTHDC1). Meanwhile cytoplasmic proteins have been associated with the stability regulation, translation or degradation of mRNA that m⁶A possesses, the fifth member is nuclear and is involved in the alternative splicing and the methylated mRNA nuclear export.

Because the presence of m⁶A on viral mRNA has been described in recent years, as in the case of HIV-1, the study of viral epitranscriptome has arisen, a field where it is necessary to investigate the functions of proteins involved. In this context, there are controversial data in where it has been reported that YTHDF1, YTHDF2 and YTHDF3 promote HIV-1 genetic expression by increasing viral mRNA in the infected cells and inhibit the early stage of infection by inducing the degradation of viral genome. However, it is still unknown if YTHDC1 or YTHDC2 regulate any stage of HIV-1 replication.

In this work planned to determine the location and proximity among m⁶A reading proteins and HIV-1 mRNA by *in situ hybridization* coupled to the proximal ligation assay (ISH-PLA), from which YTHDC1 was obtained as a result and YTHDF1 interact with HIV-1 mRNA in the nuclear periphery and cytoplasmic region, respectively. While in the case of YTHDF2 and YTHDF3, the observed interactions did not allow us to determine the exact location of these, through ISH-PLA.

Once it was determined, the YTHDC1 protein was chosen as the object of study. The effect of overexpression of this m⁶A reader in viral genetic expression was determined by analyzing the Gag polyprotein and genomic RNA by Western blot and RT-qPCR. Although no consistency was obtained in the results obtained, these suggest that YTHDC1 possibility promote the nuclear export of HIV-1 genomic RNA.

INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación epitranscriptómica de la expresión génica

El ARN mensajero (ARNm) constituye un intermediario en el flujo de la información genética en la célula, ya que es este el que transmite el mensaje del núcleo al citoplasma. Debido a la importancia que presentan en la célula los ARNs y específicamente el ARNm en el transporte de información y el control de la expresión genética, es que este ha sido un foco de estudio desde hace varias décadas (Sharp, 2009).

Gracias a los avances tecnológicos de los últimos años, es que se han implementado nuevas técnicas que facilitan el estudio del ARN. Dentro de las cuales destacan las nuevas técnicas de secuenciación que han permitido la determinar la topología y dinámica de nucleótidos modificados en los ARNm procariontes, eucariontes y virales (Saletore et al., 2012) (Limbach & Paulines, 2017).

El descubrimiento de estas modificaciones han permitido generar una nueva línea de investigación que ha instaurado el concepto de “Regulación epitranscriptómica” (Peer, Rechavi, & Dominissini, 2017; Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, & Soto-Rifo, 2017; Saletore et al., 2012), la cual se define como una nueva rama de la ciencias biológicas que hace alusión a la regulación de la expresión genética mediada por modificaciones químicas presentes en las moléculas ARN (Roignant & Soller, 2017).

Existen más de 100 tipos de modificaciones descritas en el ARN, de las cuales se pueden destacar la pseudouridina (Ψ) (DAVIS & ALLEN, 1957), la estructura del Cap o “Caperuza” (Shatkin, 1976) y la N⁶-metiladenosina (m⁶A) (Cha Mer Wei & Moss, 1977) (Figura 1). m⁶A corresponde a la modificación interna más abundante en los ARNm de

células eucariontes. siendo descrita en diversos organismos incluyendo plantas y virus (Horowitz, Horowitz, Nilsen, Munns, & Rottman, 1984).

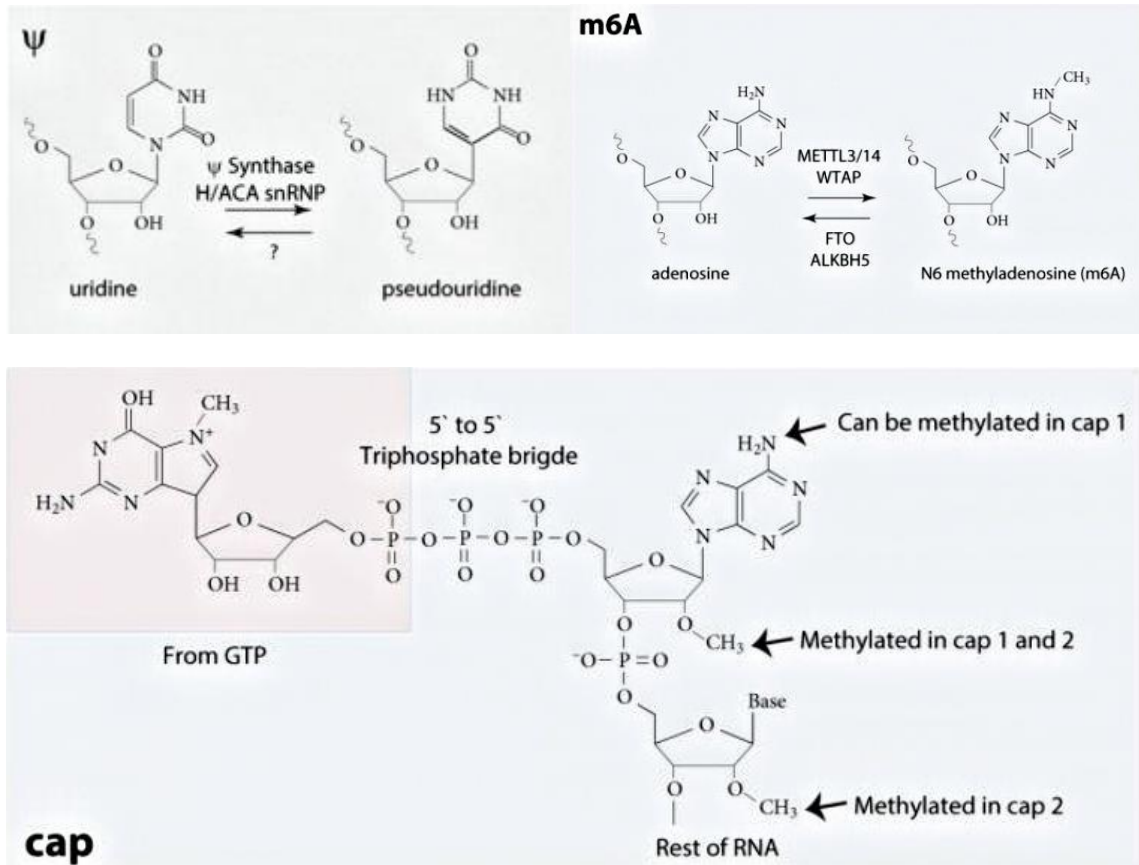


FIGURA 1. Principales modificaciones químicas presentes en ARNm eucariontes. Figura modificada y extraída (Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, & Soto-Rifo, 2017).

1.2. Proteínas y m⁶A

La m⁶A participa en la regulación de distintos procesos biológicos mediante su capacidad de intervenir en el metabolismo de los transcritos. A la fecha se ha descrito que la presencia de m⁶A puede influenciar el corte y empalme alternativo, exportación nuclear, traducción o la estabilidad del ARNm (Meyer & Jaffrey, 2017).

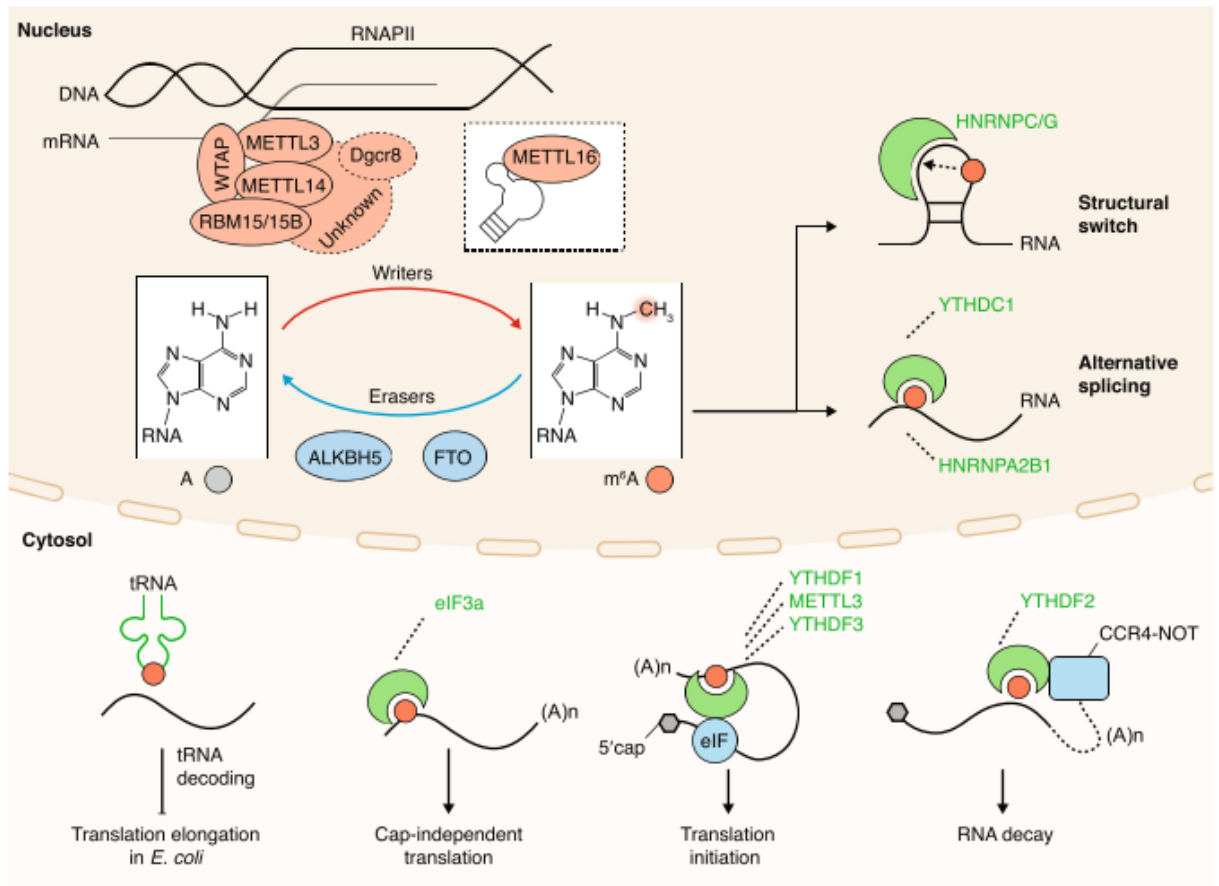


FIGURA 2. Regulación de la expresión génica mediado por m^6A (Hsu, Shi, & He, 2017).

La regulación asociada a m^6A involucra proteínas que incorporan la modificación o escritoras de m^6A , proteínas que remueven los grupos metilo de las adenosinas o borradoras de m^6A y proteínas lectoras de m^6A , las que reconocen el nucleótido metilado y ejercen una función (Figura 2).

1.3. Proteínas que mantienen y/o modifican m^6A

Las proteínas “escritoras” y “borradoras”, adicionan y eliminan m^6A , respectivamente. El complejo metiltransferasa encargado de metilar las adenosinas presentes en los ARNm

está compuesto principalmente por las proteínas tipo metiltransferasas 3 y 14, METTL3 y METTL14, respectivamente (Figura 2) (J A Bokar, Shambaugh, Polayes, Matera, & Rottman, 1997; Joseph A. Bokar, Rath-Shambaugh, Ludwiczak, Narayan, & Rottman, 1994). Las proteínas METTL3 y 14 conforman un hetero dímero clave para la deposición de m⁶A sobre el ARNm. METTL3 es el monómero catalíticamente activo, mientras que METTL14 cumple un rol en el reconocimiento de los residuos del ARNm que serán metilados (Liu et al., 2013; P. Wang, Doxtader, & Nam, 2016). Aunque en el complejo también se encuentra la proteína WTAP (Proteína asociada al tumor de Wilm's), esta no presenta actividad metiltransferasa pero sí afecta la deposición de m⁶A sobre el ARNm (Liu et al., 2013).

En el caso de las proteínas borradoras se encuentran las proteínas: FTO y ALKBH5, las cuales se encargan de remover el grupo metilo mediante la oxidación de la m⁶A, afectando el metabolismo del ARNm en el núcleo (Jia et al., 2011; Zheng et al., 2013).

1.4. Proteínas lectoras de m⁶A, la Familia YTH.

Por último, existen las proteínas catalogadas como lectoras, las cuales reconocen m⁶A y ejercen la función de esta. Dentro de estas proteínas lectoras se encuentran las proteínas pertenecientes a la familia YTH, las cuales presentan el dominio YTH capaz de unirse a m⁶A (Meyer & Jaffrey, 2017) (Figura 3).

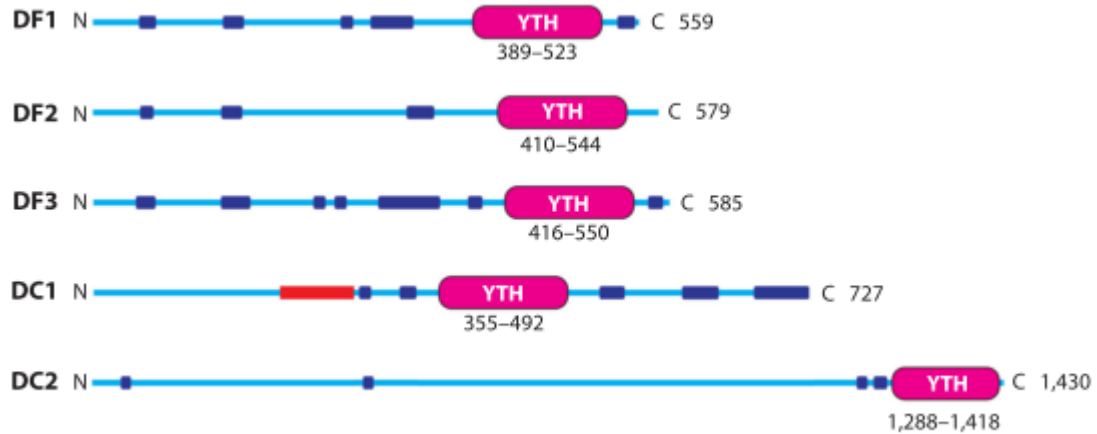


FIGURA 3. Representación de los dominios estructurales de las 5 proteínas pertenecientes a la familia YTH (Meyer & Jaffrey, 2017). El dominio YTH está representado en color magenta y corresponde a la región C terminal en DF1, DF2, DF3 y DC2 y la región interna de DC1.

En esta familia existen 5 proteínas, una de localización nuclear (YTHDC1) y las otras cuatro con localización citoplasmática (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC2). Estas proteínas han sido asociadas a la regulación del corte y empalme, exportación nuclear, traducción, decaimiento o estabilidad de los ARNms que contienen m⁶A (Du et al., 2016; Hsu et al., 2017; Roundtree et al., 2017; Roundtree & He, 2016a; Shi et al., 2017; X. Wang et al., 2015).

Específicamente, fue reportado que YTHDF1 reconoce los ARNms que presentan residuos de m⁶A cercanos al codón de término y el extremo 3'UTR, lugar donde se une. YTHDF1 facilita el inicio de la traducción de sus ARNm blanco al interactuar con el factor de inicio de la traducción eucariota 3 (eIF3), factor que permite el reclutamiento de los ribosomas sobre el sitio de inicio de la traducción (X. Wang et al., 2015).

Por otro lado, YTHDF2 reconoce ARNm que contienen m⁶A que no están siendo activamente traducidos e induce su degradación al destinarlos a los cuerpos de

procesamiento (*p-bodies*) o mediante el reclutamiento del complejo deadenilasa CCR4-NOT (Du et al., 2016; X. Wang et al., 2013)(Du et al., 2016)(Figura 2).

También se ha descrito que en condiciones de estrés térmico YTHDF2 es relocalizada al núcleo donde une residuos de m⁶A presentes en el extremo 5'UTR de transcritos inducidos por el estrés. Esta unión protege a los ARNm de la desmetilación mediada por FTO, lo que favorece su traducción (Zhou et al., 2016).

Para la proteína YTHDF3 ha sido descrito que favorece la traducción y el decaimiento de los ARNms metilados (Shi et al., 2017). YTHDF3 coopera con YTHDF1 en la traducción de los ARNm, al facilitar la unión de las subunidades ribosomales 40S y 60S (Shi et al., 2017). Por el contrario, YTHDF3 al cooperar con YTHDF2 promueve la degradación de los ARNm metilados, al contribuir a la especificidad de unión de YTHDF2 sobre m⁶A. YTHDF3 se une a los ARNms nacientes que presentan m⁶A antes que YTHDF1 e YTHDF2 favoreciendo la especificidad de estas dos proteínas (Figura 4) (Shi et al., 2017).

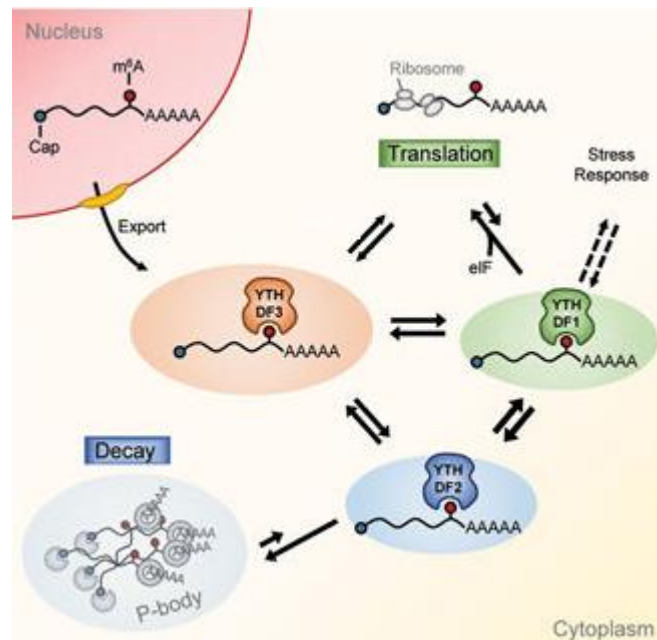


FIGURA 4. Dinamismo del control post-transcripcional mediado por m⁶A y las proteínas YTHDF1, 2 y 3. Figura extraída (Shi et al., 2017).

En el caso de la proteína YTHDC1 a diferencia de las otras proteínas de la familia YTH, presenta el dominio YTH en la región interna (Figura 3). YTHDC1 participa en el proceso de corte y empalme alternativo del pre-ARNm, al reclutar el factor de corte y empalme enriquecido en serina-arginina 3 (SRSF3) también conocido como SRp20 y evitando el reclutamiento de SRSF10 (SRp38) (Roundtree & He, 2016b). Además, YTHDC1 participa en la exportación nuclear de transcritos metilados, ya que la unión de SRSF3 a YTHDC1 favorece el reclutamiento del factor de exportación nuclear de ARNm, NXF1 (Figura 5) (Roundtree et al., 2017).

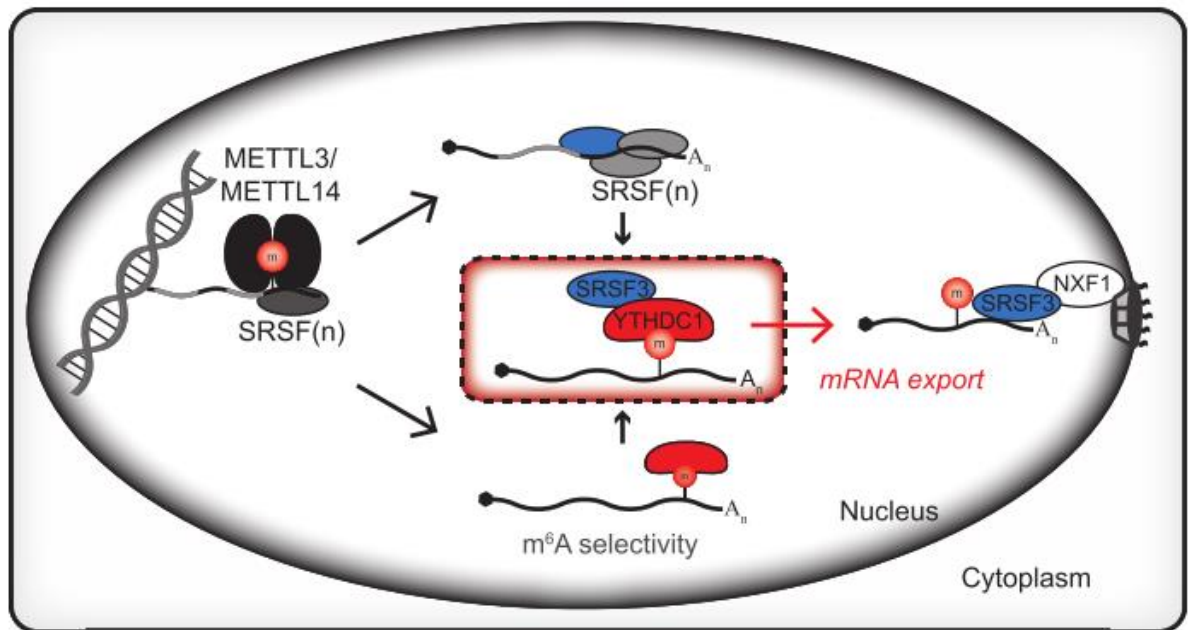


FIGURA 5. Mecanismo de exportación nuclear mediado por YTHDC1. Figura modificada y extraída (Roundtree et al., 2017).

Finalmente, YTHDC2 promueve la traducción de ARNm metilados durante la espermatogénesis (Hsu et al., 2017).

1.5. Proteínas YTH y su rol sobre ARNms Virales

En los ARN virales también se ha descrito la presencia de m^6A (Brocard, Ruggieri, & Locker, 2017; Gokhale & Horner, 2017; Pereira-Montecinos et al., 2017). Dentro de los cuales se destacan el virus de vacuna (C M Wei & Moss, 1975), Adenovirus (Furuichi, Morgan, Shatkin, & Darnell, 1976), virus del Sarcoma Aviar (Dimock & Stoltzfus, 1977), el virus de la influenza A (IAV) (Courtney et al., 2017; Krug, Morgan, & Shatkin, 1976), el virus de simio 40 (Finkel & Groner, 1983; Tsai, Courtney, & Cullen, 2018) y virus del Sarcoma de Rous (Kane & Beemon, 1985). En la actualidad también se ha reportado la

presencia de m⁶A en miembros de la familia *Flaviviridae* tales como el virus Zika (ZIKV) (Gokhale et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2016), el virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre amarilla, virus dengue y virus del Nilo occidental (Brocard et al., 2017; Gokhale & Horner, 2017; Pereira-Montecinos et al., 2017). La presencia de m⁶A también ha sido reportada en el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) perteneciente a la familia de *Retroviridae* (Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Gao, et al., 2016; Tirumuru et al., 2016) y en el virus asociado al Sarcoma de Kaposi (Ye, Chen, & Nilsen, 2017).

Como se mencionó anteriormente, los transcritos virales también presentan la modificación m⁶A, modificación que al igual que las presentes en los ARNm celulares, es reconocida por las proteínas lectoras pertenecientes a la familia YTH. Sin embargo, a la fecha no existe mucha información al respecto, ya que solo se ha descubierto su participación y/o rol en la regulación génica en cuatro virus; Virus Influenza A (IAV), HCV, ZKV y VIH-1 (Gokhale & Horner, 2017; Riquelme-Barrios, Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, & Soto-Rifo, 2018).

En el caso de IAV se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína YTHDF2 incrementa la expresión génica viral, replicación y producción de partículas virales (Courtney et al., 2017). Mientras que en HCV se ha demostrado que las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 relocalizan a las regiones denominadas “*gotas lipídicas*”, lugar en donde se lleva acabo el ensamblaje de la partícula viral. En HCV se ha demostrado, además, que el silenciamiento de estas proteínas, incrementa la producción viral (Gokhale et al., 2016).

En ZIKV, las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 regulan la estabilidad de los transcritos virales, las cuales al ser silenciadas incrementan la replicación de virus. Se

sugiere que la unión de estas y específicamente YTHDF2 a m⁶A, podría estar desestabilizando los ARNm virales (Lichinchi, Zhao, et al., 2016). Finalmente, en VIH-1 el funcionamiento y rol que cumplen estas proteínas en el ciclo replicativo del virus será abordado en profundidad en las siguientes secciones.

1.6. VIH-1

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, más conocido como VIH-1, fue descubierto hace más de 30 años (Barré-Sinoussi et al., 1983) y desde entonces ha cobrado más de 35 millones de vidas, a través de enfermedades asociadas al SIDA. Actualmente existen 36,7 millones de personas que viven con VIH-1, según el reporte publicado por la organización mundial de la salud y ONUSIDA el 2017. Esta información deja de manifiesto la relevancia y necesidad del estudio de este virus, con el fin de identificar nuevos blancos terapéuticos, drogas o una cura en el futuro.

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae* (Seitz, 2016), específicamente al género de los lentivirus. La familia *Retroviridae* está conformada por virus que presentan dos características propias: ARN monocatenario de polaridad positiva como genoma y la capacidad de replicar mediante una forma intermediaria de ADN bicatenario (Temin & Mizutani, 1970). Los Retrovirus pertenecientes al género lentivirus se caracterizan por establecer una infección persistente crónica (Sonigo et al., 1985).

VIH-1 consiste en una partícula viral (virión) que en su interior presenta un genoma de dos copias idénticas de ARN monocatenario de polaridad positiva. Cada copia de ARN presenta un largo aproximado de 9-10 kb (Muesing et al., 1985).

El virión es de carácter esférico y de un diámetro aproximado de 120nm, además en su superficie se encuentran glicoproteínas virales (gp120 y gp40) agrupadas en trímeros, que sobresalen de esta (Figura 6) (Seitz, 2016). Al interior del virión se encuentra la

cápside viral, estructura constituida por la proteína de la cápside (CA o p24) (Misselwitz, Hausdorf, Welfle, Höhne, & Welfle, 1995).

Al interior de la cápside se encuentran el genoma viral, la proteína de nucleocapside (NC) y las enzimas retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR) necesarias para los distintos procesos que permiten el flujo del ciclo replicativo del virus (Freed, 2015) (Watts et al., 2009).

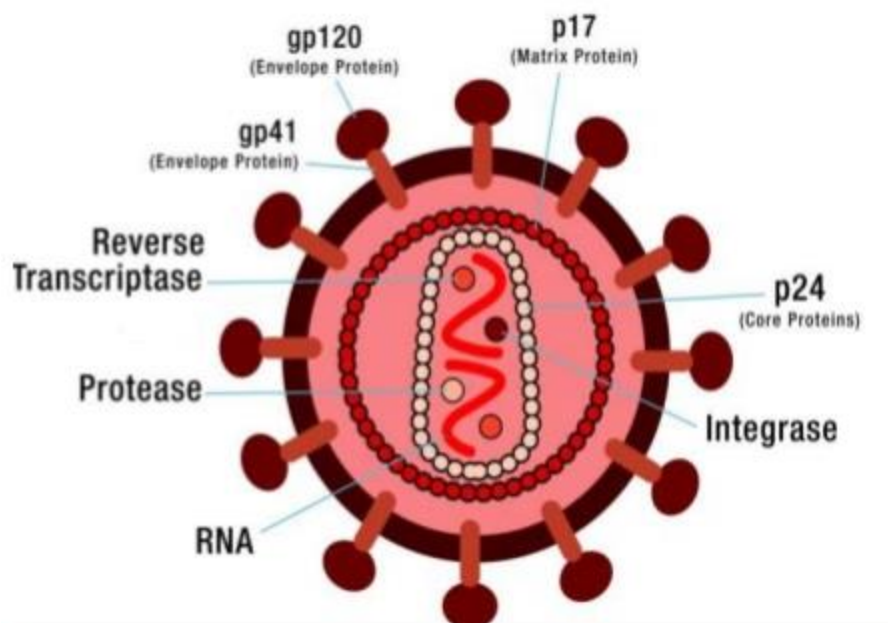


FIGURA 6. Representación gráfica de la partícula viral de VIH-1.

En el genoma de VIH-1 se encuentran contenidas las secuencias para 9 genes (Figura 7), los cuales serán traducidos en proteínas virales estructurales (Gag, Pol y Env) (Freed, 2015; King, 1994), regulatorias (Tat y Rev) (Bannwarth & Gatignol, 2005; O'Carroll et al., 2017) y accesorias (Vpr, Vif, Nef y Vpu) (Andrew & Strebel, 2014; Bour & Strebel, 2003; Pereira & DaSilva, 2016; Seelamgari et al., 2004). Estas proteínas son producto de 3 distintos tipos de poblaciones de ARNm virales, resultantes de un proceso de corte y empalme alternativo. Estos tres tipos de transcritos se clasifican

según su tamaño, siendo el primero de estos los ARNm totalmente procesados (2-kb), parcialmente procesados (4-kb) y no procesados (9-kb) (Felber, Zolotukhin, & Pavlakis, 2007).

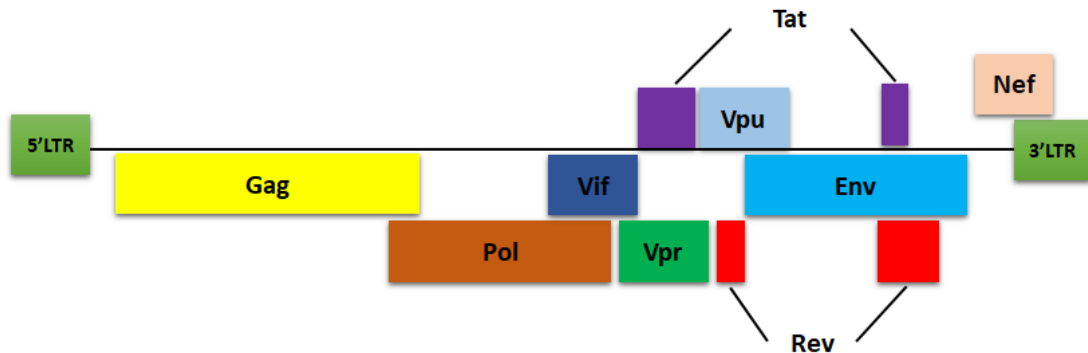


FIGURA 7. Organización genómica de VIH-1.

Los síntesis de transcritos de VIH-1 están regulados de forma temporal (Barre-Sinoussi, Ross, & Delfraissy, 2013; Karn & Stoltzfus, 2012) y una vez en el citoplasma, estos deben reclutar la maquinaria de traducción. Es aquí en donde toma relevancia para nosotros la presencia de m⁶A en los ARNm virales y la participación de las proteínas lectoras ya que ambos están involucrados en el proceso de regulación post-transcripcional en el ciclo replicativo del virus (Figura 8).

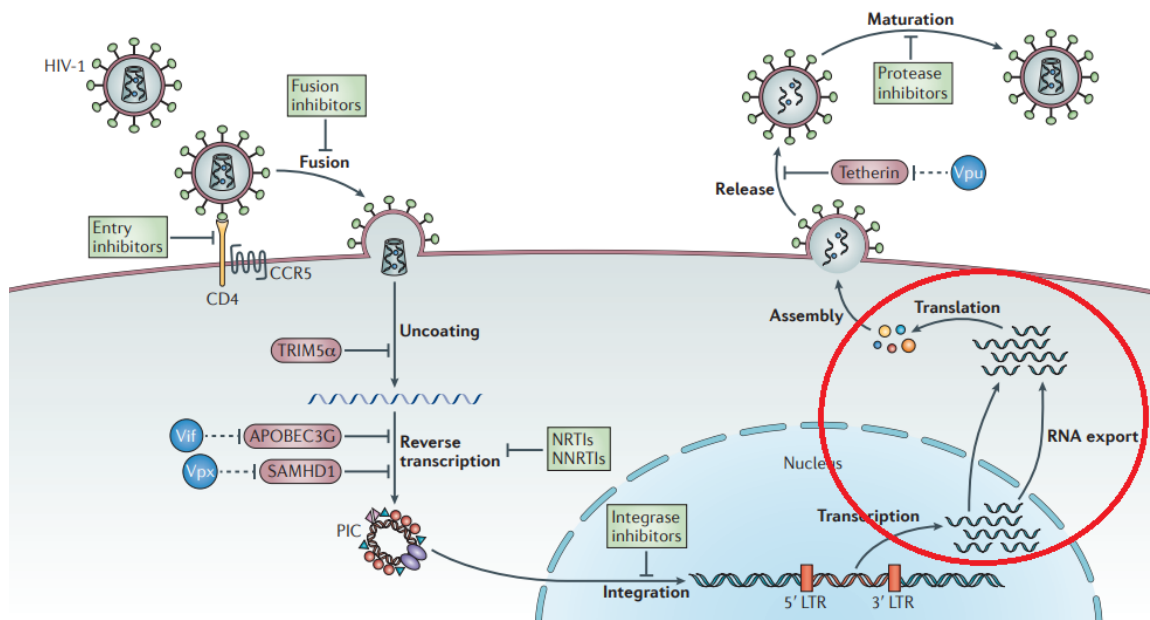


FIGURA 8. Ciclo replicativo de VIH-1. Encerrado en el círculo rojo, se encuentran las etapas del ciclo replicativo del virus involucradas en la regulación post-transcripcional. Figura extraída (Barre-Sinoussi, Ross, & Delfraissy, 2013).

1.7. Epitranscriptómica, YTHs y VIH-1

En el año 2016, tres grupos de investigación realizaron la identificación de los nucleótidos que presentaban m⁶A en el ARNm de VIH-1 (Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Gao, et al., 2016; Tirumuru et al., 2016). Estos trabajos también examinaron el efecto de la sobreexpresión y/o silenciamiento de las proteínas escritoras, borradores y/o lectoras de m⁶A sobre la replicación de VIH-1.

El primer grupo correspondiente al de Lichinchi y colaboradores evaluó el silenciamiento de las proteínas METTL3, METTL14, ALKBH5 y FTO en un contexto de infección viral. Se obtuvo como resultado que el silenciamiento de las proteínas escritoras disminuye la replicación viral al disminuir la producción de las proteínas gp120 y p24, respectivamente. Por otro lado, el silenciamiento de las proteínas borradoras aumentaba la replicación viral al aumentar la exportación nuclear del ARNm de env, incrementando

los niveles de este transcrito en el citoplasma (Lichinchi, Gao, et al., 2016). Además, se determinó que la presencia de m⁶A favorecía el reclutamiento de la proteína viral Rev a los transcritos virales lo que a su vez, promovía la exportación nuclear.

El segundo grupo correspondiente al de Kennedy y colaboradores quienes analizaron el impacto de la sobreexpresión las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 sobre la expresión génica de VIH-1. Se obtuvo como resultado un aumento de hasta 5 veces en la cantidad de p24 y hasta 2 veces para la proteína Nef, cuando se sobreexpresó YTHDF2 o YTHDF3, respectivamente. Mientras que cuando se sobreexpresó YTHDF1, solo se observó un aumento de hasta 2 veces para p24 y ningún cambio en los niveles de Nef. Además, en este trabajo se reportó mediante la técnica de PAR-CLIP la unión de las tres proteínas YTHDF en la región 3'UTR de los ARNm de VIH-1, lugar en donde se encuentra una gran cantidad de sitios con m⁶A. La unión al extremo 3'UTR favorece la replicación viral, al mejorar la expresión del transcrito completo y la producción de proteínas virales (Kennedy et al., 2016).

El tercer grupo de Tirumuru y colaboradores, reportó que las proteínas YTHDF reconocen la m⁶A presente en el ARNm de VIH-1 e inhiben la infección viral en células CD4⁺T y HeLa al inducir una degradación prematura del genoma viral, resultado contradictorio con el reportado por Kennedy en células 293T (Tirumuru et al., 2016).

Tirumuru y su grupo observaron que al sobreexpresar las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3, disminuía la infección de VIH-1 en las células aproximadamente hasta 10 veces. Mientras que el silenciamiento de estas aumentaba la infección hasta 14 veces más. Este efecto fue atribuido al reconocimiento de m⁶A presente en el ARN viral entrante por parte de las proteínas YTHDF, las que se propuso inducen la degradación

del ARN viral, dando como resultado una disminución de la infección viral en etapas tempranas.

En este trabajo, adicionalmente se confirmó que al silenciar las proteínas lectoras (METTL3 y METTL14) y las proteínas borradoras (ALKBH5 y FTO), se genera una disminución y un aumento en la síntesis de la proteína precursora Gag, respectivamente. Efecto observado anteriormente por Lichinchi y su grupo (Lichinchi, Gao, et al., 2016).

Los trabajos mencionados anteriormente han contribuido al entendimiento de la regulación epitranscriptómica en VIH-1. Los resultados, en conjunto, muestran un rol similar para m⁶A y las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 a nivel post-transcripcional, promoviendo la replicación viral.

En este trabajo analizamos las interacciones de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 con el ARNm completo de VIH-1 mediante las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (John, Birnstiel, & Jones, 1969; Pardue & Gall, 1969) y “ensayo de ligación proximal” (PLA) (Gullberg & Andersson, 2010). Adicionalmente, analizamos el efecto de la sobreexpresión de la proteína YTHDC1 sobre la síntesis del precursor Gag de VIH-1. Nuestros resultados muestran que el ARNm completo de VIH-1 se asocia con las proteínas lectoras de m⁶A en la periferia nuclear y/o en el citoplasma. Además, nuestros resultados sugieren que la proteína YTHDC1 promueve la síntesis de Gag al favorecer la acumulación citoplásmica del ARNm completo.

HIPÓTESIS

Las proteínas de la familia YTH se asocian al ARNm completo de VIH-1 para promover la síntesis de Gag.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las proteínas de la familia YTH se asocian al ARNm completo de VIH-1 para promover la síntesis de Gag.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Determinar la localización de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en el contexto de infección de VIH-1.
2. Determinar si el transcrito viral completo de VIH-1 forma parte de un complejo ribonucleoproteico con YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1.
3. Determinar el efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 en la síntesis de Gag.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en células HeLa.

2.1.1. Cultivo y sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en ausencia de replicación viral de VIH-1 para realización de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para el análisis de los niveles endógenos de las proteínas pertenecientes a la familia YTH (YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3), se utilizaron las células HeLa presentes en el laboratorio. A partir de esta se sembraron 80.000 células en medio de cultivo “Dulbecco’s modified Eagle médium” (DMEM; Life Technologies, 11965-092) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; sigma F2442-500ML) y 1% penicilina/streptomycin (Life Technologies, 15140-122) por pocillo con cover de 18mm, en una placa de 12 pocillos. Células que tras 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, fueron utilizadas en el ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

En el caso de la sobreexpresión de las proteínas de la familia YTH, se analizaron las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1. Para lo cual se realizó una expresión ectópica de estas en las células HeLa, las cuales fueron utilizadas en las mismas condiciones ya mencionadas anteriormente.

En cada transfección se utilizó 1µg de uno de los siguientes vectores: pCDNA3 Flag-YTHDF1 (Colección del laboratorio), pCDNA3 Flag-YTHDF2 (Addgene Plasmid #53200) (X. Wang et al., 2013), pCDNA3 Flag-YTHDF3 (Colección del laboratorio) o pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1 (Addgene Plasmid #85167) (Patil et al., 2016), dependiendo de las condiciones.

Condiciones que se transfectaron por duplicado utilizando Polietilenimina (PEI 3X; Polysciences, Inc., 23966) (Reed, Staley, Mayginnes, Pintel, & Tullis, 2006).

2.1.2. Sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en condiciones de replicación viral de VIH-1 para la realización de ISH-PLA.

Para la sobreexpresión de las proteínas pertenecientes a la familia YTH (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1), se utilizó los plásmidos correspondientes en la línea celular HeLa presente en el laboratorio. A partir de esta, se sembró 80.000 células en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% penicilina/streptomina por pocillo, en una placa de 12 pocillos. Cada pocillo presentaba un cover de 18mm en su interior.

Tras 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, se transfectó cada condición por duplicado mediante con PEI. Cada transfección consistió en 1µg de vector proviral pNL4.3, vector que contienen el genoma viral de VIH-1 (Adachi et al., 1986) y dependiendo la condición 1µg de uno de los siguientes vectores: pCDNA3 Flag-YTHDF1, pCDNA3 Flag-YTHDF2, pCDNA3 Flag-YTHDF3 o pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1, vectores que permiten la sobreexpresión para las proteínas Flag-YTHDF1, Flag-YTHDF2, Flag-YTHDF3 y Flag-YTHDC1, respectivamente.

2.1.3. Transfección en células HeLa con el vector proviral pNL4.3 y el vector pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1 para el análisis del efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 sobre la síntesis de la proteína precursora Gag.

Para la transfección se utilizó la línea celular HeLa, a partir de la cual se sembraron 100.000 y 200.000 células por pocillo en placas de 12 y de 6 pocillos, respectivamente. Tras 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, se transfectó por duplicado las células de una placa de 12 pocillos utilizando PEI 3X. La transfección se basó en distintas condiciones, las cuales consistieron en 0.3µg de vector proviral pNL4.3 más 1µg del vector pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1 (Figura 9) o en el caso del control 1µg del vector pCDNA3 d2EGFP (Colección del laboratorio).

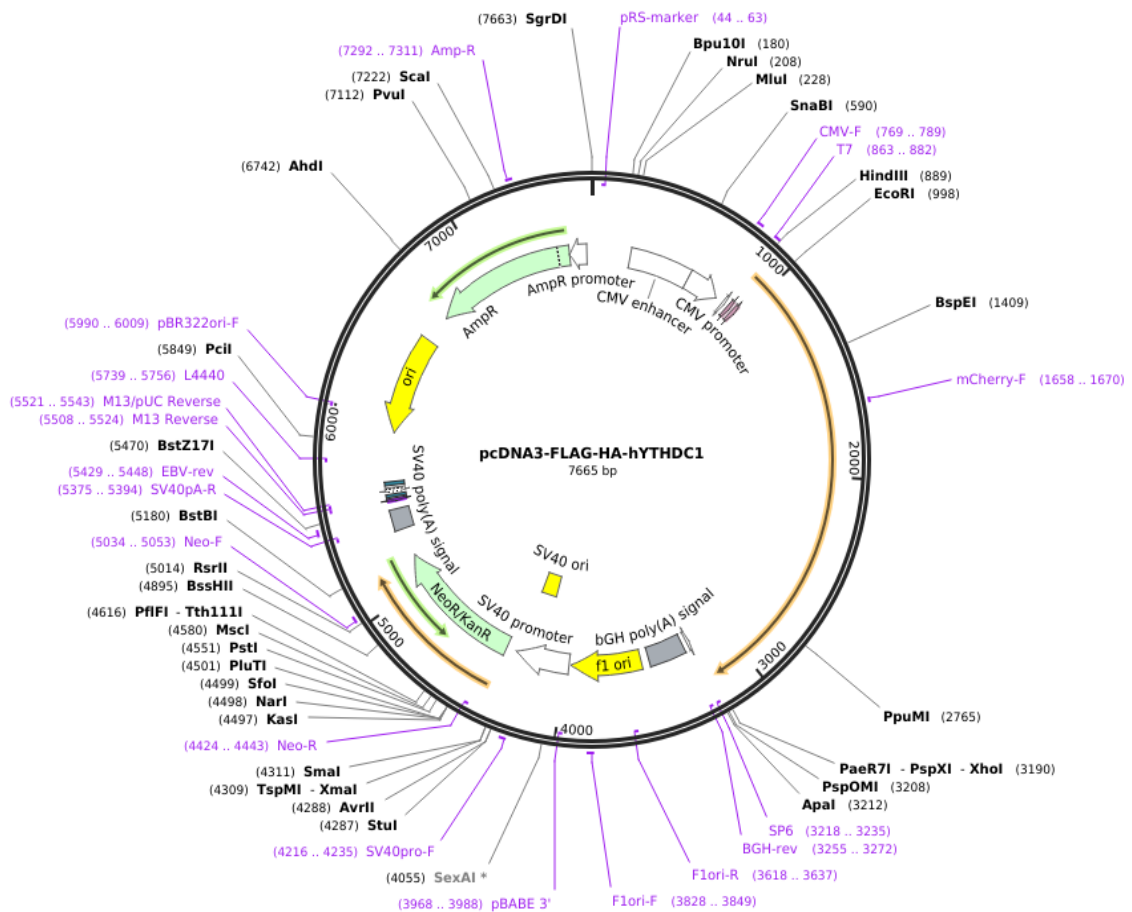


FIGURA 9. Esquema del vector pcDNA3 Flag/HA-YTHDC1 (Addgene #85167).

Tras 24 horas post transfección, se procedió a realizar un Western blot contra el epítipo Flag asociado a la proteína YTHDC1. Una vez determinada la capacidad para la detección del epítipo, se transfeció las mismas condiciones en células HeLa en una placa de 12 pocillos. Mientras que en paralelo se co-transfectó por duplicado, 2µg de vector pcDNA3 Flag/HA-YTHDC1 y 0.6µg del vector proviral pNL4.3 en los pocillos de una placa de 6 pocillos. En la placa de 12 se utilizó cada uno de los duplicados presentes para la realización del Western blot y dependiendo del resultado, los pocillos en la placa de 6 para realizar extracción de ARN tanto total y citoplasmático.

2.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

24 horas post transfección, las células HeLa se lavaron 2 veces con PBS 1X, tras lo cual se agregó 300 µl de PFA al 4% por 10 minutos para fijar las células. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se agregó 500µl de glicina 0.1M durante 10 minutos. Se removió la glicina y se lavó con PBS 1X durante 5 minutos. Se agregó 300µl de Triton X-100 al 0,2% por 5 minutos para permeabilizar y posterior a esto se lavó 3 veces con PBS 1X. Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente.

Se retiró el exceso de PBS 1X y se incubó con 30µl de la solución de bloqueo 1X para IFI ("DIG Wash and Block Buffer Set", Sigma-Aldrich 11585762001) preparada en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto, se procedió a incubar con la solución de anticuerpo primario correspondiente (Anti-YTHDF1, Rabbit Monoclonal 1:100 Santa Cruz Biotechnology, sc-86026; Anti-YTHDF2 Goat Polyclonal IgG 1:100 Santa Cruz Biotechnology, sc-162427; Anti-YTHDF3 Mouse Monoclonal IgG 1:100 Santa Cruz Biotechnology, sc-377119 o anticuerpo Anti-Flag Rabbit IgG 1:100 Sigma-Aldrich) en la solución de bloqueo 1X para IFI durante 60 minutos en cámara húmeda a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Una vez terminado el paso anterior, se procedió a lavar con PBS 1X e incubar con la solución de anticuerpos secundarios correspondiente (Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit 1:500 (Life Technologies, A67465), Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Rabbit 1:500 (Life Technologies, A21207), Alexa Fluor 647 Rabbit Anti-Goat 1:500 (Life Technologies, A27018), Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse 1:500 (Life Technologies, A21202) o Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rat 1:500 (Life Technologies, A32723), en solución de bloqueo 1X por 60 minutos en cámara húmeda a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Los covers se lavaron con PBS 1X dos veces durante 10 minutos y se incubaron con solución de DAPI 1X (0.3µg/ml en PBS 1X; Life Technologies, d1306) durante 1 minuto a temperatura ambiente y oscuridad. Tras lo cual se lavó 2 veces con PBS 1X y 1 vez con H₂O. Una vez terminado esto, los covers se dejaron secando a temperatura ambiente y oscuridad, para una vez secos montarlos sobre los portaobjetos con 10µl de solución de montaje “Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium” (Sigma-Aldrich, F4680-25ml).

Las células fijadas fueron analizadas en el microscopio Confocal Leica TPS SP8 (Leica Microsystems), equipo perteneciente al Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor.

Las imágenes fueron adquiridas mediante el modo XYZ y tuvieron como dimensión 1024x1024 pixeles. El lente objetivo utilizado para observar los fluorocromos asociados a los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 647), fue de 63x. Finalmente las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ y su complemento FIJI.

2.3. Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) e Hibridación *in situ* acoplado al Ensayo de Ligación Proximal (ISH-PLA)

24 horas post transfección las células HeLa se lavaron 2 veces con PBS 1X, tras lo cual se agregó 300µl de PFA al 4% por 10 minutos. Se lavó 3 veces con PBS 1X, se agregó 300µl de Triton X-100 al 0,2% por 5 minutos y posterior a esto se lavó 3 veces con PBS 1X.

Se retiró el exceso de PBS 1X y se procedió a la incubación de los covers con 30µl del mix de hibridación (10% Dextransulfato, 2mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa , 50%

formamida, 300µg de ARNt, 50ng de sonda marcada con 11-Diogoxigenin-UTP (Soto-Rifo, Rubilar, & Ohlmann, 2013). La incubación fue de 24 horas en cámara húmeda a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Una vez terminado el paso anterior, se procedió a incubar durante 30 minutos a 50°C con una solución de 0.2X SSC, 50% formamida en el hibridador HybEZ™ Oven (Advance Cell Diagnostics), con el fin de retirar el exceso de sonda no hibridada. Una vez retirada la solución de 0.2X SSC, 50% formamida, se lavó 3 veces con el buffer de dilución de anticuerpos para ISH-PLA (2X SSC, 2m VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa, 8% formamida).

Se incubo con la solución de anticuerpos primarios (2X SSC, 2m VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa, 8% formamida, anticuerpo Anti-Flag Rabbit IgG 1:100 (Sigma-Aldrich, 406401) y Anti-Digoxigenin mouse monoclonal 1:100 (Roche Life Sciences) durante 120 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con el buffer de dilución de anticuerpos para ISH-PLA.

Para realizar solo un FISH, se realizó la incubación de los covers con la solución de anticuerpos secundarios para FISH (2X SSC, 2m VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa, 8% Formamida, anticuerpo Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Rabbit 1:500 (Life Technologies, A21202) y Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse 1:500 (Life Technologies, A21207). La incubación con la solución de los anticuerpos secundarios fue de 60 minutos a temperatura ambiente

En el caso de realizar un ISH-PLA las muestras se incubaron con 10µl de solución de anticuerpos secundarios para ISH-PLA (2µl de Probe Anti-Mouse MINUS (Sigma-Aldrich, DUO92004), 2µl de Probe Anti-Rabbit PLUS (Sigma-Aldrich, DUO92002), 6µl buffer de dilución de anticuerpos para ISH-PLA), durante 60 minutos en cámara húmeda

a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se lavó 3 veces con PBS 1X. Se incubó con la solución de ligación (2µl Buffer de ligación (Duolink, 82009), 0.25µl de Ligasa (Duolink, 82027), 7.75µl de H₂O ultra pura) durante 30 minutos a 37°C en el hibridizador HybEZ™ Oven. Se lavó 3 veces con PBS 1X y se incubó con 10µl de solución RCA (1x Amplification Red (Duolink, 82011), 0.125 µl Polimerasa 1X (Duolink, 82028), 7.875 µl de H₂O ultra pura) durante 100 minutos a 37°C en oscuridad.

Finalmente tanto para FISH como para ISH-PLA, las muestras se incubaron con solución de DAPI 1X durante 1 minuto a temperatura ambiente y oscuridad. Se lavó 2 veces con PBS 1X y 1 vez con H₂O. Una vez terminado esto, los covers se dejaron secando a temperatura ambiente y oscuridad, para una vez secos, montarlos sobre los portaobjetos con 10µl de solución de montaje “Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium”.

Las células fijadas fueron analizadas en el microscopio Confocal Leica TPS SP8 (Leica Microsystems), equipo perteneciente al Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor.

Las imágenes fueron adquiridas mediante el modo XYZ y tuvieron como dimensión 1024x1024 pixeles. El lente objetivo utilizado para observar los fluorocromos asociados a los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594), fue de 63x. Finalmente las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ y su complemento FIJI.

2.4. Western Blot de extracto celular

24 horas post transfección se retiró el medio de las células y se lavó 3 veces con PBS 1X. Las células se recuperaron con 1.5ml de una solución de PBS 1X con 50mM EDTA

en hielo durante 5 minutos. Se recuperaron las células en la solución y se centrifugaron a 857 x g durante 5 minutos.

Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet de cada condición, se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis celular (100mM NaCl, 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, Coctel de Inhibidor de Proteasas (Roche, 05 892 791 001) e inhibidor de ARNasa (Life Technologies)).

Los extractos fueron cuantificados mediante el método de Bradford (Hammond & Kruger, 1988) en el equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). Una vez determinadas las concentraciones, se desnaturó 25 µg de proteínas totales por muestra, mediante la adición del Buffer de Carga 5X (20% Glicerol, 10% SDS, 25% β-Mercaptoetanol, 0.125M Tris-HCL pH 6.8, 0.0625% Azul de Bromofenol) y posterior incubación a 95 °C durante 5 minutos en el Baño Seco (Benchmark, BSH1001).

Una vez desnaturadas las muestras, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% durante 90-120 minutos a un voltaje constante de 120 V. Posterior a esto, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (BioRad) durante 120 minutos a amperaje constante de 400 mA.

Tras la transferencia, se procedió a incubar la membrana con la solución de bloqueo Blotting-Grade Blocker (BioRad) preparada al 5% en TBS-T (TBS 1X, 1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó 1 vez con TBS-T 1X y se incubó toda la noche en agitación con la solución de dilución de anticuerpos (solución de bloqueo al 0,5% en TBS-T más el anticuerpo correspondiente) con Anti-HA Mouse Monoclonal 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-392) o Anti-HIV-1 p24 Monoclonal 1:3000 (NIH AIDS Reagents Program, 183-H12-5C), para la sobreexpresión

de pCDNA3 Flag/HA-YTHDC1 y el reconocimiento de la proteína de Capside de VIH-1 (p24), respectivamente.

Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente, con la solución de dilución de anticuerpo secundario con HRP Anti-Rat IgG (BioLegend, 405405) o HRP Anti-Mouse IgG diluido 1:5000 (BioLegend, 405306). Finalmente, se lavó 3 veces con TBS-T y se procedió a revelar las membranas mediante el kit de revelado "Pierce® ECL Western Blotting Substrate" (Thermo Fisher Scientific, 32106) y el uso del scanner de quimioluminiscencia C-Digit® Blot Scanner (Li-Cor) y/o film Kodak en una habitación oscura.

2.5. Extracción de ARN Citoplasmático y Total

24 horas post transfección de células HeLa que se sembraron en placa de 6 pocillos, se retiró el medio de estas y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Las células se soltaron mediante 1.5ml de una solución de PBS 1X con 50mM de EDTA en hielo durante 5 minutos. Se recuperaron las células en la solución y se centrifugaron a 857xg durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante manteniéndose el pellet.

El pellet se resuspendió rápidamente en 200µl de Buffer RLNA (10mM Tris-HCL pH 8.0, 10 mM NaCL, 3mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5% NP40, 2mM VRC) y se centrifugó a 2380 x g por 5 minutos para la extracción citoplasmática. En el caso de la extracción total, las muestras no fueron sometidas a centrifugación.

Tras la centrifugación, se recuperaron aproximadamente 200µl de los sobrenadantes de las muestras para la extracción citoplasmática. Se agregó 1ml de Trizol a cada muestra tanto de la extracción de ARN citoplasmática como extracción ARN total y se sometieron a vortex durante 30 segundos. Tras el primer vortex, se agregó 200µl de cloroformo y se

aplicó vortex durante 30 segundos, posteriormente se centrifugaron a 9520 x g durante 5 minutos. Se recuperó aproximadamente 450µl de la fase acuosa y a esta se agregó un volumen equivalente de isopropanol, se aplicó vortex durante 30 segundos.

Las muestras se centrifugaron a 16089 x g durante 20 minutos a 4°C, tras lo cual se retiró sobrenadante y los pellets se lavaron con 500µl de etanol al 70% mediante una centrifugación a 16089 x g durante 10 minutos a 4°C.

Se recuperó el pellet y se le agregó 17µl de H₂O, 2µl de Buffer de DNasa Turbo y 1µl de DNasa Turbo (Life Technologies, AM1907). La solución se resuspendió y se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos en baño seco. Una vez terminado este tiempo, se agregó 1µl de inactivador de DNasa Turbo, se resuspendió y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional.

Finalmente se centrifugo durante 1.5 minutos a 10000 x g y se recuperó el sobrenadante. Una vez obtenido el sobrenadante (ARNs) fue cuantificado en el equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader. Una vez cuantificado la cantidad de ARN total en las muestras, estas se sometieron a un análisis de integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE 1X y el posterior análisis de intensidad de bandas mediante el programa ImageJ.

2.6. RT, PCR y qPCR

Una vez determinada la concentración de las extracciones de ARN citoplasmático y total, se tomó 300ng de ARN y se llevó a un volumen final de 5µl. Utilizando este volumen, se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) con el kit High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, 4368814) y el programa especificado en la Tabla 1, con el fin de obtener ADNc.

TABLA 1. Especificaciones del programa utilizado para el RT.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (m)
Unión de partidores	25	5
Transcripción Reversa	37	60
Denaturación de la enzima	85	5
Mantenición	4	∞

La mezcla de reacción ocupada para el RT consistió en un volumen de 20µl por muestra, conformado por: 9.2µl de H₂O libre de nucleasas, 2µl de RT Buffer, 0.8µl dNTPs Mix 100mM, 2µl 10X RT Random Primers, 1µl de 10X Multistrike y 5µl de muestra de ARN.

El ADNc obtenido se empleó como base para realizar un PCR convencional para amplificar un fragmento de GAPDH y pre-GAPDH, el cual consistió por muestra en: 2.5µl de ADNc, 7.5 µl de GoTaq® Green Master Mix 2X, 4µl de H₂O y 0.5µl de cada uno de los partidores (10 mM) dependiendo el caso. El programa utilizado para la realización del PCR, se encuentra descrito en la Tabla 2 y los partidores utilizados se encuentran en la Tabla 3.

TABLA 2. Especificaciones del programa utilizado para el PCR convencional en el termociclador.

PCR	NUMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)
Desnaturalización	1	95	120
	25	95	80
Alineamiento	25	55	30
Polimerización	25	72	120
Ciclo Final	1	72	300
	1	4	∞

Dependiendo del resultado obtenido se realizó un PCR en tiempo real mediante el uso del kit “Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix” (Agilent Technologies, 600828.), el protocolo adecuado (Tabla 4) y el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

TABLA 3. Listado de Partidores utilizados y sus secuencias correspondientes.

Partidor	Forward (Fwd)	Reverse (Rev)
Pre-GAPDH	5' - CCACCAACTGCTTAGCACC -3'	5' - CTCCCCACCTTGAAAGGAAAT- 3'

GAPDH	5`- TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT -3`	5`- TTCTCAGCCTTGACGGTGCCA -3`
VIH-1 ARNg	5`- TACAGGAGCAGATGATACAG -3`	5`- CCTGGCTTTAATTTTACTGG - 3`

TABLA 4. Especificaciones del programa utilizado para el PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real	NUMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (S)
Desnaturalización	1	95	600
	40	95	15
Alineamiento	40	60	15
Polimerización	40	72	15
Ciclo Final	1	95	15
	1	65	30
	1	95	30

El mix utilizado para la realización del PCR en tiempo real consistió por muestra en: 12.5µl de Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, 600828-51), 0.4µl de mix de partidores (10 mM cada uno), 5µl de ADNc y 7.1µl de H₂O libre de nucleasas. Los partidores utilizados se encuentran indicados en la Tabla 3 (VIH-1 ARNg y GAPDH) y tenían como blanco el ARNm completo de VIH-1 y el gen GAPDH (Tabla III). Este último fue utilizado como control basal de expresión relativa, lo cual nos permitió determinar el

radio de expresión relativa entre ARNg VIH-1 y GAPDH a nivel de ARN total y citoplasmático.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de ΔC_T (Schmittgen & Livak, 2008), en el cual la eficiencia de cada partidor es elevada a diferencia entre los C_T obtenidos para cada condición y los C_T resultantes del gen control. La realización de este método nos permitió obtener una magnitud arbitraria para cada muestra, que además se encuentra normalizada en función de los niveles de expresión del gen control. A partir de esta magnitud se pudo establecer la relación entre los niveles de expresión relativa entre ARNm completo de VIH-1 y GAPDH a nivel total como citoplasmático para las sobreexpresiones de GFP y YTHDC1, determinándose el efecto de la sobreproducción de estas proteínas sobre el transcrito viral.

Finalmente los niveles de expresión relativa de ARNm viral de VIH-1 tanto a nivel total como citoplasmático para la sobreexpresión de GFP, constituyen el 100% de la expresión normal en la célula, Ya que este no afecta los niveles de expresión de ARNm de VIH-1. El programa utilizado para la realización del PCR en tiempo real se encuentra detallado en la Tabla 4.

RESULTADOS

3.1. Localización de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en el contexto de replicación de VIH-1 en células HeLa.

Los resultados obtenidos para el ensayo de inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal muestran que mientras Flag-YTHDF1, Flag-YTHDF2 y Flag-YTHDF3 localizan exclusivamente en el citoplasma al igual que sus contrapartes endógenas (Figura 10, comparar endo- con Flag-). Además, en la Figura 10 también observamos que Flag-YTHDC1 localiza exclusivamente en el núcleo tal cual ha sido reportado (Roundtree & He, 2016a).

Para observar la localización de las proteínas Flag-YTHDF1, Flag-YTHDF2, Flag-YTHDF3 y Flag-YTHDC1 en el contexto de replicación de VIH-1, se realizó la expresión ectópica de estas proteínas a partir de vectores de expresión transfectados en la línea celular HeLa junto al vector proviral pNL4.3 el cual contiene la secuencia completa del genoma de VIH-1. Se procedió a realizar ensayos de RNA-FISH para detectar el ARNm completo viral e inmunofluorescencia para detectar la etiqueta Flag de cada proteína. La adquisición de imágenes se realizó mediante microscopía confocal (Figura 11). Los resultados obtenidos muestran que en células que expresan VIH-1, las proteínas lectoras de m⁶A no experimentan cambios en sus patrones de localización. Es decir, mientras YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 localizan exclusivamente en el citoplasma, YTHDC1 presentó una localización exclusiva en el núcleo (Figura 11). El ARNm completo de VIH-1 presentó una localización predominante en el citoplasma. Análisis de colocalización efectuados con el software ImageJ indican puntos de colocalización entre el ARNm viral y las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 en el citoplasma mientras fue posible observar puntos de colocalización con YTHDC1 en el núcleo (Figura 12). Análisis de la intensidad de fluorescencia para las señales roja (Flag-YTH) y verde (ARNm completo

de VIH-1) revelan que no existen mayores diferencias en los niveles de expresión en cada condición (Figuras 13 y 14). Estos resultados sugieren que la presencia de VIH-1 no altera la distribución subcelular de las lectoras de m⁶A analizadas y estas colocalizan con el ARNm completo viral en el compartimento celular en el que residen.

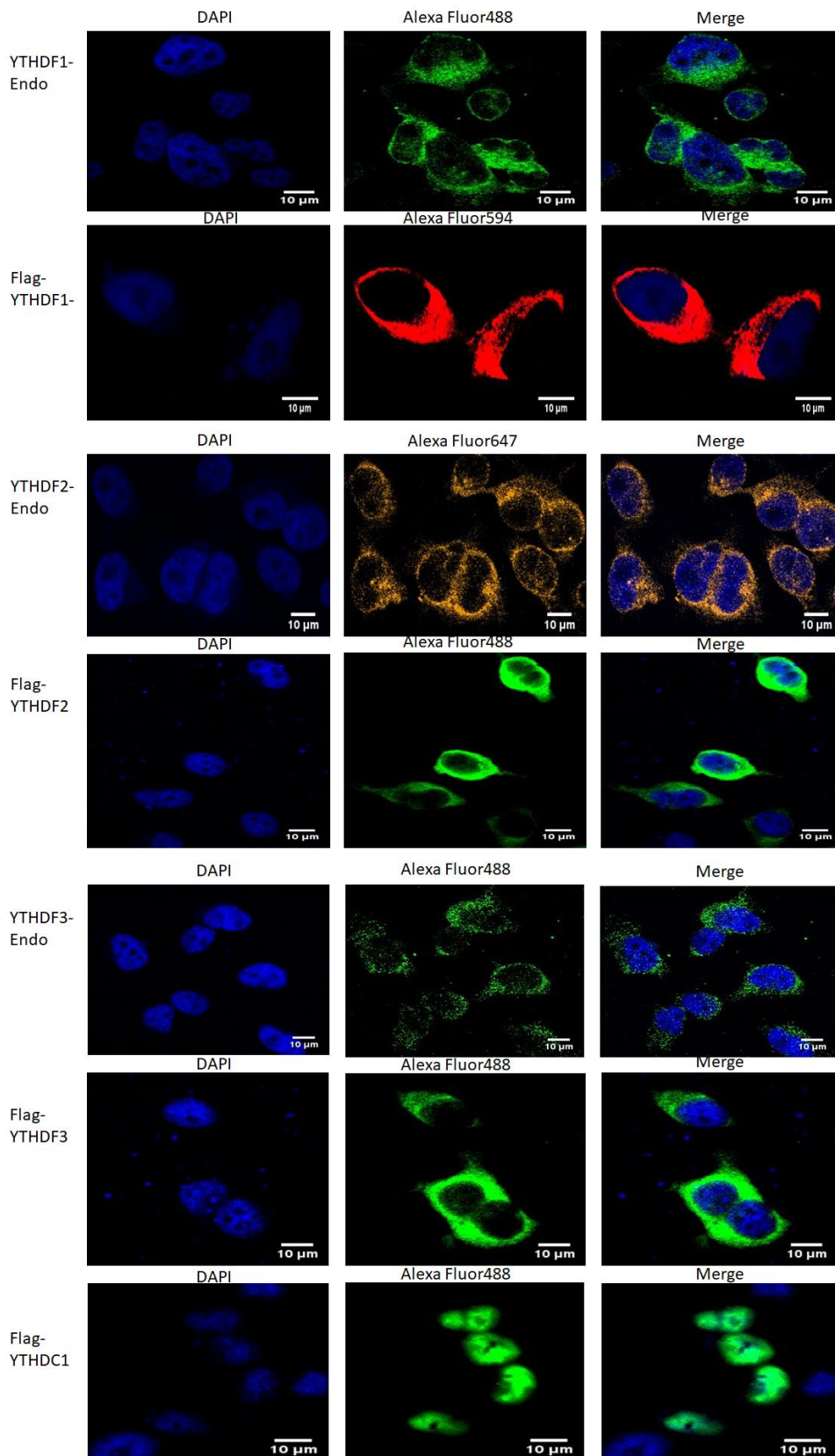


FIGURA 10. Inmunofluorescencia indirecta de proteínas YTH en ausencia de VIH-1. Al costado de cada imagen se encuentra indicada la proteína ya sea endógena (endo-) o expresada de forma ectópica (Flag-). Las imágenes de la izquierda corresponden resultado de la tinción con solución DAPI 1X. En la del centro se encuentra el resultado de la IFI asociada a la presencia de la proteína indicada, mediante el uso de un anticuerpo indicado en el borde superior de la imagen. Finalmente, en la columna de la derecha se encuentra el resultado de la sobreposición de las imágenes de la izquierda y centro.

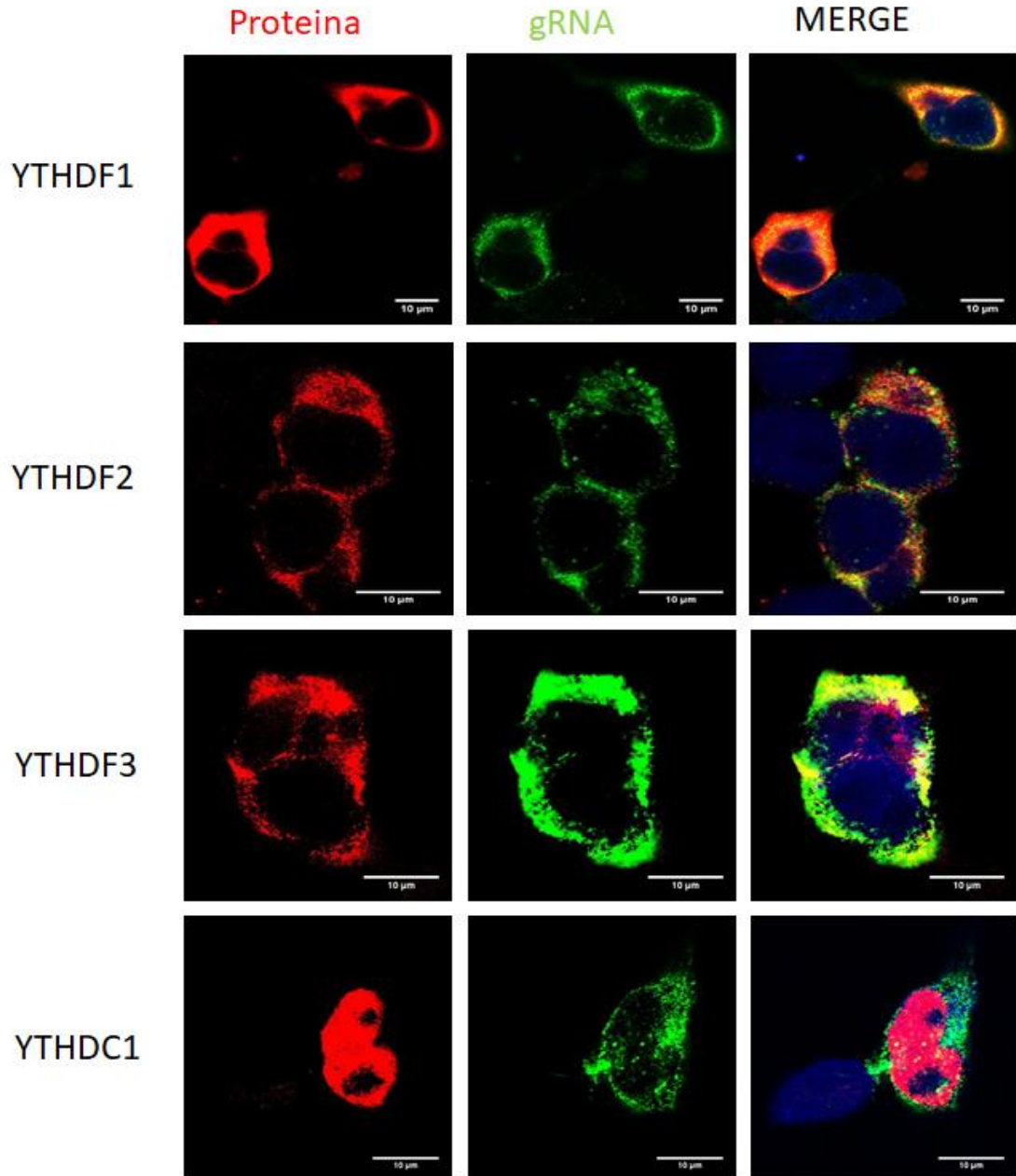


FIGURA 11. RNA-FISH, inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal de la localización del ARNm completo de VIH-1 y las proteínas YTH. Se muestra cada proteína en rojo (imágenes de la izquierda) y el ARN completo de VIH-1 en verde (imágenes centrales). La sobreposición incluyendo la tinción con DAPI se muestra a la derecha.

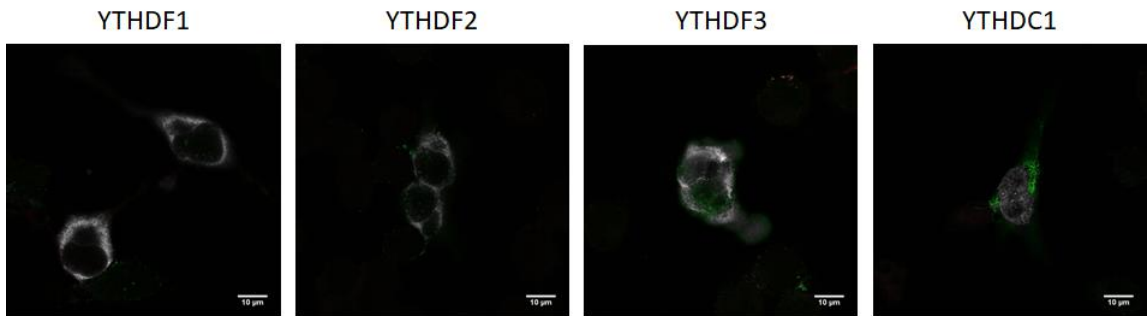


FIGURA 12. Puntos de colocación entre el ARNm completo de VIH-1 y las proteínas YTHs. Estos resultados fueron analizados y generados mediante el programa ImageJ con su complemento FIJI.

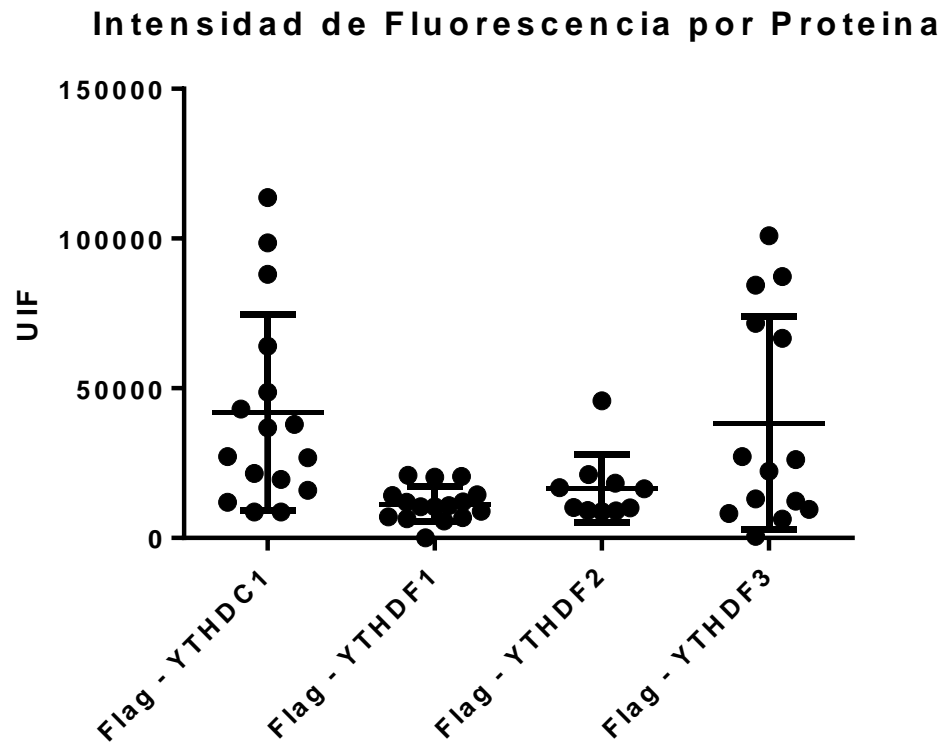


FIGURA 13. Gráfico de Intensidad de fluorescencia roja asociada a la presencia y cantidad de proteínas YTH expresadas de manera ectópica en células HeLa. El grafico fue generado a partir de los datos obtenidos mediante Image J y el programa Prism 7.

Intensidad de Fluorescencia de ARNm completo de VIH-1

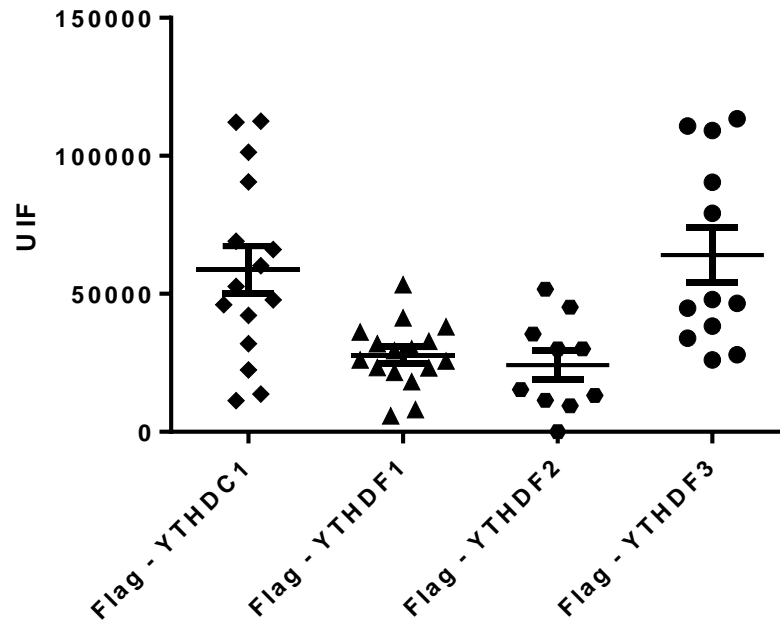


FIGURA 14. Gráfico de Intensidad de Fluorescencia verde asociada a la presencia y cantidad del transcrito viral completo de VIH-1. El grafico fue generado a partir de los datos obtenidos mediante Image J y el programa Prism 7.

Si bien los ensayos de colocalización obtenidos a partir de imágenes adquiridas por microscopia confocal son un buen indicador para saber si ambas señales estan en un mismo plano, estos no son un indicador real de una interacción ARN-proteína o de la presencia de ambos componentes en un mismo complejo ribonucleoproteico.

3.1.1. Hibridación *in situ* acoplado al Ensayo de Ligación de Proximidad (ISH-PLA) para determinar la proximidad entre el ARNm completo de VIH-1 y las lectoras de m⁶A YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1.

Con el fin de esclarecer si el ARNm completo de VIH-1 se encuentra formando complejos con las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 utilizamos la técnica de ISH-PLA desarrollada recientemente en nuestro laboratorio para el estudio de la proximidad entre el ARNm completo y proteínas de interés (Toro-Ascuy et al., 2018). Este ensayo toma ventaja de nuestro protocolo estandarizado de RNA-FISH empleado para estudiar la localización subcelular del ARNm completo de VIH-1 (Fröhlich et al., 2016; Soto-Rifo et al., 2013; Toro-Ascuy et al., 2018) con el ensayo de PLA, el cual fue desarrollado para identificar interacciones entre proteínas que presenten una proximidad menor a 40nm (Gullberg & Andersson, 2010). De esta forma, un resultado positivo de proximidad entre el ARNm completo y una proteína de interés se observa como un punto rojo mediante microscopía confocal.

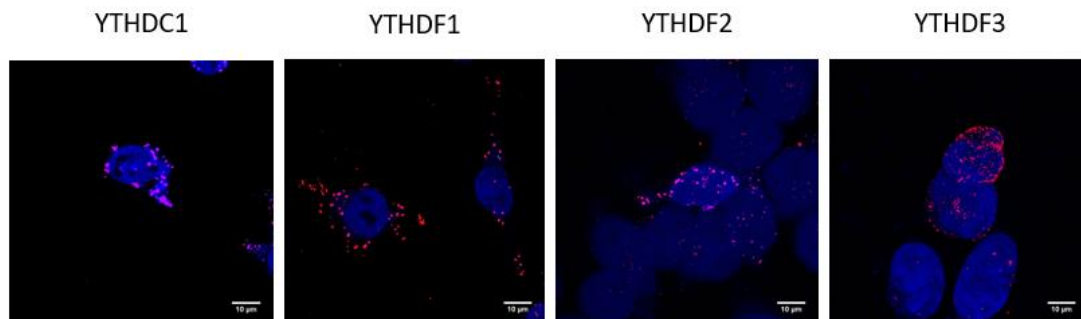


FIGURA 15. Resultado de ISH-PLA. De izquierda a derecha, se encuentran los resultados de PLA para YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3, donde la presencia de los puntos de color rojo indican proximidad entre las proteínas de la familia YTH con el transcrito viral completo de VIH-1 a una distancia igual o menor a 40nm.

Los resultados obtenidos mediante ISH-PLA indican que el ARNm completo de VIH-1 forma complejos con todas las lectoras de m6A analizadas (Figura 15). Sin embargo, mientras que los complejos formados con YTHDF1 se observan principalmente en el citoplasma, los complejos que contienen YTHDC1 se observan principalmente en la región perinuclear (Figura 15). Sin embargo para el caso de YTHDF2 e YTHDF3, los complejos observados no nos permitieron determinar de forma exacta la locaciones de estas proteínas. A partir de los resultados obtenidos mediante ISH-PLA, se cuantificó la cantidad de puntos de proximidad por célula (Figura 16).

En la Figura 16 se observó una menor cantidad de interacciones entre el ARNm completo de VIH-1 e YTHDF2 en comparación a la cantidad promedio obtenida en los otros casos, resultado avalado por el test estadístico t-student.

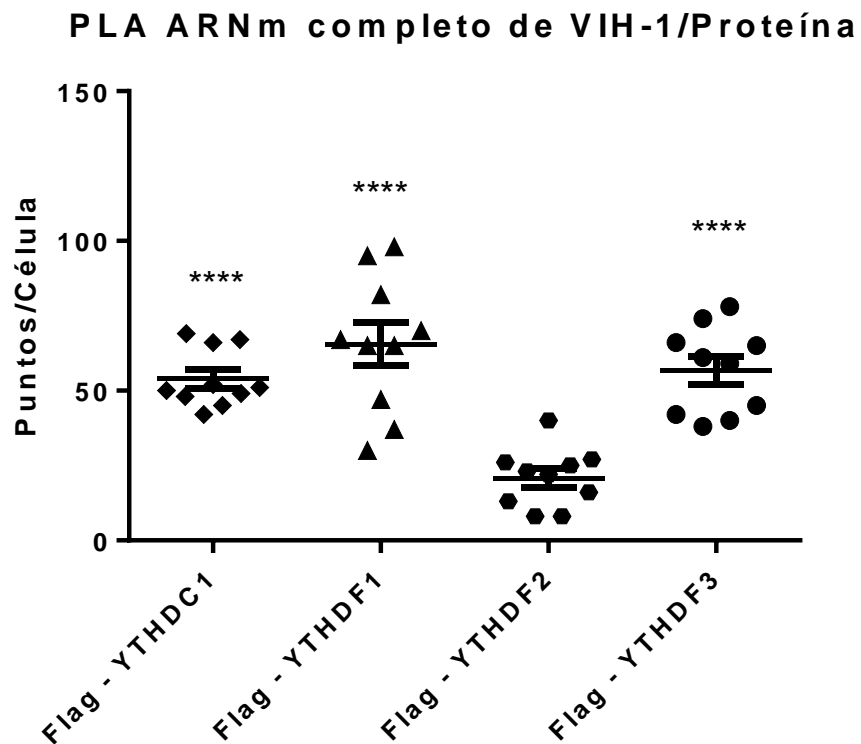


FIGURA 16. Gráfico de cuantificación de puntos por célula resultantes del ISH-PLA. El gráfico fue generado a partir de los datos obtenidos desde 10-14 células mediante Image J y el programa Prism 7. Se realizó un *T-test* en función de los resultados obtenidos para Flag – YTHDF2, en donde se obtuvo: cuadruple asterisco (****) para $P < 0.0001$.

Estos resultados son consistentes con resultados previos obtenidos por PAR-CLIP e inmunoprecipitación de RNA mostrando la interacción del ARNm completo de VIH-1 con YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 (Kennedy et al., 2016; Tirumuru et al., 2016), independientemente de la localización observada para YTHDF2 e YTHDF3 mediante ISH-PLA. Sin embargo, al no existir información previa respecto del posible rol de YTHDC1 durante la replicación de VIH-1 es que decidimos evaluar si esta lectora de m⁶A nuclear tiene algún impacto en la expresión génica viral.

3.2. Determinación el efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 en la síntesis de Gag.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión transitoria de la proteína YTHDC1, se evaluó en primera instancia la capacidad de detectar la proteína Flag-YTHDC1 mediante Western blot. Se transfectó con el vector Flag/HA-YTHDC1 y a modo control con pcDNA3 d2EGFP en células HeLa. 24 horas post-transfección, se procedió a realizar un Western blot contra el epítipo Flag obteniéndose como resultante la Figura 17, en donde se aprecia la presencia de la banda correspondiente a Flag-YTHDC1 (81 KDa) en los carriles correspondientes y no así en los carriles control.

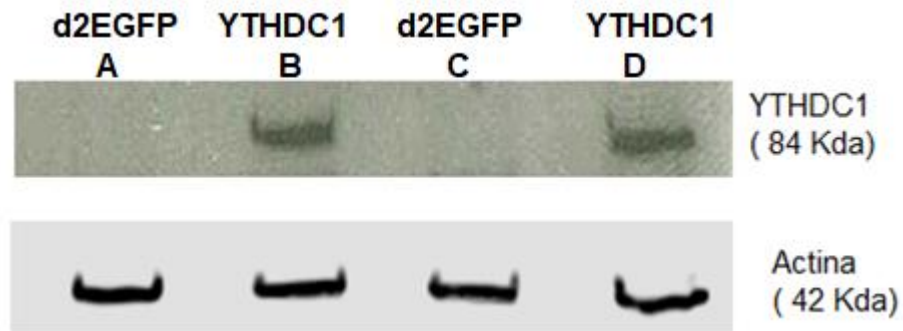


FIGURA 17. Evaluación de la sobreexpresión de YTHDC1. Western blot contra Flag del ensayo de sobreexpresión de Flag-YTHDC1. Orden de izquierda a derecha: A) Transfección de ppcDNA3 d2E-GFP (réplica 1), B) Transfección de pCDNA Flag/HA-YTHDC1 (réplica 1), C) Transfección de pCDNA3 d2E-GFP (réplica 2), D) Transfección de pCDNA Flag/HA-YTHDC1 (réplica 2). Se cargaron 25µg por muestra. Se utilizó el anticuerpo Anti-HA Mouse a una dilución de 1:2500.

3.2.1. Western Blot sobre extractos de células que expresan VIH-1 y Flag-YTHDC1

Se llevo acabó un Western blot con el fin de determinar efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 sobre la síntesis de la poliproteína precursora de Gag así como también sus productos de procesamiento mediante el uso de los anticuerpos primarios Anti-HA para detectar Flag/HA-YTHDC1 y Anti-HIV-1 p24 para detectar Gag (p55 kDa) y los precursores Cápside-Matrix (p41 kDa) y Capside (p24 kDa).

En el Western blot resultante se puede observar un aumento en la intensidad de banda correspondiente a la proteína de cápside de VIH-1 (p24) y la poliproteína matriz + cápside (p41) en los carriles correspondientes a la sobreexpresión de YTHDC1 (Figura 18), lo que sugiere que la sobreexpresión de YTHDC1 favorece la síntesis de Gag.

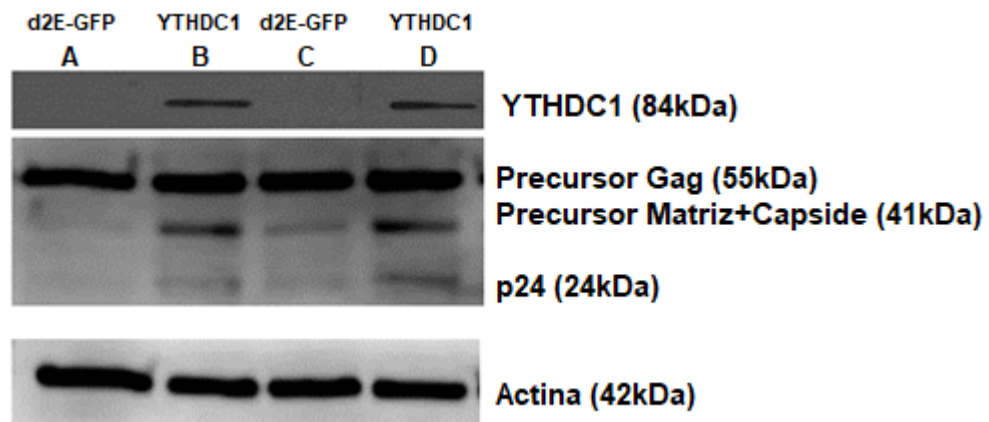


FIGURA 18 Western Blot de la Sobreexpresión de YTHDC1. Orden de izquierda a derecha: A) Transfección de pNL4.3 + pcDNA3 d2E-GFP (réplica 1), B) Transfección de pNL4.3 + Flag/HA-YTHDC1 (réplica 1), C) Transfección de pNL 4.3 + pcDNA3 d2E-GFP (réplica 2), D) Transfección de pNL 4.3 + pCDNA Flag/HA-YTHDC1 (réplica 2). Se cargaron 25µg por muestra. Se utilizó el anticuerpo Anti-HA mouse monoclonal 1:1000 y el anticuerpo anti-p24.

3.2.2. Extracción de ARN Citoplasmático y Total

Con el fin de ahondar en el mecanismo por el cual YTHDC1 promueve la síntesis de Gag es que determinamos los niveles de ARNm completo total y citoplasmico. Tras haber realizado la extracción y cuantificación de ARN correspondiente, procedimos al análisis de integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE 1X (Figura 19).

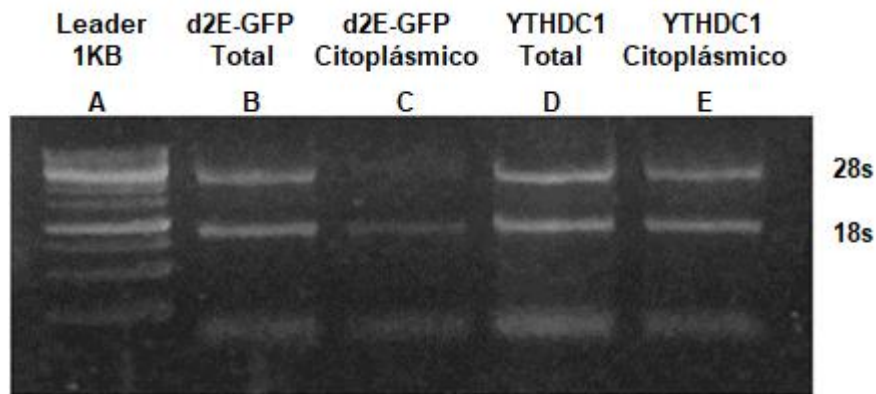


FIGURA 19. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE1X de las extracciones de ARN. Orden de izquierda a derecha: A) Leader 1KB, B) Extracción de ARN Total de la transfección con pNL 4.3 + pcDNA3 d2E-GFP, C) Extracción de ARN Citoplásmico de la transfección con pNL 4.3 + pcDNA3 d2E-GFP, D) Extracción de ARN Total de la transfección de pNL 4.3 + pcDNA Flag/HA-YTHDC1, E) Extracción de ARN Citoplásmica de la transfección de pNL 4.3 + pcDNA Flag/HA-YTHDC1. Se cargó 300ng de cada muestra.

En la Figura 19 se observa que el ARN de todas las muestras se encuentran integras, aunque el carril C presente menor intensidad de bandas. En los carriles B-E se puede observar la presencia de las bandas 28S y 18S, las cuales corresponden a ARNs ribosomales presentes en células animales (Schroeder et al., 2006). Además, constituyen indicadores de la integridad del ARN en células eucariontes.

A partir de los resultados de la Figura 19, se cuantificaron las intensidades de banda para 28s y 18s mediante ImageJ. Se obtuvo como resultado el gráfico de la Figura 20 y la Tabla V. Sin embargo, en estas figuras se puede observar que la intensidad asociada a la presencia de estos ARNs ribosomales no corresponde a la relación esperada de 2:1 para 28s y 18s (Schroeder et al., 2006). Aunque la relación de 2:1 conforma un punto de referencia para categorizar a una extracción de ARN como de calidad, decidimos proseguir evaluando la pureza de las fracciones citoplásmicas obtenidas.

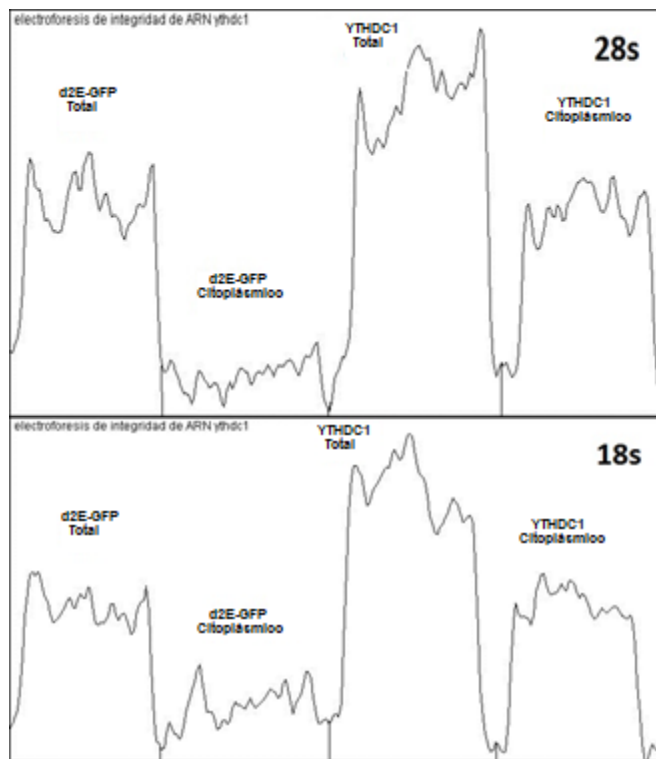


FIGURA 20. Gráfico del área bajo la curva de la medición de la intensidad de banda. Se utilizó el programa ImageJ, en donde el área bajo la curva corresponde a la representación gráfica de la intensidad de banda de la Figura 19.

TABLA 5. Cuantificación del Peak de intensidad Banda para 28s y 18s en cada carril en la Figura 20.

Extracción	28s	18s
d2E-GFP Total	27103	26519
d2E-GFP Citoplasmática	6272	11328
YTHDC1 Total	41469	38205
YTHDC1 Citoplasmática	25755	23949

3.2.3. RT, -PCR y RT -qPCR

Una vez determinada la razón entre las intensidades de banda de 28s y 18s, se procedió a realizar un RT mediante el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* para obtener ADNc y realizar un PCR convencional. En el PCR se utilizaron los primers Fwd

y Rev contra GAPDH y pre-GAPDH descritos (Blissenbach, Grewe, Hoffmann, Brandt, & Uberla, 2010), obteniendo como resultante la Figura 21.

En la Figura 21 se observa la presencia de la banda correspondiente a Pre-GAPDH en los carriles B, D, F y H, la cual debería estar presente solo en los carriles B y F, ya que es un indicador de la fracción de ARNs nucleares y no se espera su presencia en la fracción citoplásmica. Mientras que en el caso los carriles C, E, G, I, K, N se observa la presencia de la banda correspondiente a GAPDH, la cual está presente en los carriles de todas las extracciones, resultado esperado, ya que permite amplificar tanto el pre-GAPDH como GAPDH.

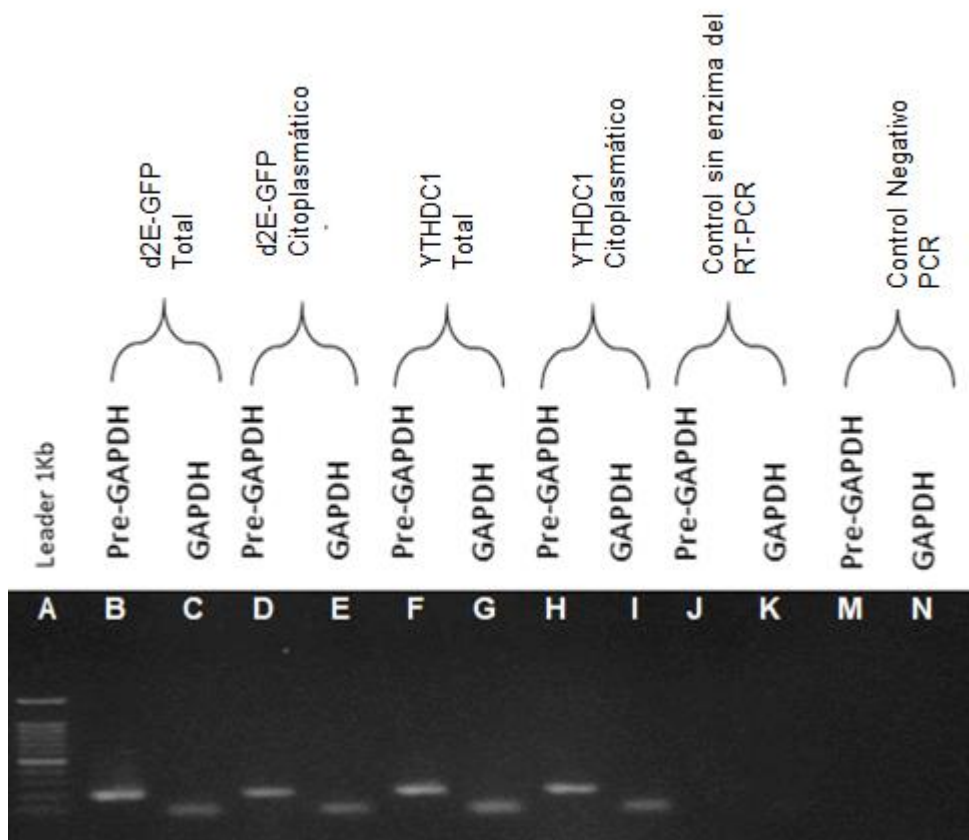


FIGURA 21. Electroforesis en gel de Agarosa 1% en TBE1X de productos de RT-PCR convencionales mediante el uso de los primers contra Pre-GAPDH y GAPDH. Las muestras se

indican en la parte superior de la figura. El control negativo de PCR corresponde a una reacción sin ADN.

Aunque tanto la calidad del ARN como la calidad de la extracción no fue la óptima, se procedió a realizar de igual manera un PCR en tiempo real mediante el uso del Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix. El PCR en tiempo real se realizó con el propósito de determinar los niveles de expresión a nivel de transcrito el efecto de la sobreexpresión de Flag-YTHDC1 en los niveles de ARNm completo de VIH-1. Los resultados obtenidos se muestran graficados en la Figura 22.

Por simplicidad, los datos obtenidos en la condición control (sobreexpresión de d2EGFP) fueron considerados como el 100% de expresión relativa. En base a estos se determinó el efecto de la sobreexpresión de YTHDC1.

Observamos que la sobreexpresión de YTHDC1 disminuye significativamente los niveles de ARNm completo en la fracción total mientras se observa un aumento, no significativo, en la fracción citoplásmica. Los *P value* indicados al costado derecho del grafico corresponden al resultado del análisis estadístico de *T-test* entre las extracciones totales y citoplasmáticas, respectivamente. Estas mediciones indican que el resultado obtenido para la extracción total de YTHDC1 es significativo, mientras que el obtenido para la extracción citoplasmática YTHDC1 no lo es. Aunque no es posible concluir respecto a estos resultados (dada la calidad y contaminación de las fracciones obtenidas), se puede inferir una tendencia de YTHDC1 a alterar los niveles de ARNm completo de VIH-1, lo que puede tener un impacto en la síntesis de Gag.

qPCR de Extracciones de ARN Total y Citoplasmático

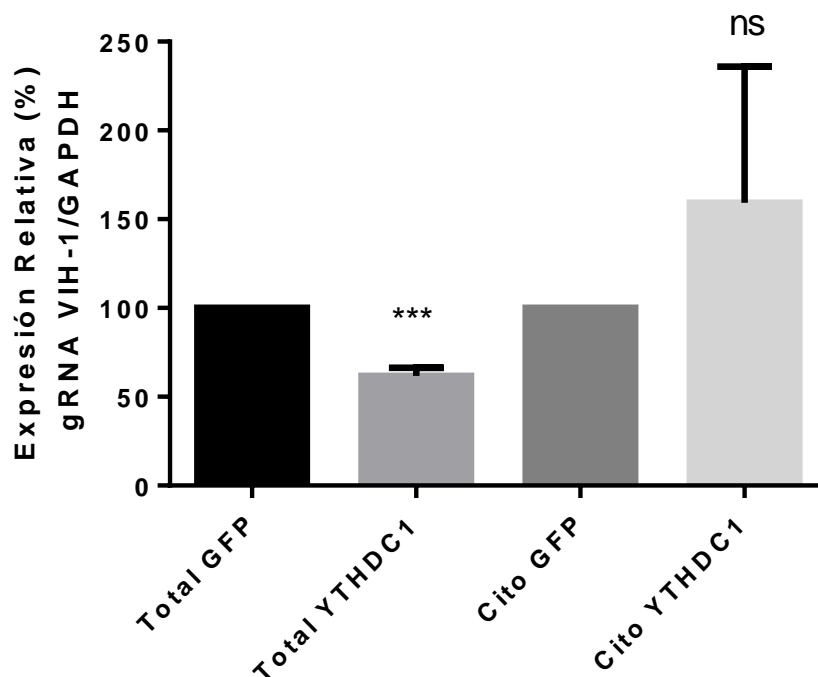


FIGURA 22. Niveles de expresión relativa del ARNm completo de VIH-1 total y citoplásmico determinados mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como % del control (sobrexpresión de d2EGFP). Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar obtenidos en 3 experimentos independientes. Se realizó un *T-test* en función de los resultados obtenidos para las sobrexpresiones de d2EGFP tanto Total como Ctoplasmatico, en donde se obtuvo: doble asterisco (**) para $P < 0.01$ NS para $P > 0.05$.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

La presencia y el enriquecimiento de m^6A en el ARNm completo de VIH-1 fue descrito por tres grupos independientes en el año 2016. Estos trabajos constituyeron los cimientos para el estudio de la regulación epitranscriptómica en VIH-1. Cimientos en donde se presentó el rol de m^6A y las proteínas lectoras YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3, en el ciclo replicativo del virus.

El reconocimiento de m⁶A presente en el ARNm completo de VIH-1 por parte de estas 3 proteínas genera un aumento de los niveles del ARNm viral y por lo tanto la síntesis de Gag. Independiente de que proteína fuese sobreexpresada y de las funciones reportadas hasta la fecha para YTHDF1 (X. Wang et al., 2015), YTHDF2 (X. Wang et al., 2013) (Du et al., 2016) e YTHDF3 (Shi et al., 2017).

Sin embargo, debido al constante avance de las tecnologías y resolución de estas, es que han aumentado las capacidades para generar conocimiento mediante otros enfoques. Dentro de estos, se destaca la evaluación y confirmación de trabajos previos mediante nuevas técnicas, con el fin de complementar la información existente. Un ejemplo de esto es el caso de las proteínas YTHDF1, 2 y 3, las cuales si bien se sabe su localización subcelular y los sitios de interacción en el ARNm completo de VIH-1, se planteó mediante técnicas alternativas como RNA-FISH, inmunofluorescencia e ISH-PLA, confirmar la información existente sobre estas en el ciclo replicativo del virus de VIH-1.

En primera instancia se escogió determinar la localización y proximidad de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en presencia y ausencia del ARNm completo de VIH-1, acercamiento que se realizó con éxito y permitió confirmar la información presente en la literatura (Du et al., 2016; Roundtree et al., 2017; Shi et al., 2017; X. Wang et al., 2013, 2015; Xiao et al., 2016). Al confirmar la información, además se reportó por primera vez la localización y grado de proximidad de YTHDC1 con el ARNm completo de VIH-1 en el contexto de replicación viral.

Finalmente se planteó identificar el efecto de la sobreexpresión de la proteína YTHDC1 sobre la síntesis Gag y sus productos del procesamiento así como también en los niveles de ARNm completo, como posibles indicador del rol de YTHDC1 en el ciclo replicativo

del virus. Sin embargo, estos acercamientos resultaron mermados por la inconsistencia en la reproducibilidad de los resultados obtenidos, ya que posteriormente a las primeras instancias de medición, estos no concordaron.

Expresión ectópica de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1 en contexto de la replicación viral en células HeLa.

La expresión ectópica de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC1, se realizó con el objetivo de determinar la localización y proximidad de las proteínas con el ARNm completo de VIH-1. Además de descubrir posibles nuevas funciones para la proteína YTHDC1 en condiciones de replicación viral, información no descrita hasta el momento. Estos objetivos se llevaron a cabo mediante técnicas de RNA-FISH, inmunofluorescencia e ISH-PLA.

Para las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3, se observó mediante IFI y FISH (Figura 10 y 11) que todas localizaban en el citoplasma independientemente de la presencia o ausencia del ARNm completo de VIH-1, resultados que concuerdan con las ubicaciones reportadas a la fecha (Du et al., 2016; Shi et al., 2017; X. Wang et al., 2013, 2015). Mientras que YTHDC1 se localizaba en el núcleo en ausencia y presencia del ARNm completo de VIH-1, resultado que también concuerda con lo reportado en la literatura (Roundtree et al., 2017).

Sin embargo aunque se realizó un ensayo de colocalización entre las proteínas YTHs y el ARNm completo de VIH-1 (Figura 12), estos resultados en conjunto no son suficientes para confirmar un grado de proximidad y menos una asociación entre estas proteínas y el ARNm completo de VIH-1, por lo cual tuvieron que ser confirmados mediante la técnica de ISH-PLA (Figura 15).

En la Figura 15, la presencia de los puntos de color rojo indican los lugares en donde hay proximidad entre las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 con el ARNm completo de VIH-1, puntos que se observan en el citoplasma. Estos puntos corresponden a regiones de proximidad que sugieren posibles interacciones (directas o indirectas), esto debe a que la distancia máxima necesaria para que se pueda producir la hibridación entre los oligonucleótidos presentes en los anticuerpos secundarios de PLA es de 40nm (Jung, Lifland, Zurla, Alonas, & Santangelo, 2013). Esta distancia es suficiente para la existencia de un complejo ribonucleoproteico formado entre las proteínas y el ARNm completo de VIH-1, pero no indica interacción directa por lo que se habla de proximidad por sobre interacción.

Con respecto a los puntos rojos observados en el caso de YTHDC1, estos se ubican en la cara perinuclear interna del núcleo. Resultado que en conjunto con la información publicada (Roundtree et al., 2017) en donde se presenta el rol de YTHDC1 en la exportación de ARNm metilados, se sugiere fuertemente un posible rol de YTHDC1 en la exportación nuclear del ARNm completo de VIH-1.

Se ha reportado que YTHDC1 se une a los ARNm metilados previamente a la exportación nuclear de estos, por lo tanto su participación en este proceso corresponde a un paso clave que puede corresponder a un cuello de botella. Explicación plausible del mayor número de puntos por célula observado. Ya que al ser reclutada en la cara interna de la membrana nuclear, YTHDC1 estaría posiblemente contribuyendo al aumento en la exportación nuclear del ARNm completo de VIH-1. Esta hipótesis pudo haber sido respondida con el ensayo de RT-PCR en tiempo real de la fracción citoplásmica, pero lamentablemente no fuimos capaces de obtener fracciones de ARN puras y de calidad. En el caso de YTHDF1 se ha reportado que facilita la traducción de los transcritos metilados al facilitar el inicio de la traducción, ya que interactúa con eIF3 favoreciendo el

posicionamiento de los ribosomas sobre el sitio de inicio de la traducción (X. Wang et al., 2015). También se ha descrito que YTHDF1 en condiciones de infección con VIH-1, favorece la replicación viral al incrementar la producción de las proteínas virales (Kennedy et al., 2016).

YTHDF1 al estar presente en la región citoplasmática de la célula tiene mayor área para poder unirse al ARNm completo de VIH-1 y por lo tanto favorecer su traducción, ya que se ha reportado que se unión es posterior a YTHDF3 pero previa a YTHDF2 (Shi et al., 2017).

En el caso de YTHDF2 se ha evidenciado su participación en la estabilidad de los transcritos metilados, ya que favorece la degradación de los transcritos que presentan metilaciones en la región 3'UTR y en cercanías del codón de termino en condiciones normales, relocalizandolos en los cuerpos de procesamientos (X. Wang et al., 2013). Además de reclutar al complejo CCR4-NOT, el cual participa directamente en la deadenilación de los transcritos metilados. Sin embargo, en contexto de infección con VIH-1 se ha observado un efecto redundante al ya mencionado de la proteína YTHDF1 (Kennedy et al., 2016).

En este trabajo se pudo observar que YTHDF2 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, resultado que se debe a que los puntos observados al interior del núcleo, probablemente se localizan en el citoplasma, pero en un plano z distinto, ya que esta explicación concuerda con la localización reportada mediante FISH y la encontrada en la literatura. Resultados que deben ser confirmados mediante microscopia 3D. Además hubo un menor número de puntos para YTHDF2, proteína que representa una menor tasa de proximidad entre esta y el ARNm completo de VIH-1. Resultado que quizás se debió al efecto redundante de YTHDF2 por sobre YTHDF1 y la temporalidad entre la unión de esta proteína y el ARN viral (Shi et al., 2017). Con este resultado y los ya

mencionados, se hace necesario determinar la constante de afinidad de YTHDF2 por el ARNm de VIH-1 en ausencia/presencia de las otras proteínas de la familia YTH.

Particularmente en el caso de YTHDF3, se ha demostrado que participa en la traducción al cooperar con YTHDF1 mientras que promueve la degradación al cooperar con YTHDF2 (Shi et al., 2017).

Finalmente se observa la presencia de puntos rojos asociados a la sobreexpresión de YTHDF3 en la región perinuclear, nuclear y citoplasmática. Resultados que si bien contrastan con la localización reportada para YTHDF3, nos confirman de igual manera la interacción entre esta proteína y el ARNm completo de VIH-1. Debido a que se ha reportado que YTHDF3 interactúa con ARNm viral, una vez este llega al citoplasma (Shi et al., 2017), es que se propone que los puntos observados estarían localizándose principalmente en la cara perinuclear externa del núcleo y que los puntos observados al interior del núcleo, corresponden a puntos en esta misma localización pero en un plano Z distinto, por lo cual sería necesario realizar microscopia 3D. Indiferentemente a la localización observada, esta confirma la asociación de esta proteína al ARNm y que además nos indica que YTHDF3 estaría interactuando tempranamente con el ARNm viral, una vez este llega al citoplasma, consistente con estudios previos

Para poder determinar realmente el grado de proximidad y posibles interacciones entre los elementos que participan con las proteínas YTH y el ARNm completo viral, es necesario realizar más experimentos. Dentro de los cuales se podría realizar una inmunoprecipitación proteína-ARN acoplado a secuenciación de ARN (CLIP-seq) con el fin de poder determinar los sitios de interacción entre YTHDC1 y el ARNm completo de VIH-1. Además, se podría analizar el efecto producido por silenciamiento en etapas tardías del ciclo replicativo del virus.

Sobreexpresión transitoria de YTHDC1 en contexto de replicación viral en células HeLa

Una vez evaluada la capacidad de detección sobre la proteína Flag-YTHDC1 (84kDa) (Figura 17), se procedió a realizar la transfección con los vectores pNL4.3 y el pcDNA3 Flag/HA-YTHDC1. Mediante este experimento se buscó evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína Flag-YTHDC1 sobre los niveles de producción de Gag (55 kDa) y sus productos de procesamiento (p41 y p24).

Se escogió la técnica de Western blot para poder evaluar la síntesis del precursor Gag, como indicador de un posible efecto en el ciclo replicativo de VIH-1 (Figura 18). Sin embargo, en la práctica no hubo consistencia entre replicados biológicos, por lo cual solo se muestra la primera réplica.

En la Figura 18 se puede observar un aumento en el procesamiento de Gag en los carriles correspondientes a la sobreexpresión de YTHDC1, efecto que se traduce en un aumento de la intensidad de banda observada para cápside (p24) y matriz + cápside (p41). Este resultado encuentra una explicación plausible en el aumento de la exportación nuclear atribuida a la sobreexpresión de la proteína YTHDC1, que tiene como consecuencia un aumento en los niveles basales de ARNm viral en el citoplasma. Esto estaría propiciando un aumento en la forma Gag-Pol, la cual contiene la proteasa viral, favoreciendo la acumulación de las formas procesadas de Gag.

Se realizó una extracción de ARN tanto citoplasmática como total, con el fin de determinar si el aumento en el procesamiento del precursor Gag se debía a un aumento en los niveles de ARN o un aumento en la tasa de traducción. En la Figura 19 se puede observar en todos los carriles la presencia de las bandas asociadas a 28s y 18s, bandas

que corresponden a ARN ribosomales (Schroeder et al., 2006). Ambas bandas son indicadores de la integridad del ARN en células eucariontes, debido a que corresponden al aproximadamente al 80% total del ARN extraído.

La razón esperada entre las intensidades de bandas de 28s y 18s era de 2:1 (Schroeder et al., 2006), relación que no se obtuvo (Figura 20 y la tabla 4). Se confirmó que aunque la relación obtenida entre 28S y 18S no fue la ideal, si estaban presentes las bandas correspondientes a estas.

Tras confirmar que el ARN no estaba degradado, se procedió a realizar el RT-PCR convencional contra las secuencias de pre-GAPDH y GAPDH con el fin de determinar la pureza de la fracción citoplásmica de ARN.

El RT-PCR nos permitió evaluar la calidad de la extracción realizada, al observar que en las extracciones citoplasmáticas se encontraban restos de ARN nuclear (Figura 21). Sin embargo, se procedió a realizar de igual forma un RT-PCR en tiempo real (Figura 22) y así poder evaluar el efecto de la sobreexpresión de YTHDC1 sobre el nivel de ARNm de VIH-1.

En la Figura 22 se observa que los niveles de ARNm totales disminuyen significativamente (40% aproximadamente), mientras que a nivel citoplasmático el efecto tiende al aumento en los niveles de ARNm viral (aunque este resultado no fue estadísticamente significativo). Resultados que habrá que estudiar en mayor detalle y precisión, ya que al estar contaminadas las extracciones no se pudo evaluar de forma precisa el efecto observado.

Los problemas que se presentaron en el desarrollo de los experimentos se debieron a las siguientes posibles razones: problemas con la eficiencia de las transfecciones (30%-50% en células HeLa), problemas con los anticuerpos utilizados, el protocolo de extracción de ARN utilizado. Problemas que impidieron afirmar al 100% que la

sobreexpresión de YTHDC1 influye en la síntesis del precursor Gag y por lo tanto tiene un efecto positivo en la replicación viral. Sin embargo, estos resultados no concluyentes dejan la puerta abierta a nuevos experimentos, ya que si bien no contribuyen a determinar la respuesta, plantea la pregunta y por lo tanto asienta las bases para estandarizar estas técnicas y así poder evaluar mediante estas y otras más el efecto de YTHDC1 en el ciclo replicativo del virus. Preguntas que quedan para ser resueltas por futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

Con el fin de poder evidenciar la localización y grado de proximidad de las proteínas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 y específicamente de YTHDC1 en el contexto de infección viral, es que en este trabajo se realizaron las técnicas de RNA-FISH, inmunofluorescencia e ISH-PLA. Técnicas que permitieron confirmar la ubicación celular de estas proteínas en presencia de ARNm completo de VIH-1. Al no existir información de la localización y proximidad de YTHDC1 en contexto de infección viral de VIH-1, este trabajo constituye un acercamiento inicial al tema para poder iniciar investigaciones sobre la posible regulación de la síntesis de Gag mediado por YTHDC1.

En este trabajo se presentó la localización de las proteínas YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 y específicamente para YTHDC1. Enfocándonos principalmente en esta última proteína, la cual se observó en la región perinuclear (Figuras 10 y 11), en donde posiblemente podría estar contribuyendo a la exportación nuclear del ARNm completo de VIH-1 al citoplasma. Esta conclusión se debe al grado de proximidad mostrado en la Figura 16 ($\leq 40\text{nm}$) para YTHDC1 con el ARNm completo de VIH-1, grado que nos permite postular la existencia de una o varias posibles interacciones entre estos dos elementos. Además, se demostró la participación de YTHDC1 en el procesamiento y/o síntesis de Gag (Figura

18), posiblemente al aumentar los niveles de ARNm viral en el citoplasma (Figura 20). Resultados que, en conjunto a la información encontrada en la bibliografía (Roundtree et al., 2017), en donde se postula a YTHDC1 como una proteína involucrada en la exportación nuclear de ARNm metilados, es que en este trabajo se postula fuertemente su rol en la exportación nuclear del ARNm completo de VIH-1.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen uno de los primeros antecedentes para futuros estudios en donde se podrá determinar a cabalidad el rol de YTHDC1 en el ciclo replicativo de VIH-1. Específicamente que tipo de interacción se desarrolla entre estos dos elementos, en qué región del ARNm completo de VIH-1 se une YTHDC1 y cómo facilita su exportación al citoplasma.

BIBLIOGRAFIA

- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., & Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of Virology*, 59(2), 284–291. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3016298> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC253077>
- Andrew, A., & Strebel, K. (2014). HIV-1 accessory proteins: Vpu and Vif. *Methods in Molecular Biology*, 1087, 135–158. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_12
- Bannwarth, S., & Gagnon, A. (2005). HIV-1 TAR RNA: The Target of Molecular Interactions Between the Virus and its Host. *Current HIV Research*, 3(1), 61–71. <https://doi.org/10.2174/1570162052772924>
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Barre-Sinoussi, F., Ross, A. L., & Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Micro*, 11(12), 877–883. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3132>
- Blissenbach, M., Grewe, B., Hoffmann, B., Brandt, S., & Uberla, K. (2010). Nuclear RNA Export and Packaging Functions of HIV-1 Rev Revisited. *Journal of Virology*, 84(13), 6598–6604. <https://doi.org/10.1128/JVI.02264-09>
- Bokar, J. A., Rath-Shambaugh, M. E., Ludwiczak, R., Narayan, P., & Rottman, F. (1994). Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei: Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17697–17704.
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., & Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(11), 1233–1247. <https://doi.org/10.1101/gad.241422.114>
- Bour, S., & Strebel, K. (2003). The HIV-1 Vpu protein: A multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes and Infection*. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00191-6)
- Brocard, M., Ruggieri, A., & Locker, N. (2017). m6A RNA methylation, a new hallmark in virus-host interactions. *Journal of General Virology*, 98(9), 2207–2214. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000910>
- Courtney, D. G., Kennedy, E. M., Dumm, R. E., Bogerd, H. P., Tsai, K., Heaton, N. S., & Cullen, B. R. (2017). Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication. *Cell Host and Microbe*, 22(3), 377–386.e5.

- <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.004>
- DAVIS, F. F., & ALLEN, F. W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 227(2), 907–915.
- Dimock, K., & Stoltzfus, C. M. (1977). Sequence Specificity of Internal Methylation in B77 Avian Sarcoma Virus RNA Subunits. *Biochemistry*, 16(3), 471–478.
<https://doi.org/10.1021/bi00622a021>
- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., ... Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7, 12626.
<https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
- Felber, B. K., Zolotukhin, A. S., & Pavlakis, G. N. (2007). Posttranscriptional Control of HIV-1 and Other Retroviruses and Its Practical Applications. *Advances in Pharmacology*, 55(7), 161–197. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(07\)55005-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(07)55005-2)
- Finkel, D., & Groner, Y. (1983). Methylations of adenosine residues (m6A) in pre-mRNA are important for formation of late simian virus 40 mRNAs. *Virology*, 131(2), 409–425. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90508-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90508-1)
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
- Fröhlich, A., Rojas-Araya, B., Pereira-Montecinos, C., Dellarossa, A., Toro-Ascuy, D., Prades-Pérez, Y., ... Soto-Rifo, R. (2016). DEAD-box RNA helicase DDX3 connects CRM1-dependent nuclear export and translation of the HIV-1 unspliced mRNA through its N-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(5), 719–730.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.009>
- Furuichi, Y., Morgan, M., Shatkin, A. J., & Darnell, J. E. (1976). The Methylation of Adenovirus-Specific Nuclear and Cytoplasmic aRNA. *Nucleic Acids Research*, 3(3), 749–766. <https://doi.org/10.1093/nar/3.3.749>
- Gokhale, N. S., & Horner, S. M. (2017). RNA modifications go viral. *PLoS Pathogens*, 13(3), 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006188>
- Gokhale, N. S., McIntyre, A. B. R., McFadden, M. J., Roder, A. E., Kennedy, E. M., Gandara, J. A., ... Horner, S. M. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host and Microbe*, 20(5), 654–665.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.015>
- Gullberg, M., & Andersson, A. (2010). Visualization and quantification of protein-protein interactions in cells and tissues. *Nature Methods*, 7(June), 2.
<https://doi.org/10.1039/b910653g>
- Hammond, J. B., & Kruger, N. J. (1988). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 3, 25–32. <https://doi.org/10.1385/0-89603-126-8:25>
- Horowitz, S., Horowitz, a, Nilsen, T. W., Munns, T. W., & Rottman, F. M. (1984). Mapping of N6-methyladenosine residues in bovine prolactin mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(18), 5667–5671. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.18.5667>
- Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., ... He, C. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., ... He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
- John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological

- level. *Nature*, 223(5206), 582–587. <https://doi.org/10.1038/223582a0>
- Jung, J., Lifland, A. W., Zurla, C., Alonas, E. J., & Santangelo, P. J. (2013). Quantifying RNA-protein interactions in situ using modified-MTRIPs and proximity ligation. *Nucleic Acids Research*, 41(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks837>
- Kane, S. E., & Beemon, K. (1985). Precise localization of m6A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: implications for RNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, 5(9), 2298–2306. <https://doi.org/10.1128/MCB.5.9.2298>
- Karn, J., & Stoltzfus, C. M. (2012). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>
- Kennedy, E. M., Bogerd, H. P., Kornepati, A. V. R., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J. B., ... Cullen, B. R. (2016). Posttranscriptional m6A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.002>
- King, S. R. (1994). HIV: Virology and mechanisms of disease. *Annals of Emergency Medicine*, 24(3), 443–449. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(94\)70181-4](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(94)70181-4)
- Krug, R. M., Morgan, M. A., & Shatkin, A. J. (1976). Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *Journal of Virology*, 20(1), 45–53. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=354964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G. M., Bansal, V., Wang, Y., ... Rana, T. M. (2016). Dynamics of the human and viral m6A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature Microbiology*, 1(4), 16011. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.11>
- Lichinchi, G., Zhao, B. S., Wu, Y., Lu, Z., Qin, Y., He, C., & Rana, T. M. (2016). Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, 20(5), 666–673. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.002>
- Limbach, P. A., & Paulines, M. J. (2017). Going global: the new era of mapping modifications in RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1367>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... He, C. (2013). A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2017). Rethinking m⁶A Readers, Writers, and Erasers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 319–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>
- Misselwitz, R., Hausdorf, G., Welfle, K., Höhne, W. E., & Welfle, H. (1995). Conformation and stability of recombinant HIV-1 capsid protein p24 (rp24). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1250(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00041-R](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00041-R)
- Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V, Lasky, L. A., & Capon, D. J. (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*, 313(6002), 450–458. <https://doi.org/10.1038/313450a0>
- O'Carroll, I. P., Thappeta, Y., Fan, L., Ramirez-Valdez, E. A., Smith, S., Wang, Y.-X., & Rein, A. (2017). Contributions of individual domains to function of the HIV-1 Rev response element. *Journal of Virology*, (August), JVI.00746-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00746-17>
- Pardue, M. L., & Gall, J. G. (1969). Molecular Hybridization of Radioactive Dna To the

- Dna of Cytological Preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(2), 600–604. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.600>
- Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). M6 A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Peer, E., Rechavi, G., & Dominissini, D. (2017). Epitranscriptomics: regulation of mRNA metabolism through modifications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 41, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.008>
- Pereira-Montecinos, C., Valiente-Echeverría, F., & Soto-Rifo, R. (2017). Epitranscriptomic regulation of viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(4), 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.02.002>
- Pereira, E. A., & DaSilva, L. L. P. (2016). HIV-1 Nef: taking control of protein trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1–21. <https://doi.org/10.1111/tra.12412>
- Reed, S. E., Staley, E. M., Mayginnes, J. P., Pintel, D. J., & Tullis, G. E. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of Virological Methods*, 138(1–2), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.024>
- Riquelme-Barríos, S., Pereira-Montecinos, C., Valiente-Echeverría, F., & Soto-Rifo, R. (2018). Emerging Roles of N6-Methyladenosine on HIV-1 RNA Metabolism and Viral Replication. *Frontiers in Microbiology*, 9(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00576>
- Roignant, J. Y., & Soller, M. (2017). m6A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression. *Trends in Genetics*, 33(6), 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.003>
- Roundtree, I. A., & He, C. (2016a). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.006>
- Roundtree, I. A., & He, C. (2016b). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Trends in Genetics*, 32(6), 320–321. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.006>
- Roundtree, I. A., Luo, G.-Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., ... He, C. (2017). YTHDC1 Mediates Nuclear Export of N6-methyladenosine Methylated mRNAs. *eLife*, 6, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.31311>
- Saletore, Y., Meyer, K., Korlach, J., Vilfan, I. D., Jaffrey, S., & Mason, C. E. (2012). The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome Biology*, 13(10), 175. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-175>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., ... Kashanchi, F. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in Bioscience*, 9(October), 2388–2413. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31825dd7ac>
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>

- Sharp, P. A. (2009). The Centrality of RNA. *Cell*, 136(4), 577–580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.007>
- Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90128-8)
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., ... He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27(3), 315–328. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., ... Wain-Hobson, S. (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, 42(1), 369–382. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80132-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80132-X)
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., & Ohlmann, T. (2013). The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Research*, 41(12), 6286–6299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt306>
- Temin, H. M., & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. <https://doi.org/10.1101/SQB.1970.035.01.100>
- Tirumuru, N., Zhao, B. S., Lu, W., Lu, Z., He, C., & Wu, L. (2016). N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *eLife*, 5(2016JULY), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.15528>
- Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., García-de-Gracia, F., Rojas-Fuentes, C., Pereira-Montecinos, C., Gaete-Argel, A., ... Soto-Rifo, R. (2018). A Rev-CBP80-eIF4A1 complex drives Gag synthesis from the HIV-1 unspliced mRNA. *bioRxiv*, (56), 313312. <https://doi.org/10.1101/313312>
- Tsai, K., Courtney, D. G., & Cullen, B. R. (2018). Addition of m6A to SV40 late mRNAs enhances viral structural gene expression and replication. *PLoS Pathogens*, 14(2), e1006919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006919>
- Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular Cell*, 63(2), 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.041>
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., ... He, C. (2013). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., ... He, C. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161(6), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>
- Watts, J. M., Dang, K. K., Gorelick, R. J., Leonard, C. W., Jr, W. B., Swanstrom, R., ... Hill, C. (2009). Genome. *Nature*, 460(7256), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nature08237>. Architecture
- Wei, C. M., & Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 318–322. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.318>
- Wei, C. M., & Moss, B. (1977). Nucleotide Sequences at the N6-Methyladenosine Sites of HeLa Cell Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 16(8), 1672–1676. <https://doi.org/10.1021/bi00627a023>
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., ... Yang, Y.-G. (2016). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 61(4), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Ye, F., Chen, E. R., & Nilsen, T. W. (2017). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Utilizes and Manipulates RNA N6-Adenosine Methylation To Promote Lytic Replication. *Journal of Virology*, 91(16), JVI.00466-17.
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., ... He, C. (2013).

ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>

Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Qian, S., & Biology, C. (2016). Dynamic m6 A mRNA methylation directs translational control of heat shock response, 526(7574), 591–594. <https://doi.org/10.1038/nature15377>.Dynamic

