



UNIVERSIDAD DE CHILE

**Rol de los componentes del complejo
nuclear de unión al cap, CBP80 y CTIF, en la
síntesis de la proteína estructural Gag de
VIH-1**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de**

Doctor en Ciencias, mención Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Francisco Javier García de Gracia

Abril, 2019

Director de Tesis Dr. Ricardo Soto Rifo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Francisco Javier García de Gracia

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de abril del 2019.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Soto Rifo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Eugenio Spencer

Dr. Marcelo López-Lastra

Dra. Ana María Sandino

Dr. Omar Orellana

A mi abuelo Florencio, quien nos dejó el año pasado y no pudo disfrutar conmigo el final de este camino.

Biografía



Nací el 6 de septiembre de 1988 en Santiago, Chile. Fui criado junto a mi hermano Florencio por mis padres Florencio y Monserrat, en Santiago y siempre muy cercanos al resto de la familia. El gusto por las ciencias lo desarrollé por la influencia de mi padre, quien nos enseñó desde pequeños lo interesante que es el mundo de la física y las matemáticas. Sin embargo, con el paso del tiempo fue la biología la que concentró mi mayor interés. Por esta razón, luego de cursar el Programa de Bachillerato con mención en ciencias de la Universidad de Chile, ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Durante la carrera, fue el mundo de la virología la que llamó mi atención, por esto es que realicé mi tesis de pregrado estudiando el virus de la leucemia murina. Una vez terminado el pregrado, mi interés por la virología se mantuvo y al ingresar al Doctorado en Ciencias, con mención en microbiología de la U. de Chile-USACH, mi tesis doctoral se centró en el estudio del virus de la inmunodeficiencia humana. Hoy en día, finalizado mi trabajo doctoral mi pasión por la virología no ha dejado de crecer y mis próximos desafíos se enfocarán en el estudio del virus de la influenza. Si bien es un área diferente y nueva, estoy convencido de que el conocimiento y las herramientas adquiridas durante la etapa doctoral me permitirán superar sin inconvenientes cualquier tipo de desafío científico que me presente el futuro.

Agradecimientos

Deseo agradecer a mis padres Monserrat de Gracia Sepúlveda y Florencio García Correa y a mi hermano Florencio García de Gracia por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida, a mi familia por estar siempre presentes y ser tan unidos en todas las circunstancias. A Constanza, mi polola, quien siempre me motiva a seguir adelante y apoya en cada paso que doy.

A mis amigos del doctorado con quienes compartimos principalmente los primeros años del grado, que en conjunto pudimos superar la etapa de ramos del doctorado gracias a largas jornadas de estudio, con apoyo mutuo y un excelente compañerismo. Nos hemos acompañado en cada una de las etapas del grado y espero que siga siendo así en el futuro.

Deseo agradecer a los profesores que conformaron mi comisión de tesis, ya que fueron muy comprensivos conmigo en los momentos de necesidad, fueron muy pacientes con mis tiempos, me apoyaron y asesoraron siempre, su consejo en momentos complicados fue, sin lugar a dudas, de gran ayuda.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, quienes fueron fundamentales en este periodo, gracias por todo el apoyo que me dieron en los momentos difíciles, tanto en términos científicos como personales. Por todas esas conversaciones, salidas, risas, por la paciencia que me han tenido y apoyo que siempre me han dado. Por esa innumerables anécdotas y recuerdos que siempre atesoraré. Durante estos años se convirtieron en mi segunda familia y sin duda fueron fundamentales para superar esta etapa. Deseo mencionar también al profesor Fernando Valiente, quien siempre estuvo dispuesto a escuchar mis consultas. Sus opiniones y consejos siempre fueron de gran ayuda cuando los necesitaba.

Finalmente, quiero agradecer a mi tutor de tesis, el profesor Ricardo Soto Rifo. Quiero agradecerle por toda la paciencia que tuvo conmigo, su guía y su confianza en mis capacidades me motivaron para seguir por este camino. Él siempre me decía que yo era una persona capaz y que debía tener mayor confianza en mis capacidades, eso siempre me ayudó a superar mis miedos y dudas. Siempre estuvo dispuesto a escucharme, darme consejo y enseñarme lo que necesitaba para superar los diversos problemas que se presentaron en el camino. Me enseñó que el camino de la ciencia es difícil, que requiere perseverancia y sacrificios, pero también, que tarde o temprano todo ese esfuerzo da frutos y alegrías.

Índice de materiales

Biografía	ii
Agradecimientos	iv
Índice de materiales	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
Introducción.....	1
El virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1).....	1
Ciclo replicativo de VIH-1.....	3
Control de la expresión del ARN mensajero completo de VIH-1	8
Control de la expresión de los ARN mensajeros celulares	10
Complejo nuclear de unión al cap y VIH-1	12
Hipótesis y objetivos	17
Hipótesis.....	17

Objetivo General	17
Objetivos Especificos	17
Materiales y métodos	18
Vectores de ADN.....	18
Cultivo celular y transfección de ADN.....	18
Análisis de las actividades de las luciferasas de Renilla y luciérnaga ...	19
Western blot	19
Silenciamiento de CTIF, transfección proviral y ensayo de recuperación	20
Producción de un pseudotipo de VIH-1 y ensayos de infección	21
Ensayo SUnSET (Sensor superficial de la traducción).....	22
Extracción de ARN y RT-qPCR.....	23
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH), inmunofluorescencia y microscopía confocal	24
Ensayo de ligación proximal (<i>proximity ligation assay</i> , PLA).....	26
Hibridación <i>in situ</i> acoplada a PLA (ISH-PLA).....	27
Resultados	29
El ARNmc de VIH-1 interactúa preferentemente con CBP80 en el citoplasma	29
La sobreexpresión de CBP80 estimula la síntesis de Gag.....	30
CBP80 forma un complejo con la proteína viral Rev	35

Inhibición de la expresión del ARNmc mediado por el factor de inicio de la traducción dependiente del CBC, CTIF	36
El silenciamiento parcial de CTIF estimula la síntesis de Gag	39
La inhibición inducida por CTIF depende de la proteína viral Rev	42
CTIF forma un complejo con la proteína viral Rev	44
CTIF actúa a través de su dominio N-terminal.....	45
El dominio N-terminal de CTIF forma un complejo con Rev y el ARNmc de VIH-1.....	48
La proteína CTIF interfiere con la formación del complejo Rev-CBP80..	56
La inhibición mediada por CTIF es conservada en VIH-2.....	58
Discusión	60
Conclusiones	69
Bibliografía.....	70
Anexos	78

Lista de tablas

Tabla I: Secuencias de los ARN interferentes	21
Tabla II: Secuencias de los cebadores utilizados en RT-qPCR.	24

Lista de figuras

Figura 1: Partícula y genoma viral.....	2
Figura 2: Ciclo replicativo de VIH-1	7
Figura 3: Mecanismos de traducción dependientes del cap	14
Figura 4: Ensayo de proximidad entre el ARNmc y eIF4E o CBP80	30
Figura 5: CBP80 y estimula la síntesis de Gag.....	34
Figura 6: Ensayo de proximidad entre Rev y CBP80	35
Figura 7: CTIF inhibe la síntesis de Gag.....	39
Figura 8: Silenciamiento parcial de CTIF y ensayo de complementación...	41
Figura 9: La inhibición de CTIF es mediada por Rev	43
Figura 10: Ensayo de proximidad entre Rev y CTIF	45
Figura 11: Dominios de CTIF y su efecto en la síntesis de Gag	47
Figure 12: Ensayo de proximidad entre los dominios de CTIF y Rev o el ARNmc	50
Figure 13: Análisis de la localización sub-celular de Rev en presencia de CTIF.....	56
Figura 14: Ensayo de proximidad entre Rev y CBP80 en presencia o ausencia de CTIF	57
Figura 15: CTIF inhibe la síntesis de Gag de VIH-2.....	59
Anexo 1: La infección de linfocitos-T CD4+ (células Jurkat) por VIH-1 modula la acumulación de CTIF.....	78

Lista de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNdh:	ADN de doble hebra
An:	Antisentido
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNmc:	Ácido ribonucleico mensajero completo
ARN pol II:	Ácido ribonucleico transcrito por la ARN polimerasa II
ARNt:	Ácido ribonucleico de transferencia.
CPI:	Complejo de Pre-integración
CA:	Cápside
CCR5:	Receptor C-C de quimioquinas tipo 5
CBC:	Complejo de unión al cap nuclear
CBP80:	Proteína de unión al cap 80
CBP20:	Proteína de unión al cap 20
CD4:	Cúmulo de diferenciación 4
CDK9:	Quinasa dependiente de ciclinas 9
CRM1:	Mantenimiento cromosómico 1
cRNP:	Complejo ribonucleoproteico
CTIF:	Factor de inicio de la traducción dependiente de CBP80/20
CTR:	Complejo de transcripción inversa
CXCR4:	Receptor C-X-C de quimioquinas tipo 4
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDX3:	Helicasa de ARN 3 de tipo DEAD-box
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF3g:	Factor de inicio de la traducción eucariótica 3g
eIF4E:	Factor de inicio de la traducción eucariótica 4E
EJC:	Complejo de empalme de exones
Env:	Envoltura
FISH:	Hibridización <i>in situ</i> fluorescente
Gag:	Antígeno grupo específico
gp120:	Glicoproteína 120
gp41:	Glicoproteína 41
hpi:	Horas post-transfección
hpt:	Horas post-infección
IN:	Integrasa
IRES:	Sitio interno de entrada al ribosoma
ISH-PLA:	hibridación <i>in situ</i> –Ensayo de ligación proximal
LTR:	Repetición terminal larga
MA:	Matriz

MLV:	Virus de la leucemia murina
NaCl:	Cloruro de Sodio
NC:	Nucleocápside
NCBP1:	Proteína de unión al cap nuclear 1
NCBP2:	Proteína de unión al cap nuclear 2
Nef:	Factor regulador negativo
NES:	Señal de exportación nuclear
NIH:	Instituto Nacional de la Salud (USA)
NMD:	Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones sin sentido
NP-40:	Nonidet P-40
PBS:	Tampón fosfato salino
PFA:	Paraformaldehído
PLA:	Ensayo de ligación proximal
Pol:	Polimerasa
PR:	Proteasa
pr65:	Precursor de Gag
pTEFb:	Factor positivo de elongación de la transcripción b
Rev:	Regulador del virión
RRE:	Elemento de respuesta a Rev
RT-qPCR:	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Se:	Sentido
SUnSET:	Sensor superficial de la traducción
TAR:	Elemento de respuesta a la trans-activación
Tat:	Trans-activador de la transcripción
TR:	Transcriptasa reversa
Tris-HCl:	Tris(hidroximetil)aminometano-Ácido clorhídrico
UTR:	Región no traducida
Vif:	Factor de infectividad viral
VIH-1:	Virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1
VIH-2:	Virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 2
Vpr:	Proteína viral <i>R</i>
Vpu:	Proteína viral <i>U</i>
VRC:	Complejo de vanadyl ribonucleósido
VRSh:	Virus Respiratorio Sincicial humano

Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) es un gran problema de salud a nivel mundial. Durante años se ha estudiado su ciclo replicativo con el objeto de generar estrategias que permitan inhibir su multiplicación. Se ha descrito que el virus genera tres clases de transcritos, de 2-, 4- y 9-kb, los cuales son producidos mediante corte y empalme alternativo. El transcrito de 9-kb, o ARN mensajero completo (ARNmc), es traducido por la maquinaria celular para producir las poliproteínas estructurales Gag y Gag-Pol. El ARNmc ha sido foco de especial interés debido a los mecanismos no convencionales que utiliza para asegurar su expresión, entre los cuales destacan su exportación nuclear y traducción. Mientras la exportación nuclear está regulada por la proteína viral Rev y la carioferina celular CRM1, se ha descrito que el ARNmc puede ser traducido por mecanismos que son dependientes e independientes de la estructura cap presente en el extremo 5'. Este proyecto se enfocó en estudiar el rol de dos componentes del complejo nuclear de unión a cap (CBP80 y CTIF) en la síntesis de la proteína estructural Gag a partir del ARNmc de VIH-1. En este trabajo, mostramos que CBP80 estimula la síntesis de Gag mediante la estimulación de la acumulación del ARNmc en el citoplasma y un aumento de la eficiencia de la traducción, esto en un mecanismo que es dependiente de Rev. También observamos que el factor CTIF, a diferencia de CBP80,

inhibe la síntesis de Gag, principalmente impidiendo la traducción del ARNmc. Nuestros resultados señalan que CTIF, a través de su dominio N-terminal, impide la asociación entre CBP80 y Rev, que sería relevante para la traducción del ARNmc e induce la acumulación de esta proteína viral en el citoplasma celular. Finalmente, observamos que el efecto inhibitorio producido por CTIF es conservado en VIH-2, pero no en el virus de la leucemia murina (MLV).

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a major health problem worldwide. The replication cycle of the virus has been studied for several years with the aim of generate strategies to interfere with its multiplication. It has been described that the virus produces three different classes of transcripts of 2-, 4-, and 9-kb in size, which are generated by alternative splicing. The 9-kb transcript or full-length unspliced mRNA (usmRNA) is translated to generate the structural polyproteins Gag and Gag-Pol. The usmRNA has been a focus of special interest from many years due to its ability to exploit non-conventional mechanisms of nuclear export and translation to ensure its expression. As such, while nuclear export is regulated by the viral protein Rev and the cellular karyopherin CRM1, it has also been described that the usmRNA is translated by cap-dependent and cap-independent mechanisms. The goal of this project was to study the role of two components of the nuclear cap-binding complex (CBP80 and CTIF) on the synthesis of the structural protein Gag from the usmRNA of HIV-1. In this work, we show that CBP80 stimulates the synthesis of Gag by stimulating the accumulation of the usmRNA in the cytoplasm as well as by an increasing the efficiency of translation, all this in a Rev-dependent mechanism. We also observed that the CBC co-factor CTIF, unlike CBP80, inhibits the synthesis of Gag, mainly preventing the translation of the usmRNA. Our results indicate

that CTIF, through its N-terminal domain, prevents the association between CBP80 and Rev, which would be relevant for the translation of the *usmRNA*. We also observed that CTIF induced the accumulation of Rev in the cellular cytoplasm. Finally, we observed that the inhibitory effect of CTIF is conserved in HIV-2, but not in the murine leukemia virus (MLV).

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1)

El VIH-1 pertenece al género lentivirus de la familia *Retroviridae*, es un virus envuelto y su partícula viral es pleomórfica con un tamaño aproximado de 110 nm en diámetro (Figura 1A) (Freed and Martin, 2013). En su envoltura lipídica se encuentran las glicoproteínas de superficie gp120 y gp41 mientras que en su interior se ubica la cápside viral la cual alberga un dímero del genoma viral de ARN de simple hebra de polaridad positiva (Figura 1A) (Freed and Martin, 2013). El genoma viral de ARN es producido por la ARN polimerasa II (ARN pol II) y, por ende, posee una estructura 7-metilguanosa (m^7GpppN , donde N es cualquier nucleótido) o cap en su extremo 5' y un a cola poli adenilato (poli-A) en su extremo 3'. El genoma contiene los genes característicos de los retrovirus; *gag*, *pol* y *env*, los cuales codifican para las poliproteínas Gag (estructura), Pol (enzimas proteasa, transcriptasa reversa e integrasa) y Env (glicoproteínas de superficie) (Figura 1B). La poliproteína Gag al ser procesada por la proteasa viral genera las proteínas de matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) y p6. El procesamiento de la poliproteína Pol genera la proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN) y por su parte Env da lugar a gp120 (superficie) y gp41 (transmembrana)(Freed and Martin, 2013).

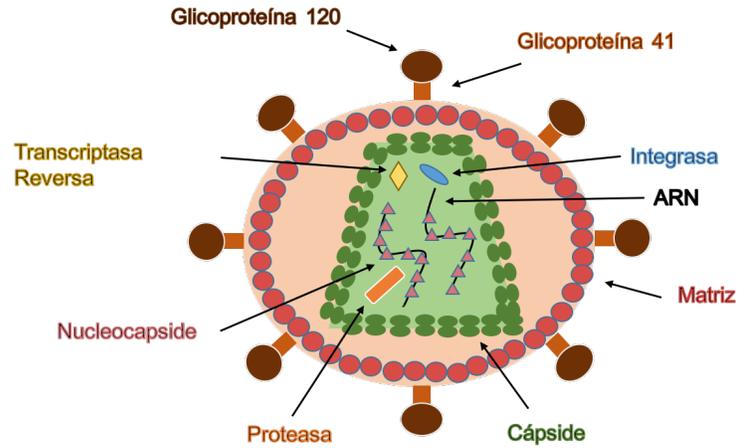
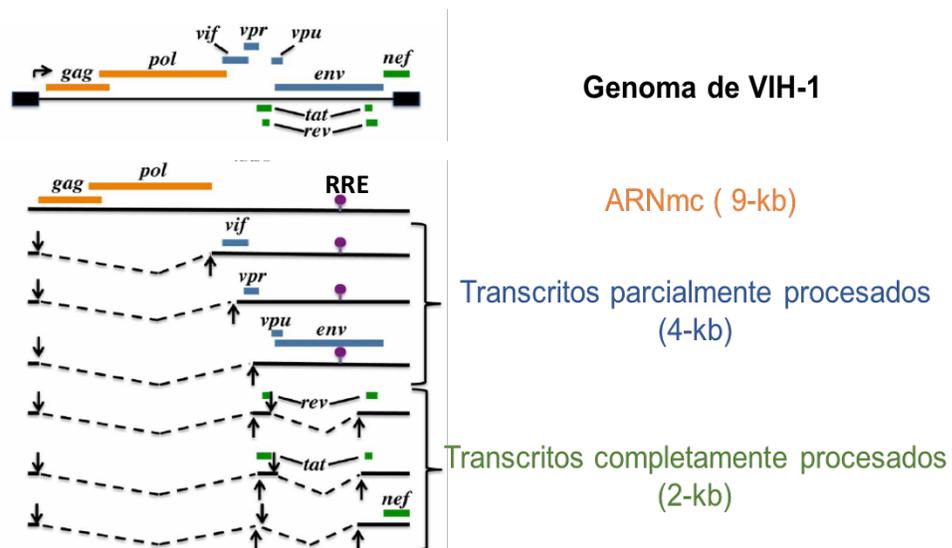
A**B**

Figura 1: Partícula y genoma viral. (A) Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo-1 con las proteínas que lo componen (glicoproteína 120, glicoproteína 41, matriz, cápside, nucleocápside, transcriptasa reversa, proteasa e integrasa) y las dos copias de su genoma de ARN. (B) Esquema del genoma proviral (línea negra flanqueada por dos rectángulos negros que señalan los dos LTR), contiene los nueve marcos de lectura abiertos, *gag*, *pol* (naranja), *vif*, *vpr*, *vpu*, *env* (azul), *tat*, *rev* y *nef* (verde) (esquema superior). Se generan tres clases de transcritos mediante corte y empalme alternativo (sitios 5' dador de corte y empalme y 3' aceptor de corte y empalme señalizados con flechas negras), denominados ARNm, transcritos parcialmente procesados y transcritos completamente procesados. Las proteínas accesorias, regulatorias y la proteína Env se pueden generar a partir de una variedad de ARN mensajeros virales, se muestra un ARN mensajero representativo para cada proteína (esquema inferior). Figura modificada de Mahiet, C. and Swanson, C. M. 2016.

Es posible clasificar a los retrovirus en dos tipos, los simples y los complejos. Los retrovirus simples codifican solo para las poliproteínas antes mencionadas, en cambio, el genoma de los retrovirus complejos además contiene genes que codifican para proteínas reguladoras y accesorias, las cuales desempeñan funciones específicas en diferentes etapas del ciclo replicativo (Figura 1B). El VIH-1 es un retrovirus complejo y sus genes regulatorios son *tat* y *rev* y los accesorios son *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, (Figura 1B) (Freed and Martin, 2013).

Ciclo replicativo de VIH-1

El proceso de infección comienza con la interacción de la proteína de envoltura viral gp120 con la glicoproteína de superficie celular CD4, presente principalmente en linfocitos T, células dendríticas y macrófagos (Figura 2) (Lasky et al., 1987; Maddon et al., 1986). Dicha interacción es necesaria, pero no asegura la infección debido a que la unión es reversible y se requiere la unión de gp120 con uno de los correceptores, receptor C-C de quimioquinas tipo 5 (CCR5) o receptor C-X-C de quimioquinas tipo 4 (CXCR4) (Cells et al., 1987; Feng et al., 1996) para gatillar la fusión de membranas entre la partícula viral y la membrana celular, desencadenando la entrada de la cápside viral en el citoplasma.

Una vez en el citoplasma, el complejo formado por el genoma viral, la transcriptasa reversa junto a proteínas virales y celulares (denominado

complejo de transcripción inversa o CTR) retrotranscribe el genoma de ARN a uno de ADN de doble hebra (ADNdh) (Figura 2). Una vez que finaliza la síntesis del nuevo ADN, el CTR se denomina complejo de pre-integración (CPI). El CPI se traslada por el citoplasma hasta las proximidades del núcleo (Jayappa et al., 2012), una vez ahí el genoma viral es capaz de entrar al núcleo a través de los poros nucleares, acompañado de la integrasa viral la cual cataliza la integración del ADNdh viral en el genoma celular, estableciendo el estado denominado provirus (Figura 2) (Frankel and Young, 1998; Nisole and Saïb, 2004).

Una vez integrado el provirus, se puede establecer un estado de latencia o comenzar la expresión de los genes virales, esto va a depender de las características particulares de la cromatina en la región del ADN donde se produjo la integración, además de las características de los factores celulares (ya sea represores o activadores) que se encuentran unidos al promotor viral, presente en la repetición terminal larga en el extremo 5´(5´LTR) (Burnett et al., 2009; Jordan et al., 2001). Los 5´LTR de provirus latentes se encuentran asociados a marcadores epigenéticos típicos de represión como histonas hipoacetiladas, trimetilación de la histona 3 (en lisina 27 y 9) y metilaciones del ADN (Mbonye and Karn, 2014; Ruelas and Greene, 2013). La activación de los linfocitos infectados por medio de

señales externas implica un aumento en las tasas de transcripción del genoma viral favoreciendo la salida del virus del estado latente.

La transcripción del ADN proviral es comandada por la ARN pol II, la cual sintetiza una molécula de 9-kb similar al genoma viral que ingresó. En etapas tempranas de la expresión génica viral, el transcrito de 9-kb funciona como un ARNm precursor que es procesado mediante corte y empalme alternativo generando 2 clases o poblaciones de ARN mensajeros, que pueden ser clasificadas de acuerdo a su tamaño en 2-, 4-kb (Figura 1B y Figura 2) (Karn, J. and Stoltzfus, 2012). El corte y empalme completo del transcrito de 9-kb genera una población de transcritos de 2-kb, los cuales codifican las proteínas reguladoras Tat y Rev, además de la proteína accesoria Nef (Figura 1B). La población de transcritos parcialmente procesados de 4-kb son traducidos para generar las proteínas virales Env, Vpu, Vpr y Vif mientras que las poli-proteínas Gag y Gag-Pol son producidas a partir del ARN de 9-kb, el cual no sufre corte y empalme (Figura 1B).

El transcrito de 9-kb es denominado ARN mensajero completo (ARNmc) o ARN genómico, debido a que puede ser utilizado como ARNm o como el genoma incorporado en las nuevas partículas virales. Para ser utilizado como genoma, el ARNmc posee señales en su extremo 5'-UTR que le permiten por un lado dimerizar con otra molécula idéntica así como

interactuar con el dominio nucleocápside de Gag. Este complejo Gag-ARNmc es transportado hacia la membrana celular donde ocurre el ensamblaje de la partícula viral y su posterior liberación por medio de yemación (Figura 2) (Freed, 2015). Finalmente, fuera de la célula ocurre la maduración de la partícula por la acción de la proteasa viral, la cual corta la poliproteína Gag generando las proteínas de matriz, cápside y nucleocápside y así un nuevo ciclo de replicación puede comenzar (Figura 1C) (Freed, 2015).

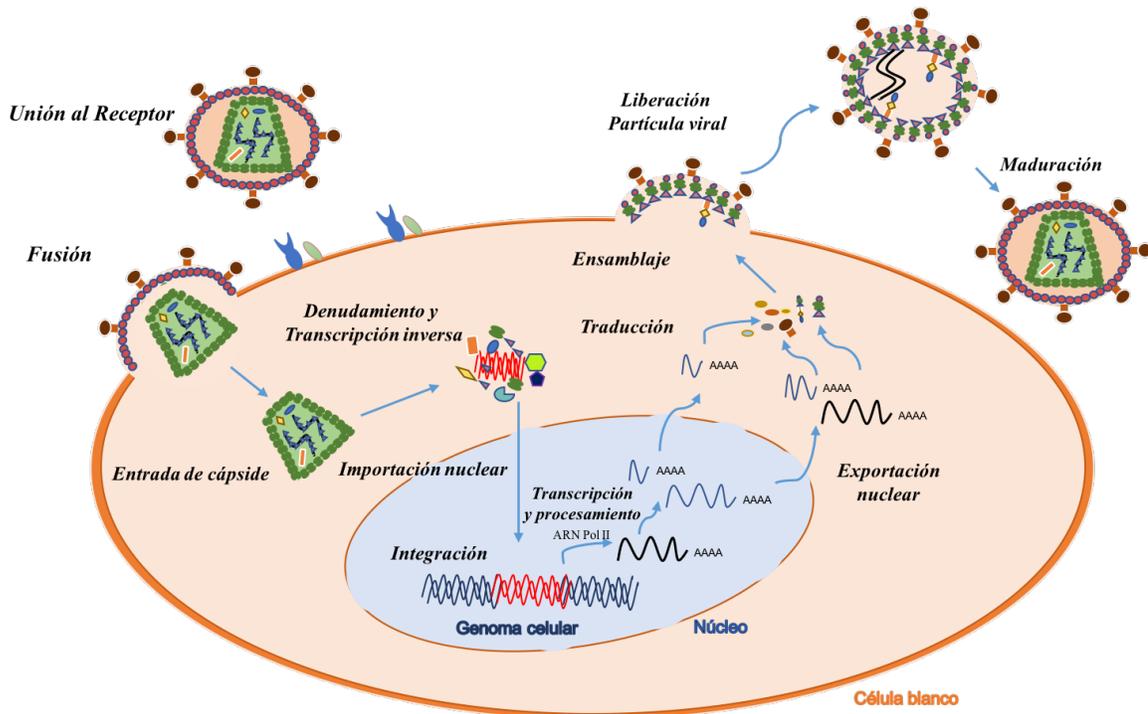


Figura 2: Ciclo replicativo de VIH-1. El ciclo replicativo de VIH-1 comienza con el reconocimiento de los receptores y co-receptores celulares por la glicoproteína de superficie del virus, este reconocimiento desencadena la fusión de ambas membranas y la entrada del genoma viral al citoplasma celular. En el interior de la célula ocurre el proceso de transcripción reversa del genoma de RNA de hebra simple (negro) a ADN de doble hebra (rojo), se forma el complejo de pre-integración el cual es importado al núcleo y promueve la integración del genoma viral en el genoma celular. Posteriormente el genoma viral es transcrito por la ARN pol II para generar un transcrito único de 9-kb el cual es procesado mediante corte y empalme alternativo generando diferentes clases de transcritos, los cuales son exportados y traducidos en el citoplasma para asegurar la síntesis de las proteínas virales. Finalmente, ocurre el ensamblaje de las nuevas partículas virales en la membrana celular, la liberación de estas y su maduración por la acción de la proteasa viral.

Control de la expresión del ARN mensajero completo de VIH-1

El genoma proviral integrado es transcrito por la ARN pol II, la cual se encarga de sintetizar los ARN mensajeros (ARNm), microARN, ARN no codificantes intergénicos largos y ARN nucleares pequeños de la célula. Al igual que estos ARN celulares, el ARN viral es procesado en sus extremos 5' y 3' mediante la adición de la estructura cap y la cola de poli-A, respectivamente. En un principio, la ARN pol II inicia la transcripción normalmente, sin embargo, se genera una pausa abortiva que impide la elongación de la transcripción y solo se generan transcritos pequeños (Laspia et al., 1989). Se han descrito algunas proteínas celulares y secuencias de ADN que pueden estimular la elongación de la transcripción del genoma proviral (Rampalli, S. et al., 2003; Yedavalli, V.S.R.K. et al., 2003), de esta manera permiten la acumulación de la proteína Tat, reguladora de la elongación de la transcripción viral. Esta proteína interactúa, por un lado, con una estructura presente en el 5' del ARN viral denominada TAR y por otro recluta al complejo pTEFb conformado por la Ciclina T1 y la quinasa CDK9, la cual hiperfosforila el dominio C-terminal de la ARN pol II aumentando así la eficiencia de elongación de la transcripción (Karn, J. and Stotzfus, 2012).

La transcripción completa del genoma viral genera al transcrito de 9-kb, el cual pese a contener regiones intrónicas (definidas por la presencia de una

secuencia donadora y otra aceptora de corte y empalme) debe ser exportado al citoplasma para cumplir con sus funciones. El ARNmc no puede ser exportado del núcleo a través de la maquinaria canónica de exportación de los ARNm celulares, razón por la cual, el ARNmc utiliza a la segunda proteína reguladora viral, Rev, para permitir su exportación nuclear. La proteína Rev entra al núcleo utilizando la señal de localización nuclear presente en su extremo N-terminal e interacciona con la estructura RRE del ARNmc ubicada en la región del gen *env* (Malim and Cullen, 1991). La inhibición del corte y empalme inducida por factores celulares y por la proteína Rev localizada en el núcleo (Powell, D.M. et al., 1997; Caputi, M. et al., 1999; Domsic, J.K. et al., 2003), desencadena la acumulación nuclear, en primer lugar, de los transcritos con corte y empalme parcial de 4-kb y finalmente del ARNmc de 9-kb, el cual no sufre remoción de intrones. La oligomerización de Rev sobre la estructura RRE resulta en el reclutamiento de la proteína celular CRM1 cuya función celular es la exportación de ARN nucleares pequeños y proteínas con señales de exportación nuclear (NES) ricas en leucinas. En el caso de VIH-1, CRM1 facilita la exportación de los transcritos que contienen RRE hacia el citoplasma (Karn, J. and Stoltzfus, 2012). Además de su reconocida función en la exportación nuclear, también se ha descrito que Rev promueve la asociación de los transcritos de 9-kb con los ribosomas (Arrigo and Chen, 1991; Kimura et al., 1996) (Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F. et al., 2018). De esta manera Tat y

Rev son los reguladores principales de la expresión del ARNmc de VIH-1 al controlar su transcripción, exportación nuclear y traducción.

Control de la expresión de los ARN mensajeros celulares

Si comparamos el control de la expresión del ARNmc y el de los ARNm celulares, ambos están dados por la asociación de diferentes proteínas que permiten regular los procesos. Como ya mencionamos en el párrafo anterior, las proteínas virales Tat y Rev son las principales reguladoras de la expresión del ARNmc. En el caso de los transcritos celulares, estos regulan su correcta expresión mediante el reclutamiento de diferentes proteínas durante las diversas etapas de su metabolismo (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Singh et al., 2013). Estas proteínas señalizan el correcto procesamiento de los ARNm y regulan su destino en el citoplasma. Uno de los pasos fundamentales en la maduración de los transcritos es el corte y empalme. Durante este proceso se recluta una variedad de proteínas en los ARNm las cuales sirven de sello a los transcritos que fueron procesados correctamente, asegurando además su eficiente exportación nuclear, localización sub-celular y traducción (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Singh et al., 2013). Además del corte y empalme, otro proceso que favorece la traducción es la vía de exportación, ya que la presencia de las proteínas asociadas a la vía canónica de exportación de los ARNm favorece positivamente la traducción en el citoplasma (Jin et al., 2003).

En contraste a los mensajeros celulares, el ARNmc de VIH-1 al no pasar por el proceso de corte y empalme y al ser exportado por una vía alternativa que depende de Rev y CRM1, no recluta las mismas proteínas y, por lo tanto, no es favorecido de la misma forma que estos. Es más, un trabajo reciente demostró que la proteína Rev interacciona con el complejo de unión al cap nuclear (CBC) impidiendo que proteínas implicadas en la vía canónica de exportación nuclear sean reclutadas a los transcritos virales corte y empalme parcial (Taniguchi et al., 2014). Pese a que el ARNmc de VIH-1 llega al citoplasma por una vía diferente a la utilizada por los ARNm celulares, este es capaz de traducir de manera eficiente y producir una gran cantidad de proteínas, ya que se necesitan, en promedio, de 5.000 copias de Gag para generar una partícula viral inmadura de 145-nm (Briggs et al., 2004).

Por todo lo antes mencionado, para poder entender el mecanismo por el cual el virus asegura la eficiente expresión de este transcrito, es necesario conocer las proteínas con las cuales interactúa, y de qué manera estas son capaces de asegurar su eficiente salida del núcleo y asociación con los ribosomas.

Complejo nuclear de unión al cap y VIH-1

Observamos que existen diferencias entre las proteínas asociadas al ARNmc y los ARNm celulares debido a diferencias en las etapas de procesamiento de estos transcritos. Sin embargo, también existen similitudes y en esta ocasión nos centraremos en las relacionadas con el procesamiento del extremo 5' y la adición de la estructura cap.

La modificación química denominada cap consiste en la adición de una guanosina metilada en la posición 7 unida por un puente 5'-5' trifostato al primer ribonucleótido de la cadena de ARN (m^7GpppN , donde N es cualquier nucleótido). Dicha modificación es reconocida de manera co-transcripcional por el complejo nuclear de unión al cap (CBC), el cual está compuesto por dos sub-unidades, la proteína nuclear de unión a cap 1 (NCBP1, también conocida como CBP80) y NCBP2 (o CBP20), siendo esta última la que tiene la capacidad de unir directamente al cap (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014). Se ha descrito que el CBC regula diferentes etapas del metabolismo de los ARNm, ya que CBP80 interactúa con proteínas relevantes para la transcripción, corte y empalme, procesamiento del extremo 3', exportación nuclear, traducción y degradación (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Müller-McNicoll and Neugebauer, 2014). De esta manera, el CBC juega un rol clave en el acoplamiento de las diversas etapas del metabolismo de los ARNm. Una vez en el citoplasma, el CBC no

se disocia inmediatamente del ARNm, sino que se mantiene unido y participa de la denominada primera ronda de traducción (Maquat et al., 2010). Tradicionalmente, se ha descrito que existen dos complejos asociados a la traducción dependiente del cap. En una primera etapa ocurre una traducción comandada por el CBC en la cual los transcritos pasan por un control de calidad, donde los ARNm que poseen codones de término prematuro son degradados a través de un proceso denominado NMD (del inglés *nonsense-mediated decay*) (Maquat, 2004). Una vez que los ARNm superan este control, las proteínas asociadas al ARNm son reordenadas, el CBC es disociado del cap y reemplazado por la proteína de unión al cap citoplásmica, el factor de inicio de la traducción eucarionte 4E (eIF4E) iniciándose la traducción dependiente de este factor, la cual tiene como finalidad la síntesis de proteínas.

Algunos estudios previos han asociado al CBC con la replicación de VIH-1. En primer lugar, existe evidencia que muestra una inducción del transcrito de CBP80 en linfocitos-T infectados con VIH-1 (Krishnan, V. and Zeichner, S. L. 2004). Posteriormente, se observó que el CBC era necesario para la activación de la transcripción mediada por Tat en donde se propuso que la presencia del CBC favorece el reclutamiento del complejo P-TEFb al promotor proviral (Lenasi et al., 2011). Luego, se describió que la proteína viral Rev interacciona con CBP80 impidiendo su asociación con factores de

exportación de ARN mensajeros celulares como Aly/Ref, favoreciendo el mecanismo de exportación mediado por CRM1 de los transcritos de 4-kb (Taniguchi, I. *et al.*, 2014).

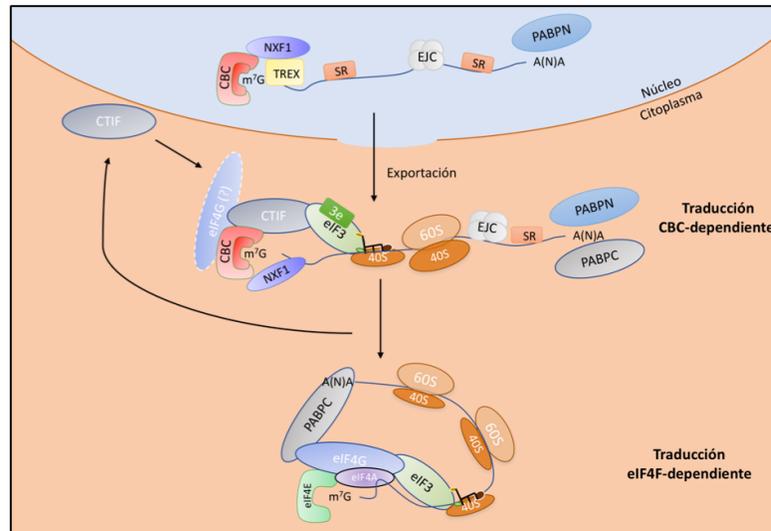


Figura 3: Mecanismos de traducción dependientes del cap. Una vez que un ARNm celular es exportado al citoplasma, el complejo CBC recluta la proteína CTIF, la cual a su vez recluta al complejo eIF3 y de esta manera promueve su traducción. Esta etapa se denomina primera ronda de traducción o traducción dependiente del CBC. Luego, el complejo CBC es reemplazado por el complejo eIF4F (compuesto por eIF4E-eIF4G-eIF4A) y el reclutamiento del complejo eIF3 al ARNm celular está mediado por la proteína eIF4G. A este mecanismo de traducción se le denomina traducción dependiente de eIF4F. También se muestran las proteínas PABPN, PABPC, EJC (complejo de unión a exones), subunidad 40S, subunidad 60S, NXF1, TREX, eIF3g y proteínas SR.

Relacionado con el rol del CBC en traducción, Sharma *et al.*, 2012 propuso que el mecanismo de traducción del ARNm celular estaría mediado por el CBC. Esto basado en la observación de que el ARNm celular se mantiene asociado con

la sub-unidad CBP80 del CBC durante la inhibición de la función de eIF4E producida por la proteína viral Vpr (Sharma et al., 2012). Estos datos son avalados por la presencia de la proteína CBP80 y no eIF4E en las partículas virales (Sharma et al., 2012). Además, otro artículo también sugiere que eIF4E sería excluido del ARNmc y no participa de su traducción, proponiendo que podría ser reemplazado por la helicasa de ARN DDX3, aunque no es posible descartar que la interacción de DDX3 este dada por la mediación de otra proteína capaz de unir el cap (Soto-Rifo et al., 2013).

Si bien la evidencia recopilada favorece un mecanismo de traducción independiente de eIF4E, no existen mayores antecedentes que avalen que la traducción del ARNmc depende del CBC. Al estudiar las proteínas asociadas al CBC durante la traducción, se describió un factor de inicio que participa exclusivamente en este mecanismo, el cual se denominó CTIF (del inglés *CBP80/20-dependent translation initiation factor*) (Mi Kim et al., 2009) (Figura 3). Su rol en la traducción de los ARNm celulares es análogo al que cumple la proteína de andamiaje eIF4G durante la traducción dependiente de eIF4E y actuaría reclutando el complejo eIF3 mediante su interacción con la sub-unidad eIF3g, permitiendo así el reclutamiento de la sub-unidad 40S y, por ende, la primera ronda de traducción (Choe et al., 2012) (Figura 3). Hasta la fecha no existen antecedentes que vinculen a esta proteína con la traducción del ARNmc de VIH-1.

En resumen, existe evidencia que sugiere que la síntesis de Gag a partir del ARNmc de VIH-1 se llevaría a cabo preferentemente asociada al CBC en desmedro de eIF4F. Es en este contexto donde se desarrolló el presente proyecto de tesis, el cual se enfocó en estudiar el rol de la sub-unidad del CBC denominada CBP80 en la síntesis de Gag, además de la participación del factor de inicio de la traducción dependiente del CBC, CTIF, en este proceso.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El complejo CBP80-CTIF favorece la síntesis de Gag a partir del ARNmc de VIH-1.

Objetivo General

Determinar si el complejo CBP80-CTIF favorece la síntesis de Gag a partir del ARNmc de VIH-1.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar si CBP80 favorece la síntesis de Gag.
- 2) Determinar si CTIF favorece la síntesis de Gag

Materiales y métodos

Vectores de ADN

Se utilizaron los vectores provirales pNL4.3- Δ Env, pNL4.3R- Δ Env, pNL4.3R- Δ Rev, pROD10R- Δ Env y pNCAC previamente descritos (Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F, et al., 2018; Frohlich, A., et al., 2016; Felkner, R.H. and Roth, M.J.1992). Los vectores de expresión pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF(1-305) y pcDNA3-Flag-CTIF(306-598) fueron previamente descritos (Mi Kim, K., et al., 2009) y provistos cordialmente por el doctor Yoon Ki Kim (Universidad de Korea). Los vectores pcDNA-d2EGFP, pCDNA- β -globin 5'-UTR, pCIneo-Renilla and pEGFP-Rev fueron previamente descritos (Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F, et al. 2018; Frohlich, A., et al. 2016).

Cultivo celular y transfección de ADN

Las líneas celulares humanas HeLa y HEK293T se mantuvieron con DMEM (Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bobino (Pan-Biotech), 1% de glutamina (Corning) y 1% antibióticos y antimicóticos (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. La línea celular Jurkat clon E6-1 se mantuvo con RPMI 1640 (Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bobino (Pan-Biotech), 1% de glutamina (Corning) y 1% antibióticos y antimicóticos (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C con 5%

de CO₂. Las células HeLa y HEK293T se transfectaron utilizando polietilenimina (PEI) lineal de 25.000 Da (Polysciences) utilizando una proporción de µg ADN/µl PEI de 1/15.

Análisis de la actividad de la luciferasa de Renilla

La actividad Renilla luciferasa se determinó usando el kit *Renilla Reporter Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones de los desarrolladores y el luminómetro *GloMax® 96 microplate luminometer* (Promega).

Western blot

Los extractos celulares se cargaron en geles al 12%, resueltos mediante SDS-PAGE y transferidos a una membrana de PVDF *Amersham Hybond™-P* (GE Healthcare). Las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos. Se usó un anticuerpo monoclonal, diluido 1/1.000, que reconoce a la proteína p24 (Cápside) de VIH-1, proporcionado por el NIH AIDS Reagents Program (número de catálogo 3537), anticuerpos de conejo que reconocen a la proteína CTIF endógena (ThermoFisherScientific), diluido 1/250 o a la proteína de la cápside del virus de la leucemia murina (MLV) (concedido amablemente por la Dr. Gloria Arriagada, UNAB, Chile), anticuerpos de ratón que reconocen a la proteína GAPDH endógena (Santa Cruz Biotechnologies) diluida 1/5.000, a la proteína-F del virus respiratorio

sincicial humano (VRSh) (Santa Cruz Biotechnologies) diluido 1/500, al antibiótico puromicina (Milipore, clone 12D10) diluido 1/5.000 o a la proteína actina endógena (Santa Cruz Biotechnologies) diluida en 1/750. Las membranas se revelaron utilizando el sustrato *Pierce® ECL* o el *SuperSignal™ West femto* (ThermoFisherScientific) utilizando el equipo *HD9 Western blot Imaging System* (UVItec).

Silenciamiento de CTIF, transfección proviral y ensayo de recuperación

Las partículas lentivirales que contienen el ARN interferente anti-CTIF se prepararon en células HEK293T mediante transfección del vector comercial pLKO.1 (Stewart, S., et al., 2003) que contiene una secuencia de shRNA que reconoce el 3'-UTR del ARNm de CTIF (Sigma-Aldrich, SHCLNG-NM_014772), el vector pVSVg y el vector psPax2 (Addgene #12260) (Peña, N., et al 2015). El sobrenadante de las células HEK293T se recolectó a las 48 horas post-transfección (hpt), se filtró (filtro de 0,22 µm) y se utilizó para transducir células HeLa. El medio que contiene las partículas lentivirales se reemplazó por medio fresco a las 24 horas y las células fueron mantenidas por 48 horas más y luego se trataron con puromicina (10 µg/ml) por 10 días. El silenciamiento de CTIF se evaluó mediante Western blot, para lo que se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína CTIF, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Partículas lentivirales que portan una secuencia

desordenada de ARN interferente se utilizaron como control (shCTR). Las secuencias de ambos shRNA se presentan en la Tabla I. En el análisis de complementación, las líneas celulares control y de CTIF silenciadas se transfectaron con el vector pNL4.3R junto con pcDNA-d2EGFP o pcDNA3-Flag-CTIF y la actividad de la luciferasa de Renilla fue determinada como se mencionó anteriormente.

Tabla I: Secuencias de los ARN interferentes

shRNA	Secuencia
shCTR	5'- CCGGTGATGTGAAAGTTCCGTCTGTTGGATCCCCAGACGGAACTTTCACATCTTTTTTG -3'
shCTIF	5'-CCGGGCCGCTTCCTTATTTGCTCTTCTCGAGAAGAGCAAATAAGGAAGCGGCTTTTTTG-3'

Producción de un pseudotipo de VIH-1 y ensayos de infección

Células HEK293T se co-transfectaron con los vectores pNL4.3-ΔEnv y pVSVg y el sobrenadante del cultivo se recolectó a las 72 hpt, se filtró (filtro de 0,22 μm) y usó para infectar células Jurkat utilizando una mezcla de 1:1 con medio de cultivo RPMI. Las células infectadas se recolectaron a las 8, 12, 20, 24, 48, 72 y 96 horas post-infección (hpi), lavaron con 300 μl de PBS y centrifugaron a 500 x g por 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 100 μl de buffer de lisis A (150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 inhibidor de proteasa [Roche]),

vortexearon por 5 segundos, e incubaron por 30 minutos a 4°C con agitación y luego se centrifugaron a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante que contiene el lisado celular se recuperó y 30 µg de proteínas se analizaron mediante Western blot.

Para la producción de virus respiratorio sincicial humano (VRS_h), células HEp-2 se incubaron con 500 µl de virus y el sobrenadante se recuperó cuando se observó un 80% de los efectos citopáticos. El sobrenadante se centrifugó para eliminar restos celulares y se almacenó a -80°C. Para la cuantificación del VRS_h producido, se realizó un ensayo TCID₅₀ en células MA104 como se ha descrito previamente (Hierzoler, J.C. and Killington, R.A. 1996).

Ensayo SUnSET (Sensor superficial de la traducción)

Se analizó la síntesis global de proteínas celulares en condiciones control y de sobreexpresión de CTIF mediante la incorporación de puromicina en los péptidos sintetizados (Schmidt, E.K., et al. 2009). Células HeLa se transfectaron con pcDNA-d2EGFP o pcDNA3-Flag-CTIF y a las 24 hpt se trataron con puromicina a 10 µg/ml por 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con el buffer de lisis B (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1 mM EDTA y *EDTA-free protease inhibitors cocktail* [Roche]). Del extracto de proteínas totales de las

células lisadas se utilizaron 20 µg para análisis mediante Western blot. Como control de inhibición de la síntesis proteica, se trataron las células HeLa con 0,5 mM de arsetino de sodio (Sigma-Aldrich) por 45 minutos, previo al tratamiento con puromicina.

Extracción de ARN y RT-qPCR

La extracción del ARN citoplasmático y el posterior RT-qPCR se realizó como se ha descrito previamente (Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F, et al. 2018; Frohlich, A., et al. 2016). Brevemente, las células transfectadas se lavaron con PBS y despegaron del pocillo con PBS-EDTA 10 mM. Luego, se centrifugaron a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C y lisaron durante 2 minutos a temperatura ambiente con 200 µl de buffer RLNa (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5% NP-40 y 2 mM de complejo ribonucleósido de vanadyl [VRC] [New England Biolabs]). El lisado celular se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática y se procedió con la extracción de ARN con *TRIzol® Reagent* (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc a partir del ARN citoplasmático (300 µg) se llevó a cabo con el kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar el PCR cuantitativo (qPCR) se preparó un mix de 25-µl con 5 µl de ADNc (previamente diluido 1/10), 12.5 µl del *2X Brilliant II*

SYBR Green QPCR master mix (Agilent Technologies), 0,2 µM de los cebadores sentido (Se) y antisentido (An) y la amplificación se realizó en el equipo AriaMX Real Time PCR System (Agilent). Como control, el gen endógeno GAPDH amplificó en paralelo. Se comparó el número de copias relativo del ARNmc de VIH-1 con el de GAPDH utilizando la fórmula $x^{-\Delta Ct}$ (donde X corresponde a la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores obtenida experimentalmente). Las secuencias de los cebadores utilizados se presentan en la Tabla II.

Tabla II: Secuencias de los cebadores utilizados en RT-qPCR.

Primer	Sequence
Se-GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
An-GAPDH	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Se-ARNmc	5'-GCAGTGGCGCCCGAACAGG-3'
An-ARNmc	5'-TTTTTGGCGTACTCACCAGTC-3'

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), inmunofluorescencia y microscopía confocal

Se generaron sondas específicas que reconocen el ARNmc de VIH-1 mediante transcripción *in vitro* utilizando el vector pBSK-Gag/Pol

previamente linealizado con la enzima de restricción EcoRI (Soto-Rifo et al. 2013). La reacción de transcripción se realizó utilizando 1 µg del vector lineal, 10 U de ARN polimerasa T3 (Promega), 20 U de RNAsin (Promega), 1,6mM de GTP, ATP y CTP y 1,04 mM UTP/0,56mM 11-digoxigenina-UTP [Roche]), 3 mM de DTT y 5 µl de *Transcription Optimized 5X Buffer*, en un volumen final de 25 µl. El transcrito de 5-kb obtenido en la transcripción es complementario a la región Gag/Pol del ARNmc y se fragmentó utilizando el *RNA fragmentation buffer* (ThermoFisherScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con la fragmentación se obtuvo oligonucleótidos de entre 100 a 200 nucleótidos de largo. Los fragmentos obtenidos se purificaron usando las perlas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter).

En los ensayos de FISH las células HeLa se cultivaron en placas de 12 pocillos sobre un cubre-objeto y se transfectaron con 1 µg de cada vector. A las 24 hpt las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron por 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, las células se permeabilizaron por 10 minutos a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0,2% y se procedió a hibridar toda la noche en una cámara húmeda a 37°C en 200 µl de mix de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasas, 50% formamida, 300 µg ARNt y 120 ng de sondas con 11-digoxigenina-UTP). Las células se lavaron con

0,2X SSC/50% formamida durante 30 minutos a 50°C y luego se lavaron tres veces con solución de dilución de anticuerpos (2X SSC, 8% formamide, 2 mM de VRC, 0.02% *RNase-free* BSA). Se agregaron los anticuerpos anti-digoxigenina hecho en ratón y anti-Flag hecho en conejo (Sigma-Aldrich) diluidos 1/100 en solución de dilución de anticuerpos e incubó por 2 horas con las células a temperatura ambiente. Después de tres lavados con solución de dilución de anticuerpos las células se incubaron por 90 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti-ratón conjugado a Alexa 488 y anti-conejo conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes), ambos diluidos 1/500. Las células se lavaron tres veces con solución de lavado (2X SSC, 8% formamida, 2 mM VRC), dos veces con PBS y se incubaron con DAPI (0,3 g/ml in PBS) (Life Technologies) por 1 minuto a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y tres veces con agua libre de nucleasas y finalmente se montaron en el porta objeto con *Fluoromount*TM (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesaron utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

Ensayo de ligación proximal (*proximity ligation assay*, PLA)

El ensayo de ligación proximal se realizó utilizando el kit *DUOLINK II In Situ* (Sigma-Aldrich) y los *PLA probe anti-mouse minus* y *PLA probe anti-rabbit plus* (Sigma-Aldrich). Para realizar esto, células HeLa previamente fijadas

con PFA y permeabilizadas con Triton-X100, se pre-incubaron con solución de bloqueo (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios correspondientes se diluyeron 1/100 en 40 µl de solución de bloqueo e incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X e incubaron con anticuerpos secundarios *DUOLINK anti-rabbit PLA-plus probe* y *DUOLINK anti-mouse PLA-minus probe* diluidos en solución de dilución de anticuerpos de DUOLINK a 37°C por 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se procedió con la reacción de ligación a 37°C por 30 minutos en una cámara húmeda. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se realizó la reacción de amplificación a 37°C por 100 minutos en cámara húmeda. Las muestras se incubaron con DAPI (0,3 g/ml en PBS) por 1 minuto a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y tres veces con agua libre de nucleasas y se montaron con *Fluoromount* (Sigma-Aldrich). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesaron usando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

Hibridación *in situ* acoplada a PLA (ISH-PLA)

El ISH-PLA es una combinación de las técnicas FISH y PLA. Para esto, se crecieron células HeLa en cubre-objetos, se fijaron con PFA y permeabilizaron con Triton-X100 e hibridaron en 200 µl de solución de

hibridación mix (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasas, 50% formamida, 300 µg ARNt y 120 ng de sondas con 11-digoxigenina-UTP) a 37°C en una cámara húmeda. Las células se lavaron con 0,2X SSC/ 50% formamida durante 30 minutos a 50°C e incubaron con solución de bloqueo por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las células tres veces con la solución de dilución de anticuerpos (2X SSC, 8% formamida, 2 mM VRC y 0,02% BSA libre de ARNasas). Los anticuerpos primarios de ratón anti-digoxigenina y de conejo anti-proteína de interés, diluidos 1/100 en solución de dilución de anticuerpos, se agregaron a las células y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios del PLA (*DUOLINK anti-rabbit PLA-plus probe* y *DUOLINK anti-mouse PLA-minus probe*) por 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Las etapas de ligación y amplificación se realizaron siguiendo el mismo protocolo de PLA descrito anteriormente. Luego, los cubreobjetos se incubaron con DAPI (0,3 g/ml en PBS) (Life Technologies) durante 1 minuto a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y tres veces con agua libre de nucleasas y se montaron en el portaobjeto con *FluoromountTM* (Sigma-Aldrich). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesaron usando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

Resultados

El ARNmc de VIH-1 interactúa preferentemente con CBP80 en el citoplasma

Se ha propuesto que el cap del ARNmc de VIH-1 se mantendría asociado al CBC en el citoplasma no siendo reemplazado por el factor eIF4E luego de la primera ronda de traducción. Para examinar este fenómeno se procedió a evaluar la proximidad del ARNmc con las proteínas CBP80 y con eIF4E mediante una variación del PLA, el cual, utilizando microscopia confocal permite visualizar la asociación de dos proteínas cuando están a una distancia menor a 40 Å. En esta ocasión, el método fue adaptado para visualizar proximidad entre el ARNmc de VIH-1 y las proteínas deseadas (*in situ hybridization-PLA* o *ISH-PLA*). Para esto se utilizaron sondas marcadas con digoxigenina (UTP-digoxigenina) que reconocen la secuencia Gag-Pol del ARNmc viral. La digoxigenina es reconocida por el anticuerpo primario, el cual, a su vez es reconocido por el anticuerpo secundario del PLA. Si los elementos analizados están a una distancia menor de 40 Å se produce una señal que se observa como un punto de color rojo al interior de las células. Para realizar el análisis se transfectó la línea celular HeLa con el vector proviral pNL4.3 junto con el vector de expresión Myc-CBP80 o Myc-eIF4E y se utilizó el anticuerpo anti-Myc para reconocer las proteínas expresadas. Al analizar la proximidad del ARNmc con las proteínas se observó señal en ambas condiciones (Figura 4A). Sin embargo, cuando se cuantificó la cantidad de interacciones individuales (puntos rojos) en

cada condición, se observó que CBP80 presenta una mayor cantidad interacciones con el ARNmc que eIF4E (Figura 4B). Este resultado indica que si bien el ARNmc de VIH-1 puede ser encontrado próximo a ambas proteínas, la interacción con CBP80 es predominante en comparación con eIF4E.

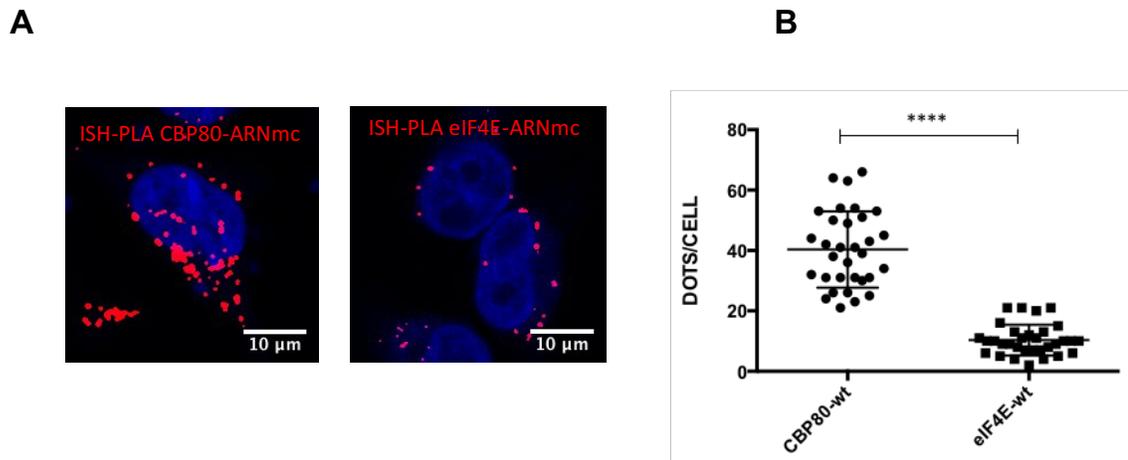


Figura 4: Ensayo de proximidad entre el ARNmc y eIF4E o CBP80. (A) Células HeLa fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 junto con pCMV-Myc-CBP80 o con pCMV-Myc-eIF4E y a las 24 horas post transfección fueron sometidas al ensayo ISH-PLA usando las sondas que reconocen al ARNmc y los anticuerpos α -Myc y α -digoxigenina y el kit Duolink[®] *in situ*. En azul se observan los núcleos celulares, teñidos con DAPI. (B) Cuantificación de los puntos de ISH-PLA por células en cada condición (n=32) (****P < 0.0001, Mann–Whitney test).

La sobreexpresión de CBP80 estimula la síntesis de Gag

El resultado anterior indica que el ARNmc se asocia preferencialmente con CBP80 en comparación con eIF4E. Para determinar si esta mayor interacción tiene efectos en la expresión del ARNmc se procedió a expresar Myc-eIF4E y Myc-CBP80 se analizó el efecto de la sobreexpresión sobre la síntesis de Gag (Figura 5A). Para esto, se co-transfectó un vector de expresión para CBP80 o eIF4E junto con el vector proviral pNL4.3R, el cual expresa una proteína de

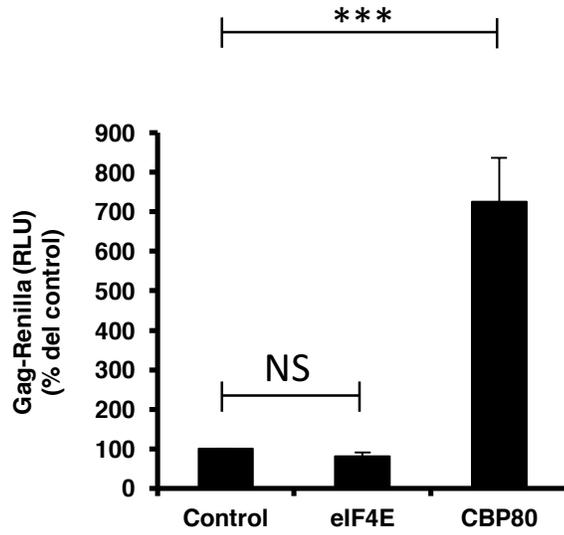
fusión Gag:Renilla a partir del ARNmc (Soto-Rifo et al., 2012). De esta manera se cuantificó el nivel de producción de proteínas a partir de dicho transcrito viral (Figura 5A). En estas condiciones se observó que CBP80 induce una estimulación de aproximadamente 8 veces en la síntesis de Gag:Renilla, en cambio eIF4E no tiene efecto sobre la síntesis de la poli-proteína viral (Figura 5A). Estos resultados reafirman la idea de que CBP80 pudiese tener un rol preponderante en la expresión del ARNmc en comparación con la proteína citoplasmática de unión a cap, eIF4E.

Anteriormente, se mencionó que la proteína viral Rev es un regulador de la expresión del ARNmc y se ha descrito que interacciona *in vitro* con CBP80 (Taniguchi et al, 2014), por lo que se procedió a determinar si participa en la estimulación de la síntesis de Gag producida por la expresión ectópica de CBP80. Para cumplir este objetivo, en el laboratorio contamos con un mutante del vector proviral, el cual posee una mutación sin sentido en el marco de lectura de la proteína Rev (pNL4.3R- Δ Rev o simplemente Δ Rev) y al igual que el vector proviral silvestre expresa la proteína de fusión Gag:Renilla (Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F. et al., 2018). Cuando analizamos el efecto de CBP80 sobre el provirus Δ Rev se observó un aumento significativamente menor en la síntesis de Gag:Renilla en comparación con virus silvestre (Figura 5B, panel superior). Esto indicaría

que la proteína viral Rev participaría en el rol estimulador generado por CBP80.

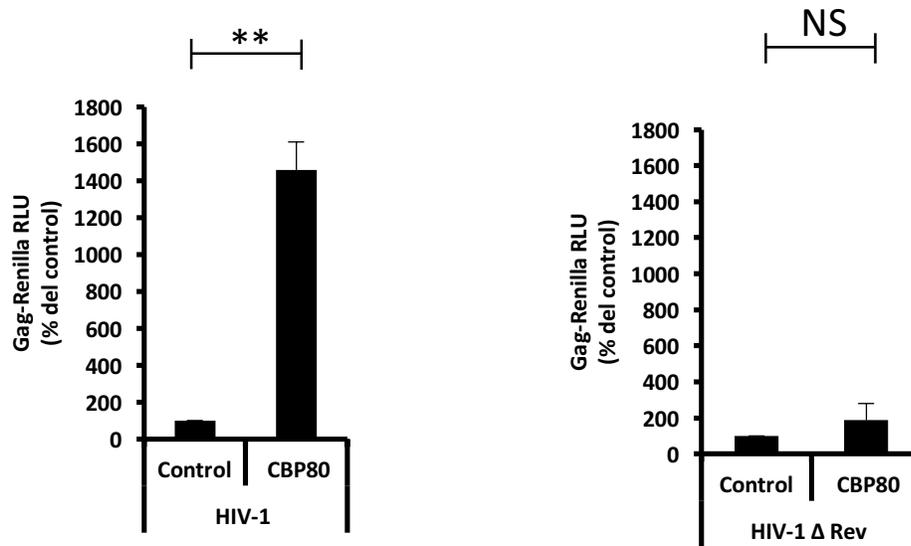
A continuación, se procedió a cuantificar el ARNm del virus a partir de extractos citoplasmáticos y a calcular la eficiencia de traducción desde las células co-transfectadas con el vector de expresión de CBP80 y el vector proviral pNL4.3R o el mutante Δ Rev (Figura 5B, panel medio). En el caso de la cuantificación del ARNm estos resultados indican que CBP80 produce un aumento de 5-veces en la acumulación del ARNm en el citoplasma celular cuando se analiza el provirus silvestre y de 2-veces con el provirus Δ Rev (Figura 5B, panel medio). La eficiencia de traducción del ARNm (obtenida por medio del cálculo de la razón entre el nivel Gag:Renilla y el nivel del ARNm en el citoplasma) del provirus silvestre es estimulada 3 veces por CBP80 y en la mutante Δ Rev no tiene un efecto estadísticamente significativo (Figura 5B, panel inferior). De esta manera, podemos concluir que la expresión de CBP80 tiene un efecto en la síntesis de Gag, que se puede dividir en un aumento en la cantidad de ARNm en el citoplasma como en un aumento en la eficiencia de la traducción. Además, los resultados indicarían que este efecto depende de la presencia de Rev en el sistema y que se pierde completamente el aumento de la eficiencia de traducción en ausencia de la proteína viral.

A

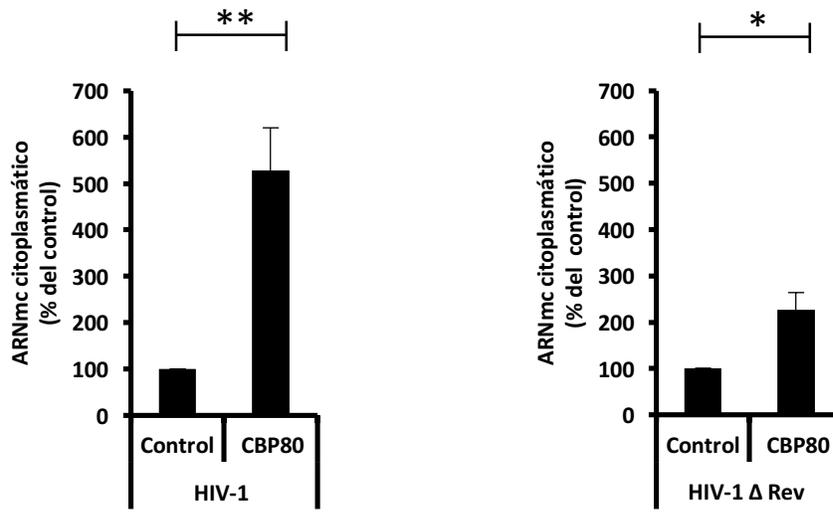


B

Expresión de Gag



ARNmc citoplasmático



Eficiencia de Traducción

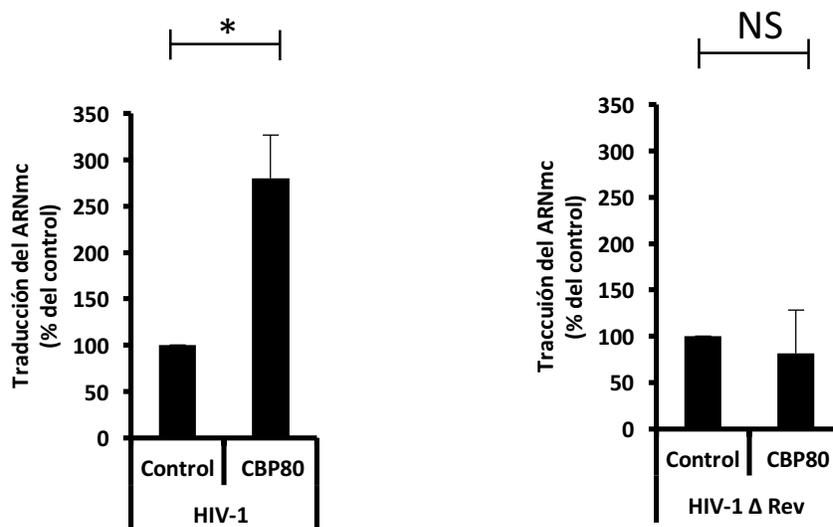


Figura 5: CBP80 y estimula la síntesis de Gag.

(A) Células HeLa fueron transfectadas con pCMV-Myc-d2EGFP (Control), pCMV-Myc-eIF4E o pCDNA-Myc-CBP80 junto al vector proviral pNL4.3R. La actividad de la luciferasa de Renilla se determinó a las 24 horas post-transfección (NS; no significativo; ****P < 0.0001, t-test) como se indica en materiales y métodos. **(B)** Células HeLa fueron transfectadas con pCDNA-d2EGFP (Control) o pCDNA-V5-CBP80 en condiciones silvestres (pNL4.3R) o mutantes (pNL4.3R-ΔRev). La actividad de la luciferasa de Renilla, la cuantificación del ARNmc citoplasmático y el cálculo de la eficiencia de traducción se realizó a las 24 horas post-transfección como se indica en materiales y métodos (*P < 0.05; **P < 0.01; NS; no significativo, t-test).

CBP80 forma un complejo con la proteína viral Rev

Como ya hemos mencionado, anteriormente se describió la interacción *in vitro* entre la proteína celular CBP80 y Rev (Taniguchi, I. et al., 2014), para evaluar si es posible observar esta interacción al interior de células humanas se procedió a visualizar la proximidad entre CBP80 y la proteína viral Rev mediante el ensayo de PLA en la línea celular HeLa (Figura 6). Para esto, se expresó la proteína viral Rev y realizó el ensayo evaluando proximidad con la proteína CBP80 endógena (Figura 6, panel medio) o expresada a partir de un vector de expresión (Figura 6, panel derecho). En ambos casos es posible visualizar los puntos de interacciones individuales, siendo mayores en condiciones de sobreexpresión de la proteína celular. Este resultado indicaría que ambas proteínas estarían próximas en el interior de la célula, siendo posible una interacción entre ellas.

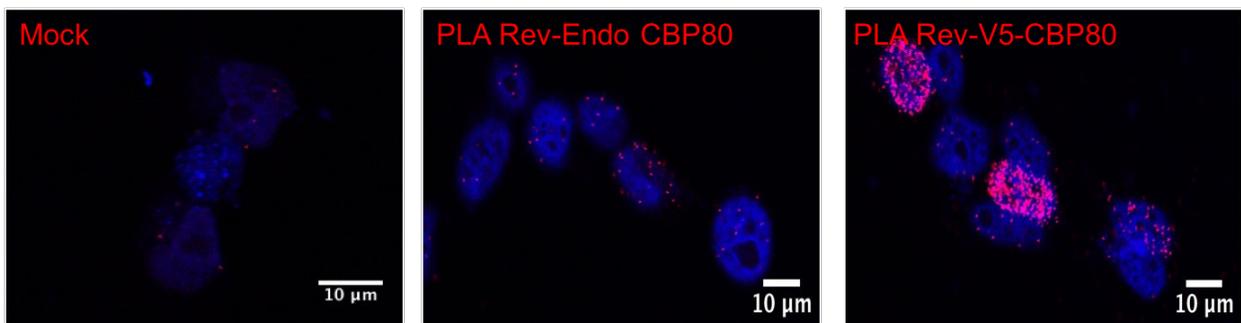


Figura 6: Ensayo de proximidad entre Rev y CBP80. Células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión pCDNA-Flag-Rev o con pCDNA-Flag-Rev junto a pCDNA-V5-CBP80 y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de ligación proximal usando un anticuerpo α -Flag y α -CBP80 o α -V5 y el kit Duolink[®] in situ. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. En azul se observan los núcleos celulares, se utilizó la tinción con DAPI.

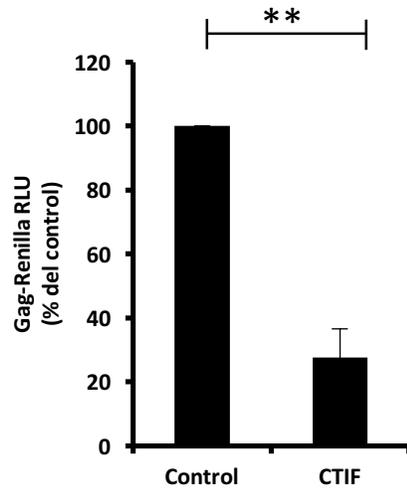
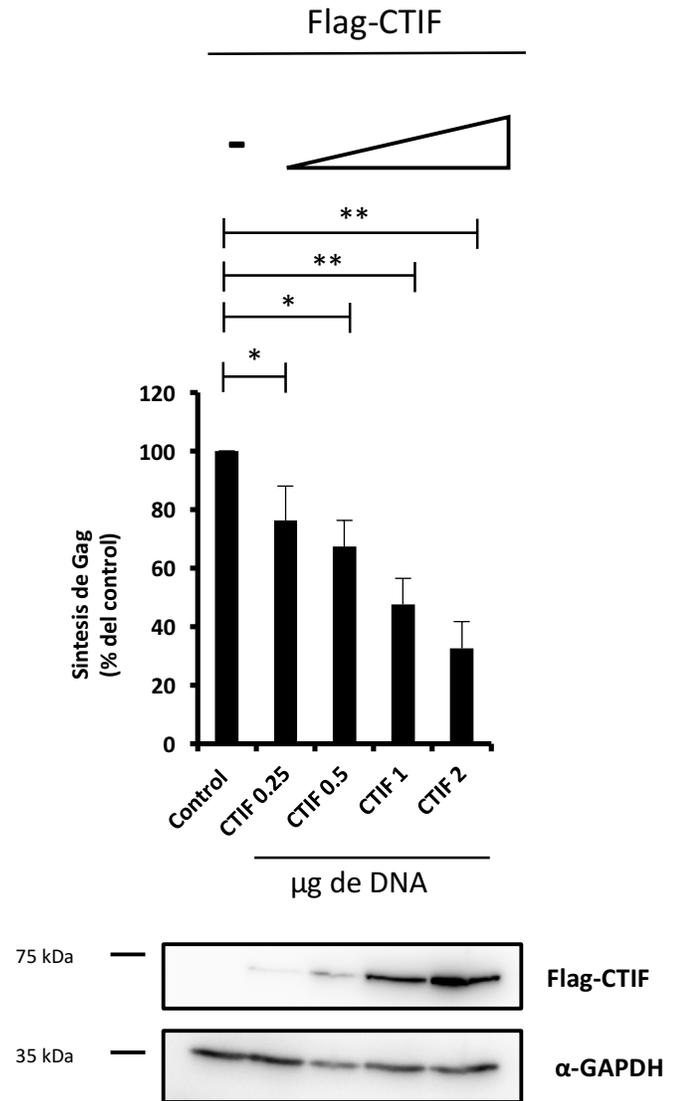
Inhibición de la expresión del ARNmc mediado por el factor de inicio de la traducción dependiente del CBC, CTIF

Los resultados anteriores indican que CBP80 se asocia con la proteína viral Rev estimulando la acumulación citoplásmica y la traducción del ARNmc de VIH-1. Sin embargo, con respecto al rol en de CBP80 en traducción, no podemos determinar en cuál de los mecanismos de traducción descritos para VIH-1 estaría participando (Soto-Rifo et al., 2012). Debido a que CBP80 forma parte del CBC nos enfocamos en la traducción dependiente del complejo de unión al cap nuclear y para profundizar aún más en este complejo de inicio de la traducción, se evaluó el efecto de CTIF, ya que esta proteína participa como adaptador entre el ARNm y la subunidad ribosomal 40S exclusivamente en la traducción mediada por el CBC (Choe et al., 2012; Maquat et al., 2011; Mi Kim et al., 2009).

De manera inesperada, al expresar Flag-CTIF junto con el vector proviral pNL4.3R se obtuvo una inhibición de aproximadamente un 70% en la síntesis de Gag:Renilla (Figura 7A). Al tratar las células con distintas dosis de CTIF se observó que la inhibición de la síntesis de Gag es proporcional al aumento en los niveles de CTIF (Figura 7B). Para verificar si el efecto de CTIF se ejerce exclusivamente sobre la expresión del vector proviral se evaluó en paralelo el efecto sobre el vector reportero pCI-Neo-Renilla (Figura 7C). En contraste con lo observado con el vector proviral, la síntesis

de la luciferasa de Renilla a partir del vector pCI-Neo-Renilla no se vio mayormente afectada al expresar la proteína Flag-CTIF lo que indicaría que CTIF ejerce un efecto específico sobre la expresión de Gag.

Con el fin de descartar la posibilidad de que un aumento en los niveles de CTIF afecte la traducción general de las células, se realizó el ensayo de SUnSET (Schmidt et al., 2009) (Figura 7D), donde transfectamos las células con un vector de expresión para d2EGFP (utilizado como control) o con Flag-CTIF. A las 24 horas post-transfección se trataron las células con puromicina durante 10 minutos previo a la lisis celular. La puromicina se asocia a las proteínas que están siendo sintetizadas y luego mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-puromicina podemos comparar los niveles de producción de proteínas en las condiciones de interés. Como control positivo de inhibición de la síntesis proteica se trató las células con arsenito de sodio durante 45 minutos y luego se trataron con puromicina por 10 minutos. Se observó que no existen diferencias en la síntesis de proteínas al comparar la condición de expresión Flag-CTIF con respecto al control con d2EGFP mientras que el tratamiento con arsenito de sodio inhibe fuertemente la incorporación de puromicina (Figura 7D).

A**B**

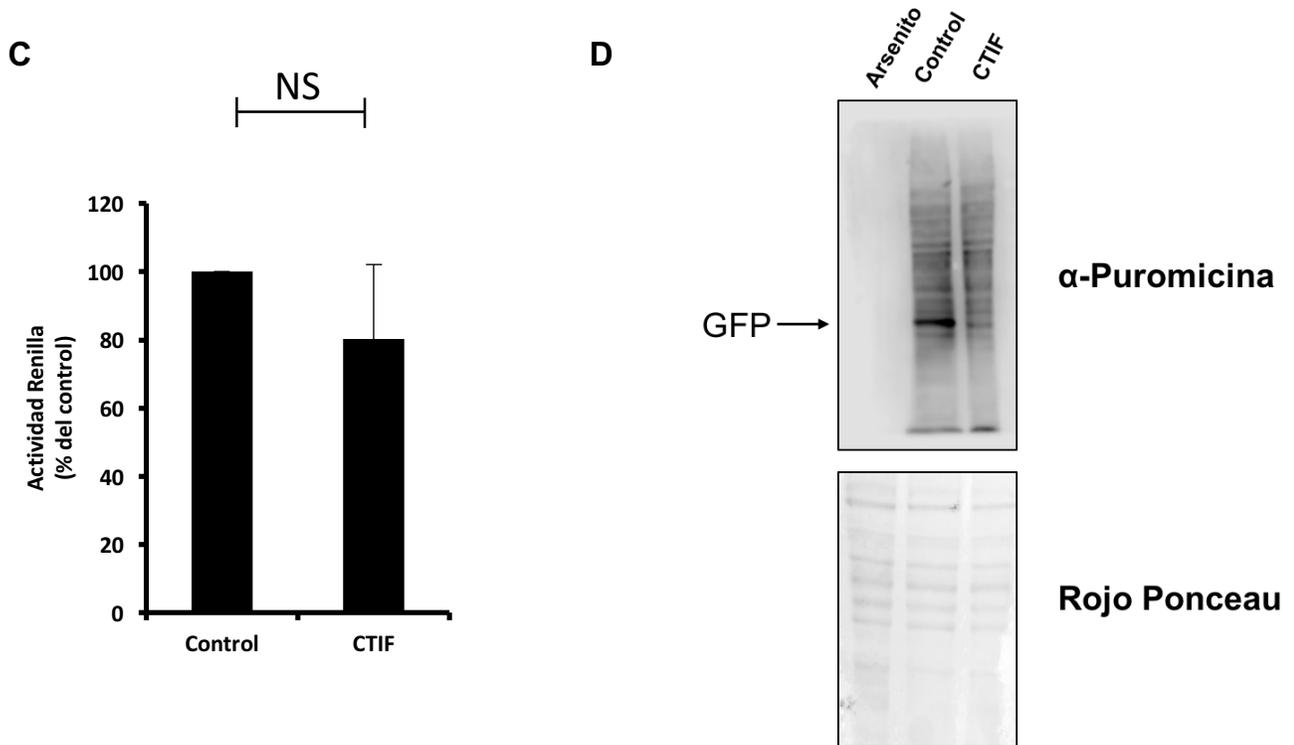


Figura 7: CTIF inhibe la síntesis de Gag (A) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control) o con pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector proviral pNL4.3R. La actividad de la luciferasa de Renilla se cuantificó a las 24 horas post-transfección (**P < 0.01 t-test) **(B)** Células HeLa fueron transfectadas con 0; 0,25; 0,5; 1 ó 2 µg de pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector proviral pNL4.3R y la actividad de la luciferasa de Renilla se cuantificó a las 24 horas post-transfección. Para cada condición se complementaron los 2 µg de DNA con el vector pcDNA-d2EGFP. En paralelo, se realizó Western blot a partir de los extractos celulares de cada condición para detectar Flag-CTIF. GAPDH se usó como control de carga (*P < 0.05; **P < 0.01 t-test) **(C)** Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP o con pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector pCI-Neo-Renilla y la actividad de la luciferasa de Renilla se cuantificó a las 24 horas post-transfección (NS; no significativo, t-test) **(D)** Western blot de células HeLa tratadas con puromicina, se utilizó un anticuerpo α-puromicina. *Arsenito*, control de células no transfectadas tratados con droga arsenito de sodio; Control, células transfectadas con vector pcDNA-d2EGFP; CTIF, células transfectadas con vector pcDNA3-Flag-CTIF.

El silenciamiento parcial de CTIF estimula la síntesis de Gag

Como se observó en los resultados precedentes, un aumento de la dosis celular de la proteína CTIF induce una inhibición en la acumulación de Gag.

A continuación, se quiso determinar si una baja en el nivel de CTIF endógeno genera el efecto inverso. Para esto se realizó un silenciamiento parcial de la proteína endógena CTIF utilizando un shRNA y se analizó el efecto sobre la producción de la proteína de fusión Gag:Renilla. Vectores lentivirales que contenían la secuencia del ARN interferente dirigido hacia el transcrito de CTIF (o un ARN interferente de secuencia desordenada como control) se utilizaron para transducir la línea celular HeLa y utilizando la resistencia a la puromicina, que otorga la secuencia integrada por el lentivector, se procedió a generar líneas celulares que expresan de manera estable los ARN interferentes. Estas células fueron transfectadas con el vector reportero proviral pNL4.3R junto a Flag-CTIF o el vector control que expresa d2EGFP (Figura 8). Los resultados obtenidos muestran que en condiciones de silenciamiento parcial de CTIF, se induce un aumento de 2,5 veces en la cantidad de Gag en las células transfectadas lo que es consistente con un efecto negativo de CTIF en la síntesis de Gag (comparar Control-shCTR con Control-shCTIF). De este modo, al realizar la complementación en *trans* de la proteína CTIF en las células silenciadas se observó una recuperación de la inhibición en la acumulación de Gag.

Además, se observó que la infección con VIH-1 en células Jurkat modula la dosis de CTIF celular y que la disminución de CTIF se correlaciona con un aumento en la acumulación de Gag (Anexo 1). Juntos, estos resultados nos

indican que CTIF tendría un rol inhibitorio en la acumulación de la poliproteína Gag.

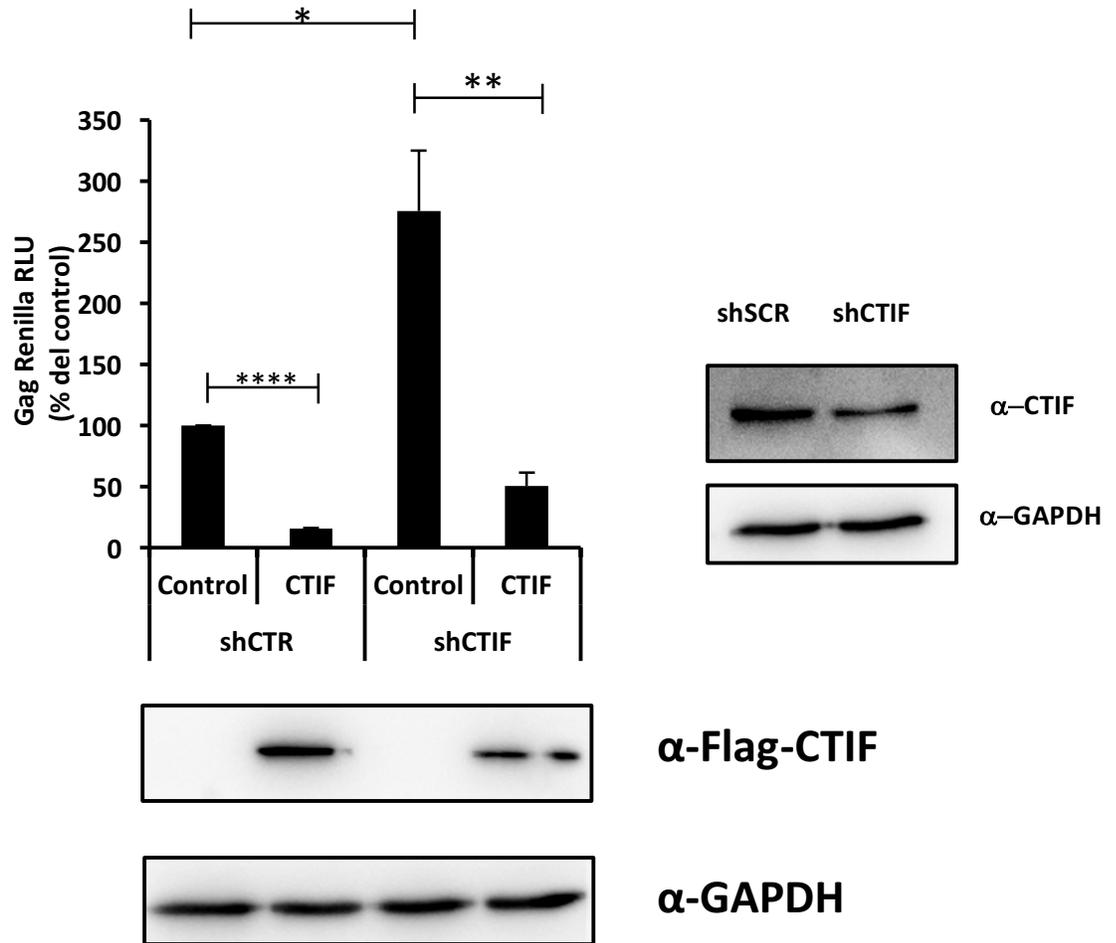


Figura 8: Silenciamiento parcial de CTIF y ensayo de complementación. Células HeLa control o tratadas con un ARN interferente contra la región 3'-UTR del ARNm de CTIF fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control) o pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector pNL4.3R. La actividad de la luciferasa de Renilla se analizó a las 24 horas post-transfección como se especifica en materiales y métodos. Se muestra el Western blot utilizado para detectar la proteína Flag-CTIF utilizada en la complementación (panel inferior). En paralelo, se realizó Western blot de extracto celular de las células control y silenciadas para corroborar la disminución de CTIF (panel derecho). GAPDH se usó como control de carga (*P < 0.05; **P < 0.01 and ****P < 0.0001, t-test).

La inhibición inducida por CTIF depende de la proteína viral Rev

A continuación, se procedió a determinar si la proteína viral Rev tiene algún rol en el efecto observado al expresar Flag-CTIF. Para esto, se utilizó el vector proviral Δ Rev (Figura 9). Se observó que el efecto inhibitorio producido por CTIF se reduce considerablemente en ausencia de la proteína Rev (Figura 9A). Debido a que la inhibición mediada por CTIF depende de la presencia de Rev, principal regulador post-transcripcional del ARNmc, se cuantificó la cantidad de ARNmc en el citoplasma y calculó la eficiencia de traducción (Figura 9B). Los resultados de estos ensayos indican que CTIF tiene un efecto mínimo en la acumulación del ARNmc en el citoplasma (Figura 9B, panel medio) y en cambio, el mayor efecto es en la eficiencia de la traducción (Figura 9B, panel derecho). Estos resultados indican que la expresión de Flag-CTIF tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de Gag:Renilla y si bien es dependiente de la presencia de la proteína viral Rev, esta no tiene un efecto predominante en la acumulación citoplasmática del ARNmc, sino que estaría asociado principalmente con la eficiencia de traducción.

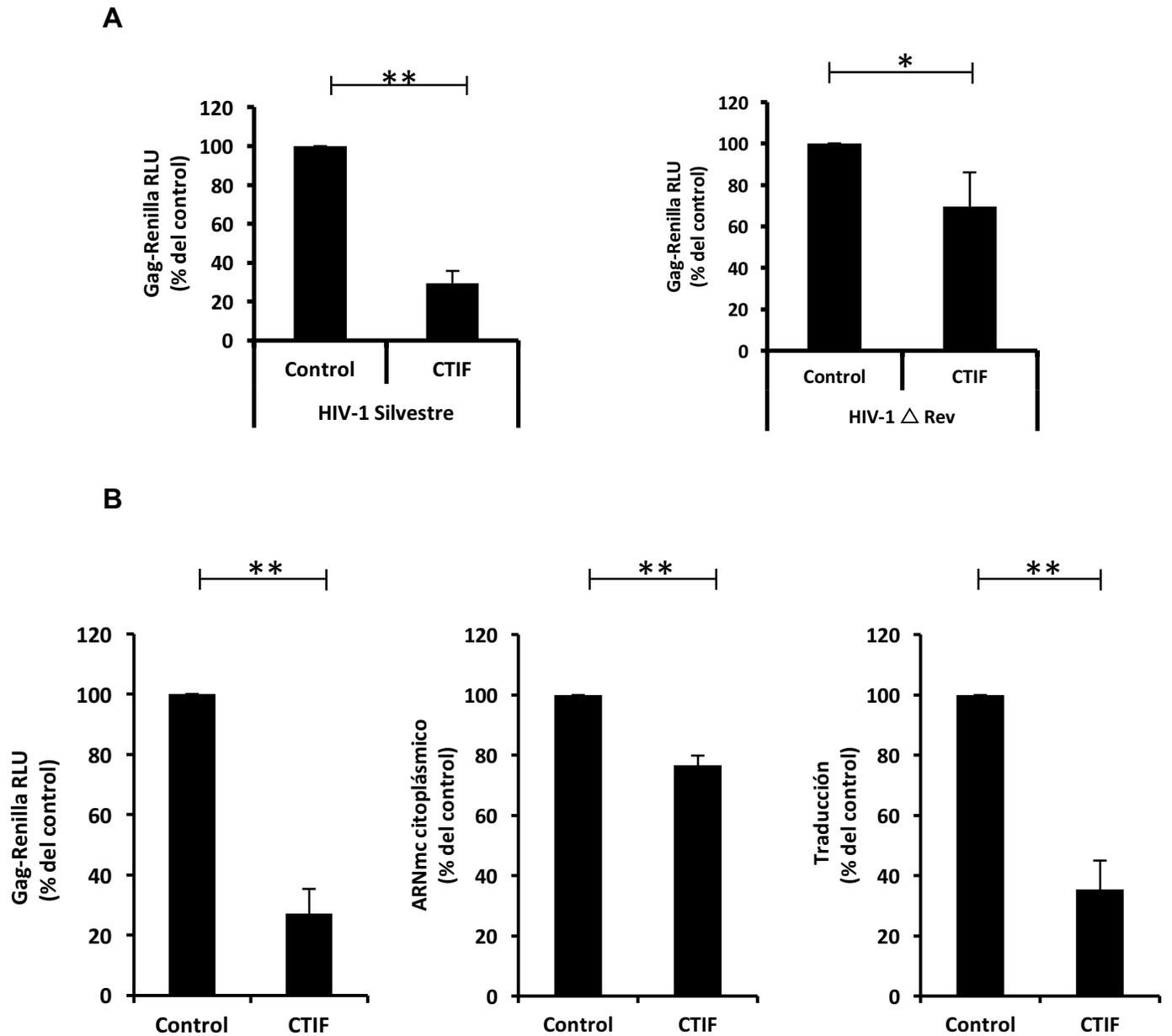


Figura 9: La inhibición de CTIF es mediada por Rev. (A) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control) o con pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector proviral pNL4.3R o el mutante pNL4.3R Δ Rev. La actividad de la luciferasa de Renilla se cuantificó a las 24 horas post-transfección (*P < 0.05; **P < 0.01, t-test). **(B)** Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP o pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector pNL4.3R. La actividad de la luciferasa de Renilla, la cuantificación del ARNm citoplásmico y el cálculo de la eficiencia de traducción se realizó a las 24 horas post-transfección (**P < 0.01, t-test).

CTIF forma un complejo con la proteína viral Rev

Debido a que los resultados anteriores indican que la inhibición producida por CTIF depende de la presencia de Rev, se quiso evaluar si estas proteínas son parte de un mismo complejo. Para realizar esto, se expresó la proteína viral Rev y se procedió a analizar su proximidad mediante PLA con la proteína CTIF endógena (Figura 10). Se observó que ambas proteínas están próximas entre sí. Si bien se observan puntos de proximidad en el citoplasma, no podemos descartar con estas imágenes la presencia de puntos de proximidad en el núcleo. Sin embargo, debido a que la localización reportada de CTIF es en la cara citoplasmática de la membrana nuclear, podemos especular que dichos puntos se encontrarían en el citoplasma y no al interior del núcleo celular.

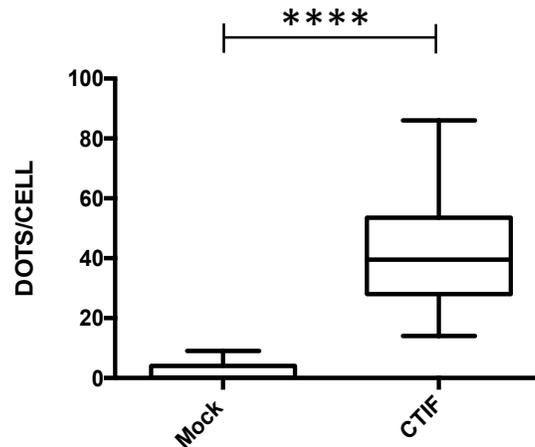
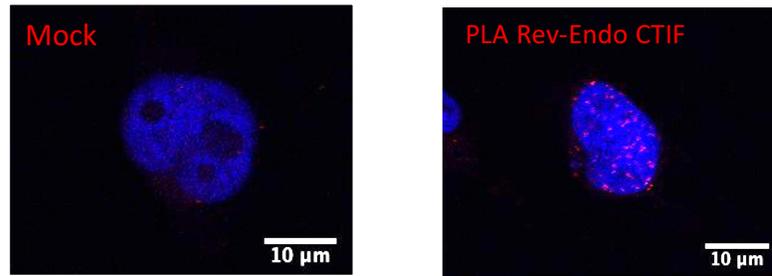


Figura 10: Ensayo de proximidad entre Rev y CTIF. Células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión pEGFP-Rev y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de ligación proximal usando anticuerpo α -GFP y α -CTIF y el kit *Duolink*[®] *in situ*. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. Cuantificación de puntos de interacción por células (n=14) (****P < 0.0001, Mann-Whitney test). En azul se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI.

CTIF actúa a través de su dominio N-terminal

Cuando se describió la proteína CTIF, se determinó que posee dos dominios funcionales, el dominio N-terminal donde se encuentra el sitio de unión a CBP80 y el dominio C-terminal el cual posee secuencias del tipo *middle domain of eIF4GI* (MIF4G) (Figura 11A) (Mi Kim et al., 2009). Para determinar si la capacidad de inhibir la síntesis de Gag se encuentra en uno

estos dominios, se procedió a sobre-expresar los dominios por separado junto con nuestro vector reportero proviral pNL4.3R (Figura 11B). Los resultados obtenidos indican que el dominio N-terminal es capaz de reproducir el mismo efecto que la proteína completa, en cambio, el dominio C-terminal no tiene un efecto inhibitorio sobre la producción Gag:Renilla (Figura 11B). Para descartar que el efecto producido por CTIF silvestre y los dominios sea sobre la actividad de la proteína de fusión Gag:Renilla y no sobre la síntesis de Gag, se procedió a co-transfectar los vectores de expresión junto con el vector proviral pNL4.3- Δ Env, el cual posee inserto el gen reportero Renilla y se determinó la síntesis de Gag mediante Western blot (Figura 11C). Este ensayo indica que la expresión de CTIF completo o del dominio N-terminal inhiben la síntesis de Gag, replicando así los resultados obtenidos con la proteína de fusión Gag:Renilla.

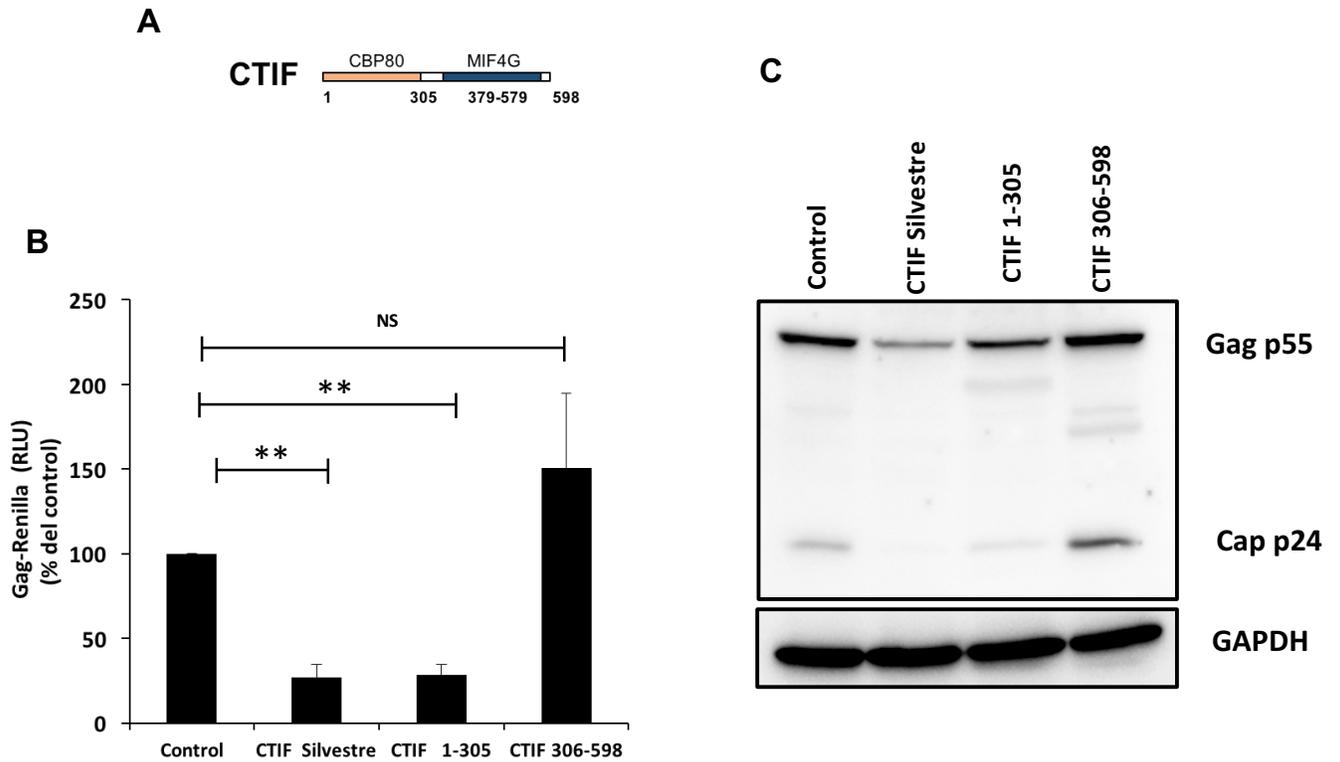


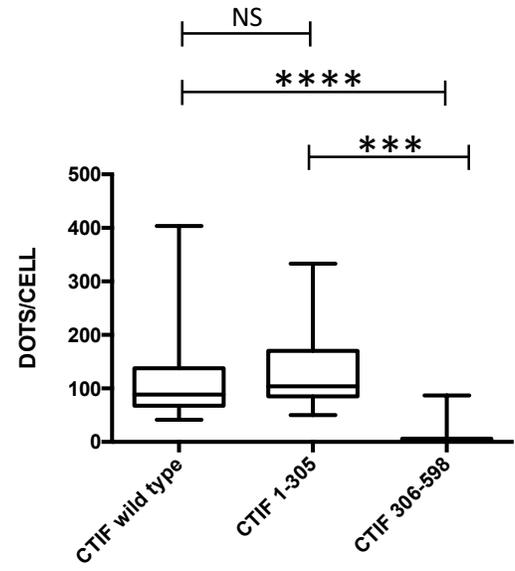
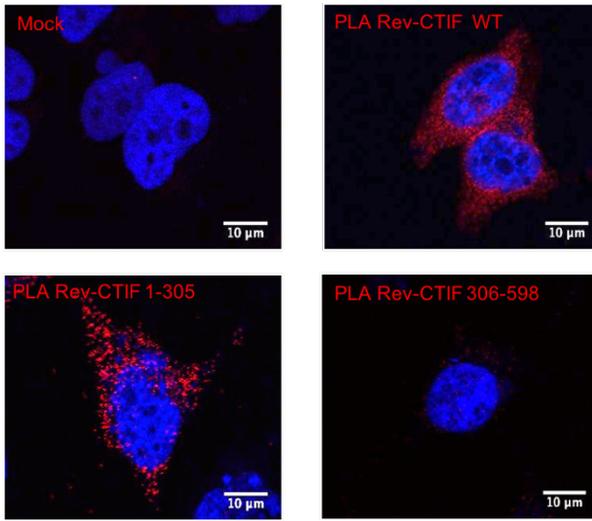
Figura 11: Dominios de CTIF y su efecto en la síntesis de Gag. (A) Esquema de la proteína CTIF. Se indican el dominio N-terminal que contiene el sitio de unión a CBP80 (naranja) y el dominio C-terminal que contiene la región MIF4G (azul). Los números en la parte inferior indican la posición de los aminoácidos. (B) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP Control), pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 junto al vector proviral pNL4.3R. La actividad de la luciferasa de Renilla se cuantificó a las 24 horas post-transfección (**P < 0.01, NS; no significativo, t-test) (C) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control), pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 junto al vector proviral pNL4.3-ΔEnv. Las células fueron lisadas a las 24 horas post-transfección y se utilizaron para detectar la proteína Gag y sus productos de procesamiento mediante Western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga.

El dominio N-terminal de CTIF forma un complejo con Rev y el ARNmc

De igual manera que con la proteína endógena, se procedió a realizar el ensayo de PLA entre CTIF o sus dominios N- o C-terminal con la proteína viral Rev (Figura 12A). Se observó que tanto la proteína completa como el dominio N-terminal presentan interacción con la proteína viral en un nivel comparable entre ellas, en cambio, el dominio C-terminal no presenta interacción con Rev (Figura 12A, ver cuantificación en panel derecho).

A continuación, se analizó si CTIF silvestre y/o sus dominios por separado son capaces de interactuar con el ARNmc durante la replicación viral mediante ISH-PLA. Los resultados obtenidos mostraron proximidad entre CTIF y el ARNmc (Figura 12B). También se observó proximidad del ARNmc con el dominio N-terminal, pero no con el dominio C-terminal. Estos resultados son concordantes con los obtenidos anteriormente donde se observó que es el dominio N-terminal de CTIF el que tiene la capacidad de inhibir la síntesis de Gag e interactuar con Rev.

A



B

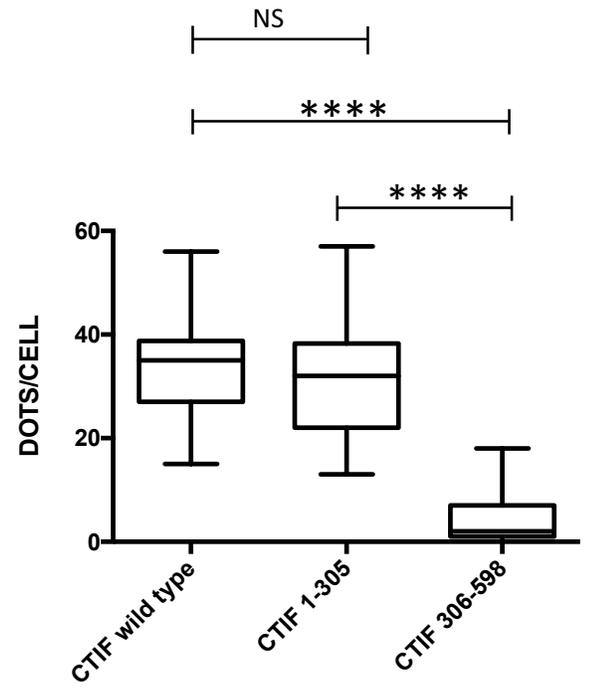
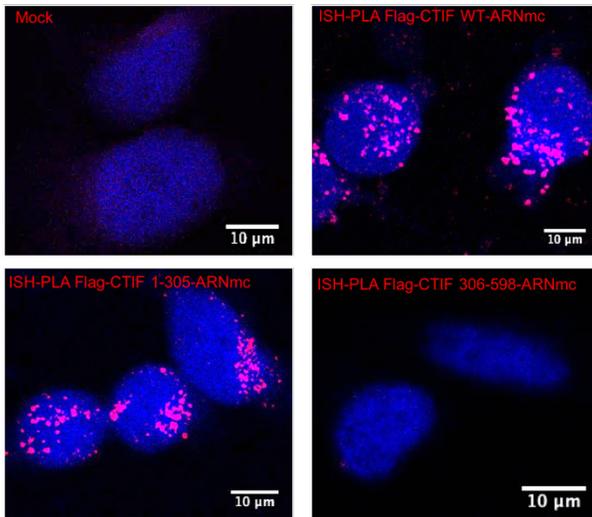


Figure 12: Ensayo de proximidad entre los dominios de CTIF y Rev o el ARNmc
(A) Células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión pEGFP-Rev junto con pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de ligación proximal usando anticuerpo α -GFP y α -Flag y el kit *Duolink[®] in situ*. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. Panel derecho corresponde a la cuantificación de puntos de interacción por células entre Rev-CTIF (n=32), Rev-CTIF1-305 (n=44) y Rev-CTIF306-598 (n=43) (**P < 0.001, ****P < 0.0001, NS; no significativo, Mann–Whitney test). **(B)** Células HeLa fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 junto con pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo ISH-PLA usando las sondas que reconocen al ARNmc y los anticuerpos α -Flag y α -digoxigenina y el kit *Duolink[®] in situ*. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. Panel derecho corresponde a la cuantificación de puntos de interacción por células entre ARNmc-CTIF (n=36), ARNmc-CTIF1-305 (n=30) y ARNmc-CTIF306-598 (n=27) (****P < 0.0001, NS; no significativo, Mann–Whitney test). En ambas figuras se observan en azul los núcleos celulares teñidos con DAPI.

CTIF induce la acumulación de Rev en el citoplasma

Un aspecto que llamó nuestra atención en los resultados obtenidos, es que a diferencia de la interacción observada entre la proteína viral Rev y CTIF endógeno, en las condiciones de expresión ectópica los puntos de interacción no se observan exclusivamente en la periferia de la membrana nuclear, sino que también en el citoplasma celular (comparar Figura 10 con Figura 12A).

Considerando este resultado, se procedió a analizar la distribución subcelular de Rev en condiciones de sobreexpresión de CTIF. Para esto se expresó EGFP-Rev en células HeLa junto con Flag-CTIF o sus dominios N- y C-terminal, los cuales se detectaron mediante inmunofluorescencia. En

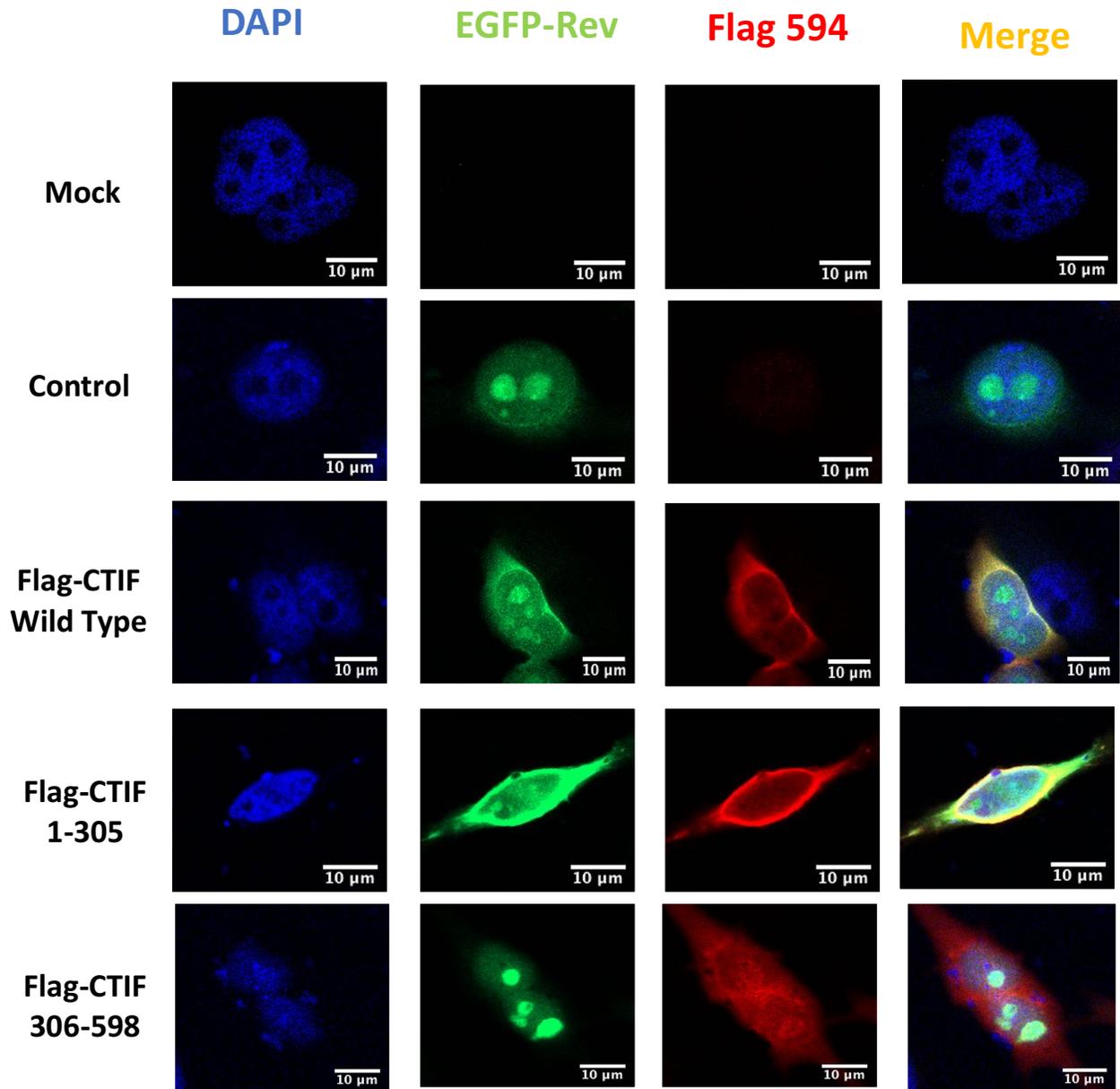
primer lugar, se observó la localización de las proteínas celulares, donde podemos apreciar que CTIF y el dominio N-terminal se ubican principalmente en la periferia del núcleo (al igual que la proteína endógena (Mi Kim, K., et al., 2009)) y además podemos encontrarla en el citoplasma celular y el dominio C-terminal se encuentra homogéneamente distribuida en toda la célula (Figura 13A). En ausencia de CTIF, la proteína Rev se localiza en el interior del núcleo, donde se acumula principalmente en el nucléolo tal como ha sido ampliamente reportado (Figura 13A, panel Control). En cambio, en presencia de la proteína Flag-CTIF y su dominio N-terminal la proteína viral se puede observar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 13A). Finalmente, la presencia del dominio C-terminal no altera la localización de la proteína Rev. Este resultado indica que la expresión ectópica de CTIF o el dominio N-terminal inducen la acumulación de Rev en el citoplasma.

Luego, se cuantificó el porcentaje de células que presentan las diferentes localizaciones celulares en cada condición (Figura 13B). En la condición control, aproximadamente un 90% de las células que poseen Rev la mantienen exclusivamente en el núcleo. En contraste, en las células que expresan Flag-CTIF o el dominio N-terminal podemos encontrar Rev localizada exclusivamente en el núcleo solo entre un 20 a 30% de las células. Finalmente, el dominio C-terminal presenta una distribución similar a

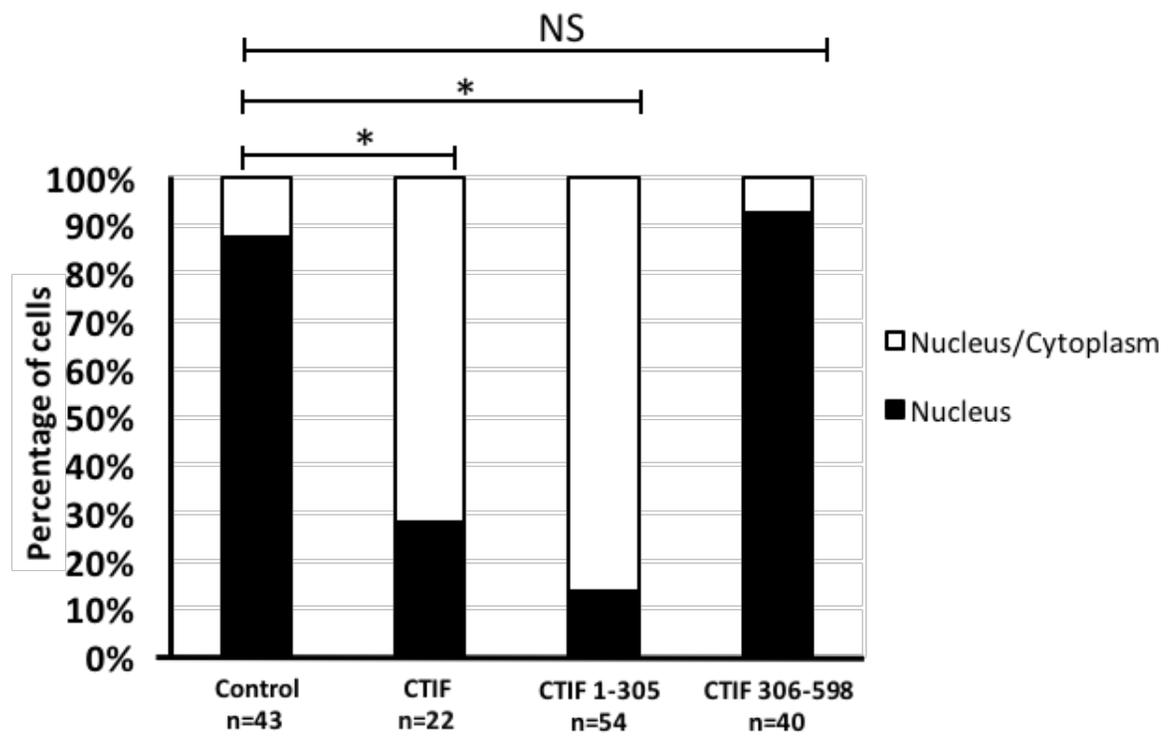
la condición control con aproximadamente 90% de las células con Rev localizado solamente en el núcleo (Figura 13B).

Estos resultados indican que un aumento en los niveles de CTIF induce la acumulación Rev en el citoplasma, lo que podría afectar su función. Sin embargo, ya hemos visto anteriormente que las cantidades de ARNmc en el citoplasma no explican el efecto inhibitorio en la síntesis de Gag y se debería principalmente a una inhibición de la traducción del ARNmc de VIH-1 (Figura 9B). A continuación, quisimos visualizar mediante microscopía si las cantidades de ARNmc en el citoplasma eran afectadas por la presencia de Flag-CTIF o sus dominios. Para esto, se realizó el ensayo de FISH en condiciones de expresión de Flag-CTIF o sus dominios en presencia del vector proviral pNL4.3 (Figura 13C). Estos resultados indican que el nivel de ARNmc es similar en cada una de las condiciones y no se vería mayormente afectado por la co-expresión de Flag-CTIF o sus dominios, reafirmando nuestros resultados anteriores que indican una inhibición de la expresión del ARNmc a nivel traduccional.

A



B



C

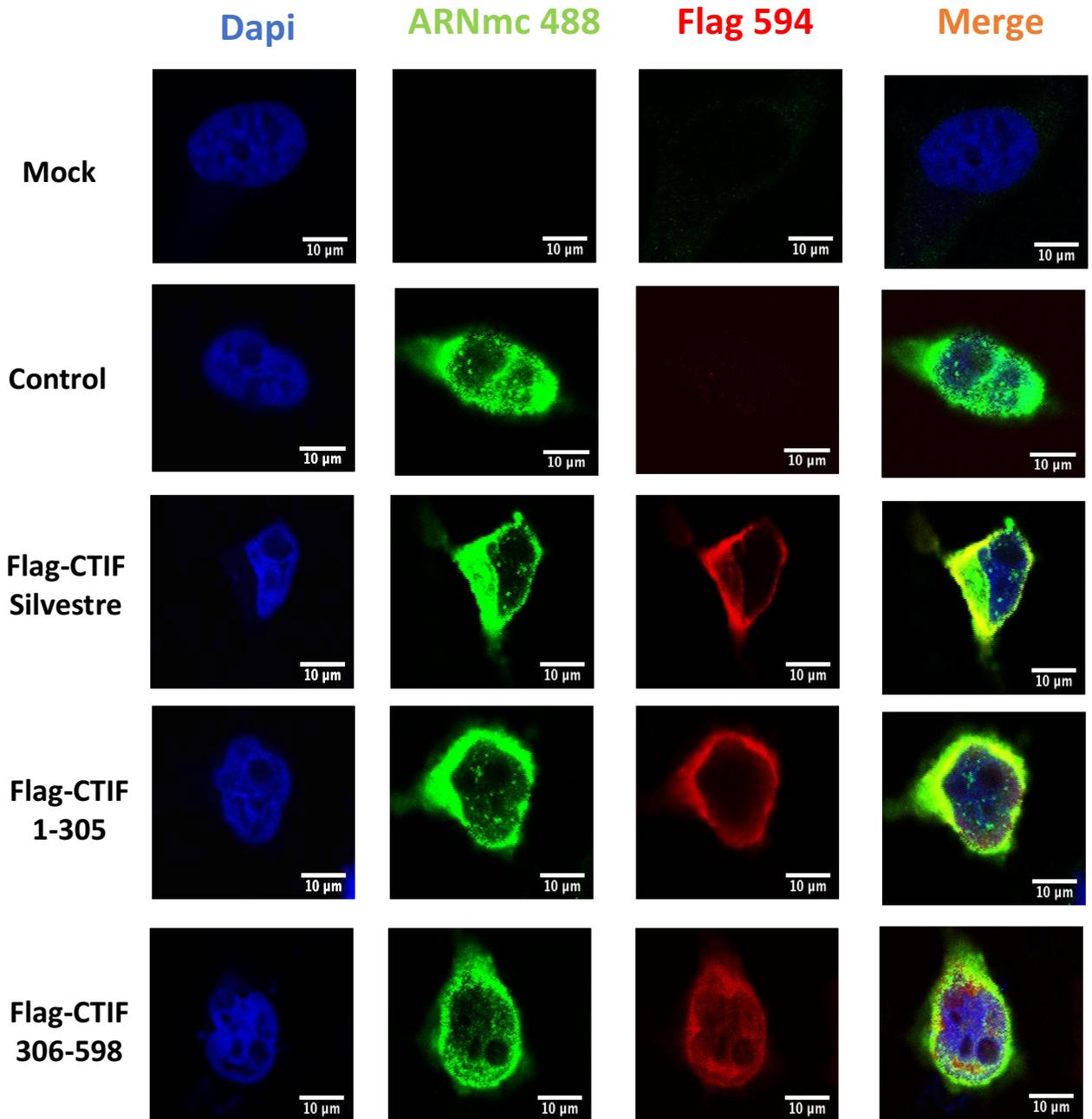


Figure 13: Análisis de la localización sub-celular de Rev en presencia de CTIF. (A) Células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión pEGFP-Rev junto con pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de IFI usando el anticuerpo α -Flag. Condición Mock corresponde a células transfectadas con pEGFP-Rev y pUC19. (B) Cuantificación de la localización sub-celular de EGFP-Rev en cada una de las condiciones. Se grafica el porcentaje de células que presentan localización de EGFP-Rev solo nuclear (*Nucleus only*) o nuclear y citoplásmica (*Nucleus/Cytoplasm*) (* $P < 0.05$, NS; no significativo, t-test) (C) Células HeLa fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 junto con pcDNA3-Flag-CTIF, pcDNA3-Flag-CTIF1-305 o con pcDNA3-Flag-CTIF306-598 y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de FISH e IFI usando las sondas que reconocen al ARNm_c y los anticuerpos α -Flag y α -digoxigenina. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. En ambas figuras se observan en azul los núcleos celulares teñidos con DAPI.

La proteína CTIF interfiere con la formación del complejo Rev-CBP80

Se observó que CTIF estaría inhibiendo la traducción del ARNm_c a través de un mecanismo que depende de la presencia de Rev. Si bien se ha descrito ampliamente en la literatura que la función de Rev durante el ciclo replicativo del virus está relacionada principalmente con la exportación de los ARN parcialmente procesados y del ARNm_c, en nuestro laboratorio hemos reportado que Rev también estaría implicada con la traducción del ARNm_c y esta función dependería de la interacción de Rev con CBP80 (Figura 4 y datos publicados en Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F, et al., 2018). Considerando que CTIF se asocia a CBP80 y que además afecta la función de Rev en traducción, se procedió a determinar si la presencia de CTIF afecta la asociación de Rev con CBP80. Para esto, se analizó la interacción entre estas proteínas en condiciones de sobreexpresión de CTIF (condición +CTIF) o de la proteína luciferasa de Renilla, la que nos sirve de

control (condición -CTIF) (Figura 14). Se observó que la presencia de CTIF disminuye las interacciones entre Rev y CBP80 al interior de las células (Figura 14, ver panel inferior para cuantificación). Estos resultados resaltan la relevancia de la asociación entre Rev y CBP80 en la expresión del ARNm, ya que, al ser inhibida, en este caso por CTIF, la producción de Gag se ve drásticamente disminuida, en esta oportunidad por un efecto a nivel traduccional.

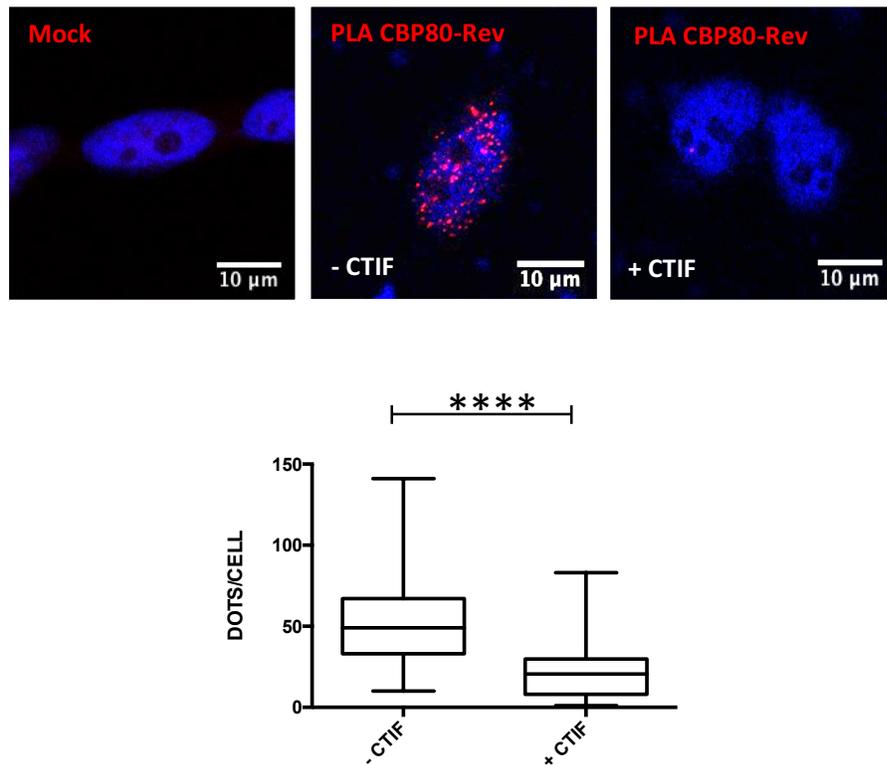


Figura 14: Ensayo de proximidad entre Rev y CBP80 en presencia o ausencia de CTIF. Células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión pEGFP-Rev y pCMV-Myc-CBP80 junto con pcDNA3-Flag-CTIF o con pcDNA-Renilla y a las 24 horas post-transfección fueron sometidas al ensayo de ligación proximal usando los anticuerpos α -GFP y α -Flag y el kit Duolink[®] *in situ*. Condición Mock corresponde a células sin transfectar. Cuantificación de los puntos de PLA por células en condición -CTIF (n=43) y +CTIF (n=37) (****P < 0.0001, Mann-Whitney test). En azul se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI.

La inhibición mediada por CTIF es conservada en VIH-2

Ya observamos que la inhibición mediada por CTIF es dependiente de la presencia de Rev, esto nos permite especular que el efecto inhibitorio debiese ser conservado al menos en VIH-2, el cual también expresa Rev, pero no así en los retrovirus simples cuya expresión de Gag no depende de la presencia de esta proteína regulatoria. Para evaluar esta posibilidad se analizó el efecto de CTIF en la síntesis de Gag de VIH-2 (Figura 15A). La presencia de CTIF generó una disminución en la acumulación de Gag similar a lo que se observó con VIH-1 (Figura 15A). En cambio, cuando se analizó el efecto de la sobreexpresión de CTIF en la síntesis de Gag del virus de la leucemia murina (MLV) (retrovirus simple) no se obtuvo una disminución de la poli-proteína viral (Figura 15B). Estos resultados indican que la presencia de Rev es determinante para el efecto inhibitorio producido por CTIF.

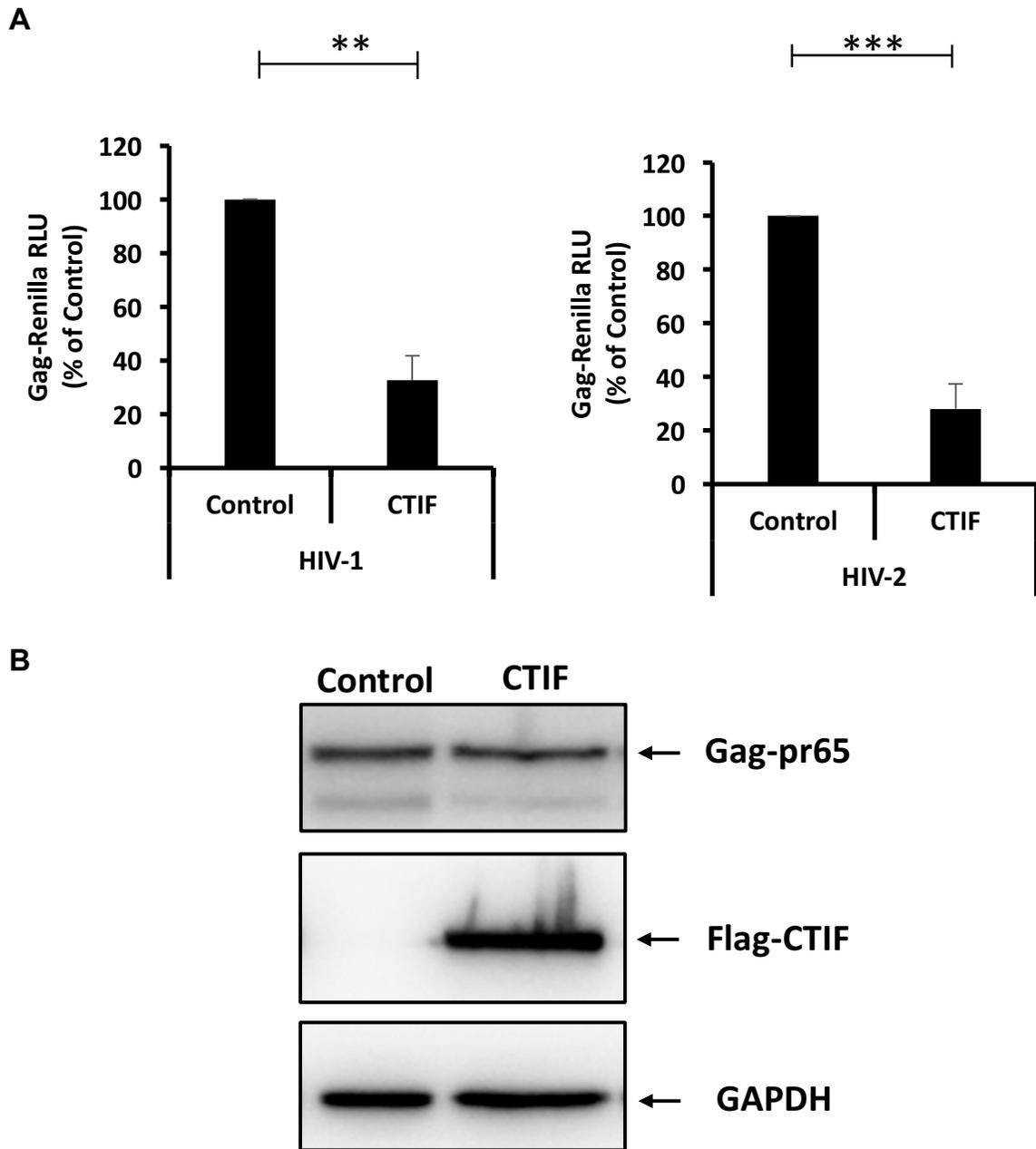


Figura 15: CTIF inhibe la síntesis de Gag de HIV-2. (A) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control) o con pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector proviral pNL4.3R (VIH-1) o pRod10R (VIH-2). La actividad Renilla luciferasa se cuantificó a las 24 horas post-transfección (**P < 0.01 and ***P < 0.001, t-test). (B) Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA-d2EGFP (Control) o con pcDNA3-Flag-CTIF junto al vector proviral pNCAC (MLV). Los extractos celulares fueron preparados a las 24 hpt y fueron usados para detectar Gag-pr65 y Flag-CTIF mediante Western blot. GAPDH se utilizó como control de carga.

Discusión

Durante años se ha estudiado el control de la expresión génica del ARNm debido a que posee características que lo diferencian de los transcritos celulares. Los ARNm celulares reclutan una variedad de proteínas a través de las diferentes etapas de su metabolismo en el núcleo (adición de la estructura cap, poliadenilación, corte y empalme) o durante su exportación nuclear, las que favorecen la eficiencia de su traducción en el citoplasma. Sin embargo, el ARNm no es procesado de la misma manera (no es procesado por la maquinaria de corte y empalme) y su exportación depende de las proteínas Rev y CRM1, por lo que la composición del complejo ribonucleoproteico (RNP) del ARNm es diferente al de los ARNm celulares. Aun así, este ARN viral es capaz de traducir de manera eficiente, produciendo una gran cantidad de proteína Gag. Con el objetivo de encontrar elementos que expliquen la alta eficiencia de traducción del ARNm nos centramos en elementos comunes que podemos encontrar en este ARN viral y los ARNm celulares.

El ARNm, al igual que los ARNm celulares, es modificado en su extremo 5' con la adición de la estructura cap y el posterior reclutamiento del CBC. Debido a que se ha descrito ampliamente que el CBC, a través de su unidad CBP80, recluta y promueve las diferentes etapas del metabolismo de los

ARNm celulares se decidió analizar su rol en la síntesis de Gag, la cual corresponde al principal producto obtenido a partir del ARNmc. Se observó que un aumento en la concentración intracelular de CBP80 induce un incremento en los niveles de la proteína Gag. En paralelo, se evaluó el efecto de la proteína de unión a cap citoplasmática, eIF4E, y se observó que el aumento de su concentración no estimula la síntesis de Gag. Se encontró que la estimulación producida por CBP80 se debe a un aumento de la cantidad del ARNmc en el citoplasma y a un aumento en su eficiencia de traducción y ambas estimulaciones dependen de la presencia de la proteína viral Rev.

El aumento del ARNmc en el citoplasma puede tener varias explicaciones, por ejemplo, un aumento de los niveles transcripcionales, un aumento de la exportación nuclear o una disminución de la degradación del ARNmc. En la literatura se ha descrito que el complejo CBC es capaz de estimular la elongación de la transcripción del promotor de VIH-1 (Lenassi, et al., 2011). También se ha descrito que la droga ABX464, capaz de inhibir la interacción CBP80-Rev, afecta el procesamiento y la exportación del ARNmc (Campos N. et al., 2015). Estos antecedentes indican que CBP80 es capaz de estimular la acumulación en el citoplasma del ARNmc a diferentes niveles y Rev podría estar participando de este proceso.

En el caso del aumento de la eficiencia de traducción, se ha propuesto que la traducción dependiente del CBC sería utilizada por el virus como una estrategia para asegurar la producción de la proteína Gag en condiciones desfavorables como la detención del ciclo celular en la fase G2/M (Sharma, 2012). Sin embargo, en el análisis del efecto traduccional mediado por CBP80, debemos considerar que la presencia de esta proteína también podría favorecer otros mecanismos de inicio de la traducción independientes de la estructura cap, como lo son los mediados por sitios internos de entrada al ribosoma (IRES). En este sentido, la presencia del CBC en la estructura cap puede facilitar el reclutamiento de factores que aumenten la eficiencia de una traducción regulada por las estructuras IRES en condiciones de detención del ciclo celular (Brasey, A. et al., 2003; Vallejos, M. et al., 2011). Considerando que la proteína adaptadora CTIF es esencial para la traducción dependiente del CBC, es que se procedió a analizar el efecto de esta proteína en la traducción del ARN_{mc}. La proteína CTIF es un factor de inicio de la traducción que se asocia a CBP80 y participa exclusivamente del mecanismo de traducción dependiente del CBC por lo que CTIF nos permitiría evaluar la relevancia de la traducción mediada por el CBC independientemente del mecanismo de traducción mediado por el IRES.

Para nuestra sorpresa, se observó que un aumento en la concentración intracelular de CTIF induce una fuerte disminución en la acumulación de

Gag. Concordante con el resultado anterior, mientras el silenciamiento parcial de CTIF tiene el efecto contrario, es decir, estimula la acumulación de Gag, la complementación introduciendo al sistema CTIF en *trans*, revierte el efecto estimulador. Al analizar las características de esta disminución, nos percatamos que era explicada principalmente por una baja en la eficiencia de traducción del ARNmc y que este efecto dependía en gran medida de la presencia de la proteína Rev.

Estos resultados nos indican que CTIF está impidiendo que Rev estimule la traducción del ARNmc. Se observó que ambas proteínas se encuentran próximas en el citoplasma celular y que la presencia de CTIF induce un cambio en la localización de Rev en el interior de las células, relocalizándola en el citoplasma.

En el laboratorio recientemente se reportó que la formación del complejo Rev-CBP80-eIF4A favorece la síntesis de Gag y en esta tesis en la Figura 5 se señala que la estimulación de la traducción inducida por CBP80 se pierde en ausencia de Rev. Considerando estos antecedentes, se procedió a evaluar si CTIF era capaz de interferir con la asociación entre Rev y CBP80 y efectivamente se observó que la presencia de CTIF disminuye la cantidad de asociaciones entre ambas proteínas. De esta manera CTIF, al interactuar con Rev, estaría impidiendo que esta última se asocie con CBP80 inhibiendo así la traducción del ARNmc.

Un aspecto interesante a considerar es en qué condiciones ocurre la interacción entre CTIF y Rev. En este trabajo se estableció que ambas proteínas pueden asociarse en ausencia del ARNmc lo que indica que podrían asociarse una vez que Rev es sintetizada en el citoplasma. Sin embargo, la ausencia de un efecto predominante en la exportación del ARNmc nos sugiere que la asociación o secuestro de Rev por parte de CTIF ocurre posteriormente a su función en la exportación del ARNmc. Estas observaciones, sumado a la localización en la cara citoplásmica de la envoltura nuclear de CTIF, indican que la asociación CTIF-Rev ocurriría durante o posterior a que el complejo ARNmc-Rev es exportado desde el núcleo. Esto es concordante si consideramos los antecedentes que demuestran que CTIF es reclutado a los ARNm una vez que estos son exportados desde el núcleo, proceso que, de manera interesante, ocurre gracias a su interacción con CBP80. Nosotros pudimos observar asociación entre el ARNmc y CTIF en la zona circundante al núcleo, por lo que probablemente el caso del ARNmc no es diferente al de los ARNm celulares y este reclutamiento favorecería la asociación con Rev. Sin embargo, es difícil determinar si es CBP80 o Rev la proteína que recluta a CTIF al ARNmc, ya que ambas proteínas son capaces de asociarse con CTIF de manera independiente del ARNmc.

Con la finalidad de ahondar en los determinantes moleculares asociados a la inhibición mediada por CTIF, se determinó que es el dominio N-terminal, el cual contiene el sitio de unión a CBP80 y responsable de su reclutamiento a los ARNmc, es capaz de asociarse a Rev y de reproducir el efecto inhibitorio, reafirmando la idea de que CTIF podría ser reclutado al ARNmc tanto por CBP80 como por Rev. Diseños experimentales que permitan observar la asociación entre el ARNmc y CTIF en ausencia de Rev y/o CBP80 podrían ayudar a esclarecer esta interrogante. Sin embargo, independiente de quien sea el que recluta a CTIF al ARNmc, nosotros especulamos que es en esta etapa donde ocurre la asociación con Rev ejerciendo el efecto inhibitorio de la síntesis de Gag.

Se ha descrito que Rev se asocia con el ARNmc en dos posiciones diferentes, a nivel de la estructura RRE presente en el marco de lectura abierto de *env* y en un sitio de unión presente en el extremo 5'-UTR. Ambos sitios se han relacionado con funciones diferentes de Rev ya que la unión al RRE promueve la exportación y la unión al 5'-UTR favorece la traducción. En nuestro trabajo recientemente publicado, se reportó que la función de Rev en traducción no puede ser explicada completamente por el sitio de unión presente en el 5'-UTR, lo que indica que Rev asociada al RRE sería en gran medida responsable de la estimulación de la traducción en la que también participa CBP80. Esta aseveración genera la interrogante de cómo

ocurre la asociación CBP80-Rev considerando la distancia que existe entre el cap y el RRE. El modelo actual indica que Rev al unir la estructura RRE oligomeriza y esto permite su asociación con CRM1 y la exportación del ARNmc. En el trabajo de *Taniguchi y cols.* se propuso que esta oligomerización podría sucederse desde el RRE hasta el 5'-UTR, lo que le permitiría estar próximo al cap y a CBP80. Otra posibilidad propuesta en el mismo artículo, es que la asociación entre ambas proteínas permita la circularización del ARNmc independiente de la oligomerización. Interesantemente, se ha descrito que la circularización de los ARNm estimula su traducción, ya que favorece el re-reclutamiento de los ribosomas que terminaron una ronda de traducción. Se ha propuesto que la circularización se debe a la interacción entre la proteína eIF4G y PABP y ocurriría tanto en la traducción dependiente del CBC como dependiente de eIF4E. En el caso del ARNmc de VIH-1, se ha observado que el tratamiento con proteasas que procesan algunos de estos factores de inicio de la traducción y que en consecuencia impiden la circularización y la traducción de ARNm celulares no afectan en gran medida la síntesis de Gag (Monette, A., and Valiente-Echeverría, F., 2013). Se ha propuesto que VIH-1 utilizaría la traducción mediada por IRES para asegurar la traducción del ARNmc. Es en este contexto donde nuestros resultados sugieren otra posible explicación ya que la interacción CBP80-Rev es la que permitiría mantener la circularización del ARNmc permitiendo su traducción pese a la disrupción del

contacto entre eIF4G y PABP. Si consideramos esta posibilidad, la presencia de CTIF podría estar impidiendo la circularización mediada por CBP80-Rev, sin afectar la asociación de ambas proteínas con el ARNmc. Sin embargo, si es la circularización del ARNmc la explicación a la relevancia de la interacción CBP80-Rev sería interesante evaluar si esta se produce solo en el citoplasma o también en el núcleo, considerando la importancia de esta interacción para la exportación del ARNmc.

Finalmente, debido a que la disminución de la acumulación de Gag producida por CTIF depende de la presencia de Rev, nos preguntamos si este efecto se observa exclusivamente en retrovirus que sintetizan esta proteína reguladora o si también es conservado en retrovirus simples. Nuestros resultados indican que el efecto regulador de CTIF es conservado al menos en los lentivirus humanos VIH-1 y VIH-2, pero no en un retrovirus simple como MLV, reafirmando la relevancia de Rev en el proceso. Este resultado nos hace especular que la inhibición por CTIF podría ser conservado en otros retrovirus que sinteticen proteínas tipo-Rev y sería interesante estudiarlo. Otra información relevante obtenida en este ensayo es que posiblemente la interacción CBP80-Rev sea conservada al menos en lentivirus humanos, favoreciendo la síntesis de Gag. Sin embargo, no podemos descartar que en el caso de VIH-2, CTIF simplemente afecte las

interacciones de Rev con otros factores que no sean CBP80. Futuros ensayos nos podrían ayudar a responder estas interrogantes.

En síntesis, este trabajo muestra como los factores nucleares CBP80 y Rev favorecen la traducción del ARN^{mc} al formar parte de su RNP desde el núcleo, en un rol que es análogo al que realizan las proteínas que señalizan el correcto procesamiento de los ARN^m mediante corte y empalme y el mecanismo de exportación dependiente de NXF1. Además, la inhibición mediada por CTIF corrobora la importancia de la asociación CBP80-Rev y posiblemente otras asociaciones de Rev en el citoplasma que aún no han sido dilucidadas. La posterior determinación de los componentes estructurales necesarios para la interacción entre CBP80 y Rev podrían ser utilizados en un futuro cercano para la generación de péptidos y/o compuestos activos capaces de secuestrar Rev e impedir la interacción de la proteína viral con el CBC de una manera similar a la droga ABX464 que actualmente se encuentra en evaluación para su uso potencial como inhibidor de la replicación viral.

Conclusiones

- El ARN^{mc} de VIH-1 interacciona con CBP80 y eIF4E en el citoplasma.
- La expresión ectópica de CBP80 estimula la acumulación del ARN^{mc} y su traducción, en un mecanismo Rev-dependiente.
- La proteína CTIF silvestre y el dominio N-terminal inhiben la síntesis de Gag, en un mecanismo Rev-dependiente.
- La infección la HIV-1 afecta la expresión de CTIF endógeno en células Jurkat.
- La expresión ectópica de CTIF silvestre y el dominio N-terminal inducen la acumulación de Rev en el citoplasma.
- La presencia de CTIF impide la interacción entre CBP80 y Rev.
- El efecto inhibitorio mediado por CTIF es conservado en HIV-2.

Bibliografía

Arrigo, S.J., and Chen, I.S.Y. (1991). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* 5, 808–819.

Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L., and Sonenberg, N. (2003). The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G2/M Phase of the Cell Cycle. *J. Virol.* 77, 3939–3949.

Briggs, J. a G., Simon, M.N., Gross, I., Kräusslich, H.-G., Fuller, S.D., Vogt, V.M., and Johnson, M.C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 672–675.

Burnett, J.C., Miller-Jensen, K., Shah, P.S., Arkin, A.P., and Schaffer, D. V. (2009). Control of stochastic gene expression by host factors at the HIV promoter. *PLoS Pathog.* 5.

Campos, N., Myburgh, R., Garcel, A., Vautrin, A., Lapasset, L., Nadal, E.S., Mahuteau-Betzer, F., Najman, R., Fornarelli, P., Tantale, K., Basyuk, E., Séveno, M., Venables, J., Pau, B., Bertrand, E., Wainberg, M., Speck, R., Scherrer, D., Tazi, J. (2015). Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* 12, 1–15.

Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A.R., and Zahler, A.M. (1999). hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 18, 4060–4067.

Cells, C.D.T., Cocchi, F., Devico, A.L., Garzino-demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lussot, P. (1987). Identification the Major HIV-Suppressive Factors Produced by. *Science* (80-.).

Choe, J., Oh, N., Park, S., Lee, Y.K., Song, O.K., Locker, N., Chi, S.G., and Kim, Y.K. (2012). Translation initiation on mRNAs bound by nuclear cap-binding protein complex CBP80/20 requires interaction between CBP80/20-dependent translation initiation factor and eukaryotic translation initiation factor 3g. *J. Biol. Chem.* 287, 18500–18509.

Domsic, J.K., Wang, Y., Mayeda, A., Krainer, A.R., and Stoltzfus, C.M. (2003). Human Immunodeficiency Virus Type 1 hnRNP A/B-Dependent Exonic Splicing Silencer ESSV Antagonizes Binding of U2AF65 to Viral Polypyrimidine Tracts. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8762–8772.

Felkner, R.H., and Roth, M.J. (1992). Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the SU envelope protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 66, 4258–4264.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* (80-.). 272, 872–877.

Frankel, A.D., and Young, J.A.T. (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25.

Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 13, 484–496.

Freed, E., and Martin, M. (2013). *Fields Virology*.

Fröhlich, A., Rojas-Araya, B., Pereira-Montecinos, C., Dellarossa, A., Toro-Ascuy, D., Prades-Pérez, Y., García-de-Gracia, F., Garcés-Alday, A., Rubilar, P.S., Valiente-Echeverría, F., Ohlmann, T., 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. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1859.

Gonatopoulos-Pournatzis, T., and Cowling, V.H. (2014). Cap-binding complex (CBC). *Biochem. J.* 457, 231–242.

Hierzoler, J.C. and Killington, R.A. (1996) Virus isolation and quantitation. *Virology 13 Methods Manual*, 25-47.

Jayappa, K.D., Ao, Z., and Yao, X. (2012). The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: The process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 70–85.

Jin, L., Guzik, B.W., Bor, Y., Rekosh, D., and Hammarskjöld, M. (2003). Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. *Genes Dev.* 17, 3075–3086.

Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1

integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* 20, 1726–1738.

Karn, J. and Stoltzfus, C. (2012). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a006916.

Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M., and Fujisawa, J.I. (1996). A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. *Biochimie* 1075–1080.

Krishnan, V., and Zeichner, S.L. (2004). Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication. *Retrovirology* 1, 1–5.

Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., and Capon, D.J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency

Laspia, M.F., Rice, A.P., and Mathews, M.B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* 59, 283–292.

Lenasi, T., Peterlin, B.M., and Barboric, M. (2011). Cap-binding protein complex links pre-mRNA capping to transcription elongation and alternative splicing through positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J. Biol. Chem.* 286, 22758–22768.

Maddon, P., Dalgeish, A., McDougal, J., Clapham, P., Weiss, R., and Axel,

R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333–348.

Mahiet, C., and Swanson, C.M. (2016). Control of HIV-1 gene expression by SR proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1417–1425.

Malim, M.H., and Cullen, B.R. (1991). HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: Implications for HIV-1 latency. *Cell* 65, 241–248.

Maquat, L.E. (2004). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Splicing, Translation And mRNP Dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 89–99.

Maquat, L.E., Tarn, W.Y., and Isken, O. (2010). The pioneer round of translation: Features and functions. *Cell* 142, 368–374.

Mbonye, U., and Karn, J. (2014). Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology* 454–455, 328–339.

Mi Kim, K., Cho, H., Choi, K., Kim, J., Kim, B.W., Ko, Y.G., Sung, K.J., and Yoon, K.K. (2009). A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes Dev.* 23, 2033–2045.

Monette, A., Valiente-Echeverría, F., Rivero, M., Cohen, É.A., Lopez-Lastra, M., and Mouland, A.J. (2013). Dual Mechanisms of Translation Initiation of the Full-Length HIV-1 mRNA Contribute to Gag Synthesis. *PLoS One* 8, 1–12.

Müller-McNicoll, M., and Neugebauer, K.M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *TL - 14. Nat. Rev. Genet. 14 VN-r*, 275–287.

Müller-McNicoll, M., and Neugebauer, K.M. (2014). Good cap/bad cap: how the cap-binding complex determines RNA fate. *Nat. Struct. Mol. Biol. 21*, 9–12.

Nisole, S., and Saïb, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology 1*, 9.

Peña, N., Carrillo, D., Muñoz, J.P., Chnaiderman, J., Urzúa, U., León, O., Tornesello, M.L., Corvalán, A.H., Soto-Rifo, R., and Aguayo, F. (2015). Tobacco smoke activates human papillomavirus 16 p97 promoter and cooperates with high-risk E6/E7 for oxidative DNA damage in lung cells. *PLoS One 10*, 1–16.

Powell, D.M., Amaral, M.C., Wu, J.Y., Maniatis, T., and Greene, W.C. (1997). HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94*, 973–978.

Rampalli, S., Kulkarni, A., Kumar, P., Mogare, D., Galande, S., Mitra, D., and Chattopadhyay, S. (2003). Stimulation of Tat-independent transcriptional processivity from the HIV-1 LTR promoter by matrix attachment regions. *Nucleic Acids Res. 31*, 3248–3256.

Ruelas, D.S., and Greene, W.C. (2013). XAn integrated overview of HIV-1

latency. *Cell* 155, 519–529.

Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M., and Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* 6, 275–277.

Sharma, A., Yilmaz, A., Marsh, K., Cochrane, A., and Boris-Lawrie, K. (2012). Thriving under stress: Selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS Pathog.* 8.

Singh, G., Pratt, G., Yeo, G.W., and Moore, M.J. (2013). The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 150317182619002.

Soto-Rifo, R., Limousin, T., Rubilar, P.S., Ricci, E.P., Décimo, D., Moncorgé, O., Trabaud, M.A., André, P., Cimarelli, A., and Ohlmann, T. (2012). Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res.* 40, 2653–2667.

Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., and 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 Res.* 41, 6286–6299.

Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S.Y., Hahn, W.C., Sharp, P.A., Weinberg, R. Novina, C. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* 9, 493–501.

Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., Garcia-de-Gracia, F., Rojas-Fuentes, C., Pereira-Montecinos, C., Gaete-Argel, A., Valiente-Echeverria, F., Ohlmann, T. and Soto-Rifo, R. (2018) A Rev-CBP80-eIF4A1 complex drives Gag synthesis from the HIV-1 unspliced mRNA. *Nucleic Acids Res.*

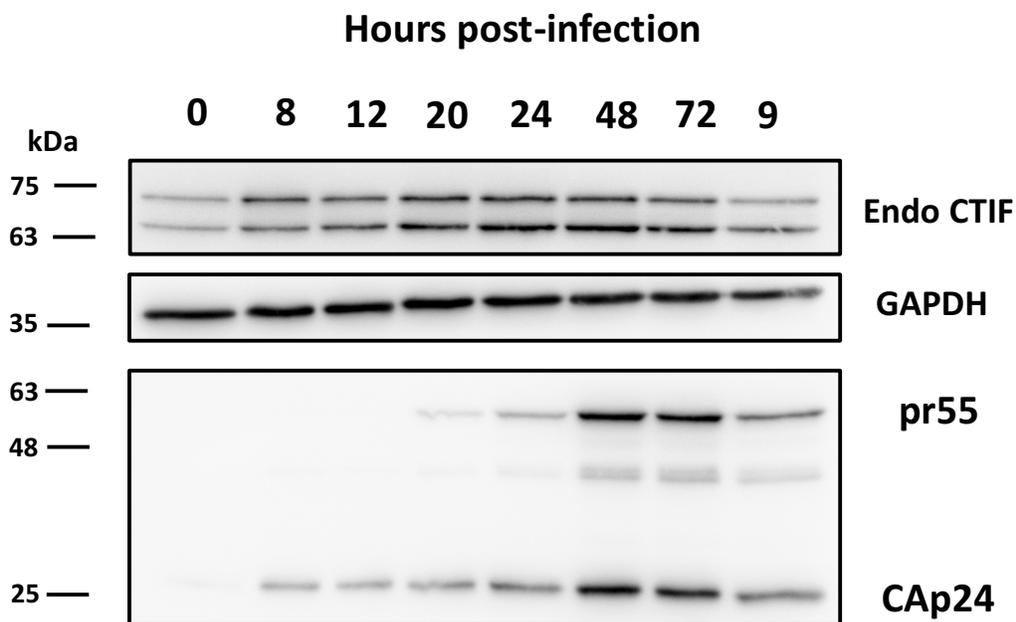
Taniguchi, I., Mabuchi, N., and Ohno, M. (2014). HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acids Res.* 42, 6645–6658.

Vallejos, M., Deforges, J., Plank, T.D.M., Letelier, A., Ramdohr, P., Abraham, C.G., Valiente-Echeverría, F., Kieft, J.S., Sargueil, B., and López-Lastra, M. (2011). Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.* 39, 6186–6200.

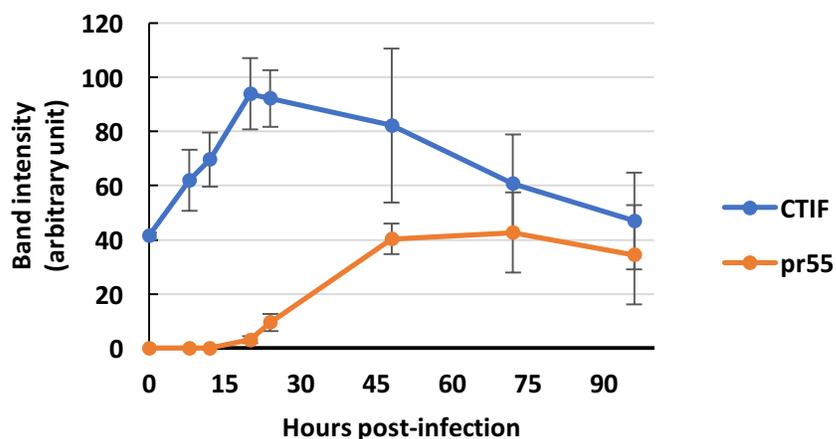
Yedavalli, V.S.R.K., Benkirane, M., and Jeang, K.T. (2003). Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J. Biol. Chem.* 278, 6404–6410.

Anexos

A



B



Anexo 1: La infección de linfocitos-T CD4+ (células Jurkat) por VIH-1 modula la acumulación de CTIF. (A) Células Jurkat fueron infectadas con un pseudotipo de VIH-1 utilizando la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVg). Extractos celulares fueron preparados a las 0, 8, 12, 20, 24, 48, 72 y 96 horas post-infección y se detectó Gag y CTIF mediante Western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga. (B) Gráfico de la intensidad de banda de CTIF y Gag (pr55) de tres experimentos independientes. Los datos fueron normalizados con la intensidad de banda de GAPDH (n = 3, +/- SEM).