

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Rol de la proteína Rev en el reclutamiento de factores
celulares que promueven la síntesis de Gag del Virus de la
Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1)***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Bioquímica**

Bárbara Valeria Rojas Araya

Director de Tesis: Dr. Ricardo Soto Rifo

Santiago-CHILE

Enero 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Barbara Valeria Rojas Araya

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Soto Rifo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lee Meisel

Dr. Carlos Santiviago

Dr. Marcelo Lopez

A mi familia

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que fueron parte de este gran desafío. Amigos y en especial a mi familia. Andrea, Natalie, Kattia, Constanza, Antonia, Martina, Mauro y Gaspar

Gracias por tu apoyo incondicional Angelo Giancaspero.

¡Muchas Gracias a todos!

Índice de contenidos

Agradecimientos	I
Índice contenido	II
Índice de figuras	V
Lista de abreviaturas	VI
Resumen	1
Abstract	3
1. Antecedentes	5
1.1 Virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH) de tipo 1 (VIH-1) y ciclo replicativo.....	5
1.2 Regulación de la expresión génica de VIH-1	8
1.3 Síntesis de proteínas celulares y virales	14
1.4 Rol de la proteína viral Rev en traducción.....	17
2. Hipótesis y objetivos	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
3. Materiales y métodos	22
3.1 Vectores de ADN.....	22
3.2 Cultivo celular y transfección	22
3.3 Análisis de la actividad luciferasa	23
3.4 Western blot	23

3.5 Extracción de ARN y RT-qPCR.....	23
3.6 Co-inmunoprecipitación (Co-IP).....	24
3.7 Inmunoprecipitación de ARN (RNA-IP).....	25
3.8 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH), inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	26
3.9 Ensayo de ligación proximal (PLA)	27
3.10 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente acoplada a PLA (ISH-PLA)	28
4. Resultados	30
4.1 Objetivo específico 1: “Determinar el rol de Rev en el reclutamiento de CBP80 hacia el ARNmc y su impacto en la síntesis de Gag”	30
4.1.1. Determinación de la asociación del ARNmc con CBP80 e eIF4E mediante ISH- PLA.....	30
4.1.2 Impacto de la sobre-expresión de CBP80 y eIF4E en la expresión del ARNmc dependiente de Rev	32
4.1.3 Rev se asocia con CBP80 en células HeLa.....	33
4.1.4 La helicasa de ARN eIF4AI interactúa con la proteína viral Rev y promueve la síntesis de Gag desde el ARNmc.....	34
4.1.5 La helicasa de ARN eIF4AI promueve la exportación nuclear del ARNmc.....	37
4.1.6 La proteína viral Rev regula la asociación de CBP80 y eIF4AI hacia el ARNmc	38
4.1.7 El eje Rev/RRE favorece el reclutamiento del complejo CBP80-eIF4AI hacia el ARNmc	43

4.2	Objetivo específico 2: “Estudiar y caracterizar la interacción entre Rev y eIF4AIII”	46
4.2.1	La helicasa de ARN eIF4AIII favorece la síntesis de Gag.....	46
4.2.2.	La proteína viral Rev favorece la asociación de eIF4AIII hacia el ARNmc.....	50
4.2.3.	La helicasa de ARN eIF4AIII se asocia a la proteína viral Rev a través de su dominio C-terminal.....	51
5.	Discusión	54
6.	Conclusiones	61
7.	Referencias bibliográficas	62

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la partícula de VIH-1	5
Figura 2: Modelo del ciclo replicativo.....	7
Figura 3: Esquema del genoma de VIH y sus transcritos.....	10
Figura 4: Impacto del EJC en el ARN.....	12
Figura 5: Sitios de unión de la proteína Rev en el ARN mensajero completo	19
Figura 6: El ARN mensajero completo interactúa con la subunidad CBP80 del CBC en células HeLa	31
Figura 7: La proteína CBP80 requiere de la proteína viral Rev para promover la síntesis de Gag.....	33
Figura 8: La subunidad CBP80 del CBC interactúa con la proteína viral Rev en células HeLa.....	34
Figura 9: La proteína viral Rev recluta a la helicasa de ARN eIF4AI hacia el ARN mensajero completo para promover la síntesis de Gag.....	35
Figura 10: La proteína Rev modula la función de eIF4AI sobre el ARN mensajero completo	38
Figura 11: Rev promueve el reclutamiento de CBP80 y eIF4AI hacia el ARNmc.....	40
Figura 12: El eje Rev/RRE favorece el reclutamiento de las proteínas CBP80 y eIF4AI hacia el ARNmc.....	44
Figura 13: La helicasa de ARN eIF4AIII del EJC colocaliza con el ARNm.....	47
Figura 14: La proteína eIF4AIII coopera con Rev para promover la síntesis de Gag	49
Figura 15: La proteína viral Rev regula la asociación entre eIF4AIII y el ARNmc	50
Figura 16: El dominio C-terminal de la helicasa eIF4AIII se requiere para la interacción con Rev.....	52

Lista de abreviaturas

5'-UTR: 5'-untranslated región (región 5' no traducible)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNg: Ácido Ribonucleico genómico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ARNmc: Ácido Ribonucleico mensajero completo

ARN pol II: ARN polimerasa II

ARNt: Ácido Ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

CA: Cápside

CBC: *Cap Binding Complex* (Complejo de unión al cap)

CCR5: Receptor C-C de quimioquinas tipo 5

CD4: Cúmulo de diferenciación 4

CRM1: *Chromosome maintenance 1* (Mantenimiento del cromosoma 1)

CTP: Citidina trifosfato

CXCR4: Receptor C-X-C de quimioquinas tipo 4

CTE: Elemento de transporte constitutivo

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DDX1: Helicasa de ARN 1 del tipo DEAD box

DDX17: Helicasa de ARN 17 del tipo DEAD box

DDX21: Helicasa de ARN 21 del tipo DEAD box

DDX3: Helicasa de ARN 3 del tipo DEAD box

DDX5: Helicasa de ARN 5 del tipo DEAD box

DDX56: Helicasa de ARN 56 del tipo DEAD box

DLB: *Denaturing lysis buffer* (buffer de lisis denaturante)

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eIF1A: Factor de inicio de la traducción eucarionte 1A

eIF2: Factor de inicio de la traducción eucarionte 2

eIF3: Factor de inicio de la traducción eucarionte 3

eIF4AI: Factor de inicio de la traducción eucarionte 4AI

eIF4AIII: Factor de inicio de la traducción eucarionte 4AIII

eIF4E: Factor de inicio de la traducción eucarionte 4E

eIF4F: Factor de inicio de la traducción eucarionte 4F

eIF4G: Factor de inicio de la traducción eucarionte 4G

EJC: *Exon Junction Complex* (Complejo de unión al exón)

Env: Proteína de envoltura

FISH: Hibridación in situ fluorescente

Gag: Antígeno grupo específico

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína fluorescente verde

gp120: Glicoproteína 120

gp41: Glicoproteína 41

GTP: Guanosín trifosfato

HCl: Ácido clorhídrico

hRIP: Proteína humana de interacción con Rev

HRP: Peroxidasa de rábano

IN: Integrasa

IRES: Sitio interno de entrada a ribosoma

ISH-PLA: Hibridación in situ – Ensayo de ligación proximal

IsoWB: Del inglés *Isotonic wash buffer* (buffer de lavado isotónico)

ITAFs: Factores trans-activadores del IRES

kb: Kilobase

LTR: Repetición terminal larga

m⁵C: Metilación de la citidina en el carbono 5

m⁶A: metilación de la adenosina en el nitrógeno 6

MA: Matriz

MgCl₂: Cloruro de magnesio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNP: Complejo ribonucleoproteico del ARN mensajero

mTOR: *Mechanistic Target Of Rapamycin* (diana de Rapamicina mecanístico)

NaCl: Cloruro de sodio

NC: nucleocápside

Nef: Factor regulador negativo

NES: Señal de exportación Nuclear

ng: Nanogramo

NLS: Señal de localización nuclear

nm: Nanometro

NMD: *Non-sense Mediated Decay* (Decaimiento sin sentido del ARN)

NP-40: Nonidet P-40

NXF1: Factor de exportación de ARN nuclear 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PABP: Proteína de unión a la cola de poli A

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEI: Polietilenimina

PFA: Paraformaldehído

PLA: Ensayo de ligación proximal

Pol: Polimerasa

poli A: Poliadenilato

PR: Proteasa

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR en tiempo real

REF: Factor de exportación de RNA

Rev: Regulador del virión

rpm: Revoluciones por minuto

RRE: Elemento de respuesta a Rev

RT-qPCR: Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SDS: Sulfato de dodecilo sódico

SIDA: Síndrome inmunodeficiencia adquirida

Tat: Trans-activador de la transcripción

TR: Transcriptasa reversa

TREX: Complejo Transcripción-Exportación

UTP: Uridina trifosfato

UTR: *unstranlated región* (región no traducida)

Vif: Factor de infectividad viral

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1

Vpr: Proteína viral R

Vpu: Proteína viral U

VRC: Complejo de vanadyl ribonucleósido

Resumen

Durante la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1), el ADN proviral es integrado en el genoma celular y luego la ARN polimerasa II sintetiza un único transcrito de 9-kb denominado ARNm completo (ARNmc) del cual se obtienen 3 clases de transcritos por medio de su corte y empalme alternativo. En un inicio, se generan transcritos de 2-kb que poseen corte y empalme total y son utilizados para producir las proteínas reguladoras Tat, Rev y la proteína accesoria Nef. Posteriormente, se acumulan los transcritos de 4-kb con corte y empalme parcial de los cuales se obtienen las proteínas Vif, Vpr, Vpu y Env. La síntesis de las proteínas estructurales Gag y Gag-Pol se realiza a partir del ARNm completo (ARNmc) de 9-kb que no sufre corte y empalme. Los ARNm celulares y los transcritos de 2-kb son sometidos a corte y empalme siguiendo una vía de expresión génica canónica, donde el reclutamiento del complejo de unión al cap nuclear (CBC) y el complejo de unión del exón (EJC) favorece las tasas de exportación nuclear y traducción. Sin embargo, dado que el ARNmc debe evitar el corte y empalme para poder ser utilizado como matriz para la síntesis de Gag y Gag-Pol, éste no puede seguir las vías de exportación nuclear canónicas propias del metabolismo de los ARNm celulares, ya que sería retenido hasta completar el corte y empalme o para ser degradado. Estudios previos han demostrado que la proteína viral Rev se une al ARNmc para asegurar su exportación hacia el citoplasma. Esto gracias a la asociación de Rev con el factor de exportación nuclear CRM1 junto a otros factores celulares que permiten la formación de un complejo ribonucleoproteico (mRNP) competente para la exportación nuclear del ARNmc. Una vez en el citoplasma, este mRNP viral no canónico debe ser reconocido por la maquinaria traduccional celular para la síntesis de proteínas.

En este trabajo se muestra que Rev favorece la síntesis de Gag al promover la exportación nuclear y la traducción del ARNmc. Mediante la técnica de ISH-PLA, observamos que el ARNmc se asocia a las proteínas celulares CBP80 y eIF4A1 lo que favorece la síntesis de Gag, además determinamos que este proceso es mediado por la proteína Rev, de este modo establecimos que la vía de exportación mediada por RRE/Rev es importante para el reclutamiento de estas proteínas celulares. Por otro lado, analizamos por medio de microscopia, si los componentes del EJC formaban parte de un complejo con el ARNmc, de esta forma observamos que solo la helicasa de RNA eIF4AIII colocalizaba con el ARNmc. Por medio de la técnica de RNA-IP observamos que, además, esta helicasa se asocia al ARNmc. Nuestros datos revelaron que la proteína viral Rev es capaz de reclutar a la proteína eIF4AIII a través del extremo C-terminal y forma un complejo ribonucleoproteico con el ARNmc que favorece la síntesis de Gag. De esta manera, entregamos evidencia adicional sobre la composición ribonucleoproteica del ARNmc mediada por Rev para promover la síntesis de Gag.

Abstract

During HIV-1 infection, the RNA polymerase II drives the synthesis of a 9-kb transcript named full-length mRNA (FL mRNA) that is used as a template for alternative splicing to produce different classes of transcripts. In the early stages of viral gene expression, the 2-kb fully spliced transcripts are generated to synthesize the regulatory proteins Tat, Rev, and the accessory protein Nef. Later, the 4-kb partially spliced transcripts are accumulated and used for the synthesis of Vif, Vpr, Vpu and Env. Finally, Gag and Gag-pol polyproteins are synthesized from the usmRNA. Fully spliced viral mRNA follows the canonical gene expression pathway where the recruitment of the cap binding complex (CBC) and the exon junction complex (EJC) enhances the rates of nuclear export and translation. However, since the usmRNA avoids splicing to be used as the template for synthesis of Gag and Gag-Pol, this viral mRNA does not follow the canonical nuclear export pathway, because otherwise it would be retained and degraded in the host cell nucleus. Previous studies have shown that the viral protein Rev binds to the usmRNA to promote its export to the cytoplasm. This is possible by the interaction between Rev with the nuclear export factor CRM1 and together with other cellular factors that allow the formation of a ribonucleoprotein complex (mRNP) for the nuclear export of usmRNA. However, once in the cytoplasm, this non-canonical mRNP must be recognized by the translational machinery for protein synthesis. In this work, we show that Rev favors Gag synthesis by promoting nuclear export and translation of the usmRNA. Through the ISH-PLA technique, we observed that the HIV-1 usmRNA associates with the cellular proteins CBP80 and eIF4A1, which favors the synthesis of Gag. We also determined that the Rev protein drives this process, and the RRE/Rev export pathway is necessary for the recruitment of these proteins onto the viral RNA. On the other hand, we analyzed whether components of the EJC were components of the usmRNA ribonucleoprotein complex, in this way we observed that only the eIF4A1 co-localized with the usmRNA. Through RNA-IP, we observed that this RNA helicase associates with the

usmRNA. Our data show the Rev protein recruits the eIF4AIII protein through the C-terminus and forms a ribonucleoprotein complex with the usmRNA that favors Gag synthesis. Together, our results provide evidence to improve our understanding on the mRNP composition of the usmRNA and how Rev mediates this process to promote Gag synthesis.

1. Antecedentes

1.1 Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del tipo 1 (VIH-1) y ciclo replicativo

El virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1) es reconocido como el principal agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pandemia que según el último reporte de ONUSIDA y la Organización Mundial de la Salud afecta a más de 38 millones de personas en el mundo (UNIADS, 2022). Este virus pertenece a la familia *Retroviridae*, género *lentivirus* y posee como genoma un ARN de hebra simple con polaridad positiva. La partícula viral tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm y está compuesta por una envoltura lipídica en la cual se encuentran las glicoproteínas de superficie gp120 y gp41. En el interior podemos ubicar la cápside que alberga un dímero del genoma viral, además de las enzimas virales transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, que son primordiales para los eventos tempranos de la replicación viral (Li and De Clercq, 2016) (Figura 1).

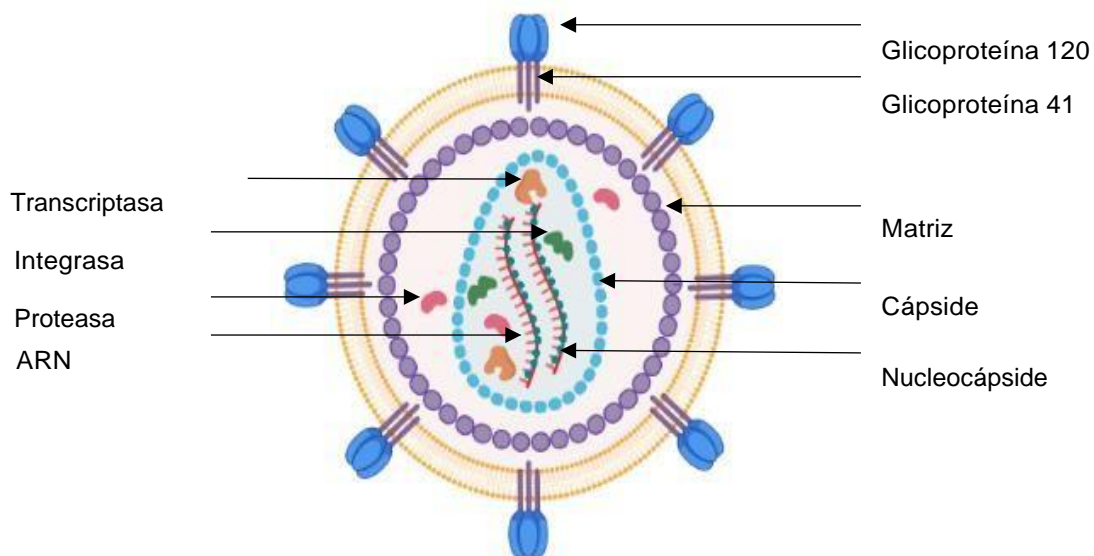


Figura 1: Esquema de la partícula del VIH-1. La partícula viral se conforma en el exterior por una membrana lipídica, donde se encuentran insertas las glicoproteínas gp120 y gp41. Por debajo de la membrana se encuentra la matriz, compuesta por la proteína p17. Hacia el interior de la partícula podemos localizar la cápside viral, la cual se conforma por la proteína p24. El ARN genómico se encuentra al interior de la cápside como un dímero cubierto por la nucleocápside, formada por la proteína p7. Finalmente podemos identificar las enzimas virales: integrasa, transcriptasa reversa y proteasa.

El ciclo replicativo comienza con la interacción entre la glicoproteína de superficie gp120 y el receptor CD4 (presente principalmente en los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas) y uno de los correceptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. Esta interacción provoca un cambio conformacional en gp120 que facilita la inserción de gp41 en la membrana celular gatillando la fusión de ambas membranas y permitiendo el ingreso de la cápside viral. Hasta la fecha el modelo aceptado del ciclo replicativo señalaba una vez que la cápside viral ingresaba al citoplasma, se liberaba el ARN genómico (ARNg) para ser retrotranscrito a una doble hebra de ADN por medio de la enzima transcriptasa reversa viral (RT) (Golding et al., 1993) (**Figura 2**). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la cápside es capaz de atravesar el poro nuclear, liberando el material genético viral en el núcleo dando finalización a la transcripción inversa (Dharan et al., 2020; Guedán et al., 2021; Zila et al., 2021). Una vez obtenido el ADN viral, éste es integrado en el genoma celular, proceso catalizado la enzima integrasa (IN), estableciendo un estado denominado provirus (Frankel and Young, 1998; Katz and Skalka, 1994). El provirus puede permanecer latente o continuar con las siguientes etapas del ciclo replicativo (Ruelas and Greene, 2013). La transcripción del provirus es comandada por la ARN polimerasa II, que reconoce el promotor que se encuentra en la secuencia terminal repetida larga (5´LTR). Este proceso es facilitado por la proteína viral Tat, en conjunto a factores celulares como el complejo pTEFb y factores de transcripción como NF-κB (Cullen, 1986; Jones, 1993). De esta manera se sintetiza un ARN mensajero (ARNm) de 9-kb el cual es denominado ARNm completo (ARNmc) que, además, es idéntico en secuencia al ARNg presente en las partículas virales.

Al ser transcrito por la ARN polimerasa II, el ARNmc tiene las típicas modificaciones de un ARNm celular, como lo es la estructura 7-metil guanosina trifosfato (m⁷GpppN, cap) en el extremo 5' y de una cola de poliadenosinas (poli A) en el extremo 3'. Además, puede poseer otras modificaciones químicas en nucleótidos internos, las cuales incluyen metilación en el nitrógeno 6 de la adenosina (m^{6a}), metilación del carbono 5 de la citidina (m⁵C), acetilación del carbono 4 de la citidina (ac4C) y la 2'-O- metilación de la ribosa (Nm) (Courtney et al., 2019; Dimitrova et al., 2019; Karn and Stoltzfus, 2012; Schumann et al., 2020; Tsai et al., 2020). Se ha determinado que estas modificaciones químicas tienen un impacto en el metabolismo del ARN, como aumentar la expresión del ARN viral (Kennedy et al., 2016; Lichinchi et al., 2016; Ringeard et al., 2019), promover la traducción (Courtney et al., 2019) y evitar la respuesta inmune innata (Ringeard et al., 2019).

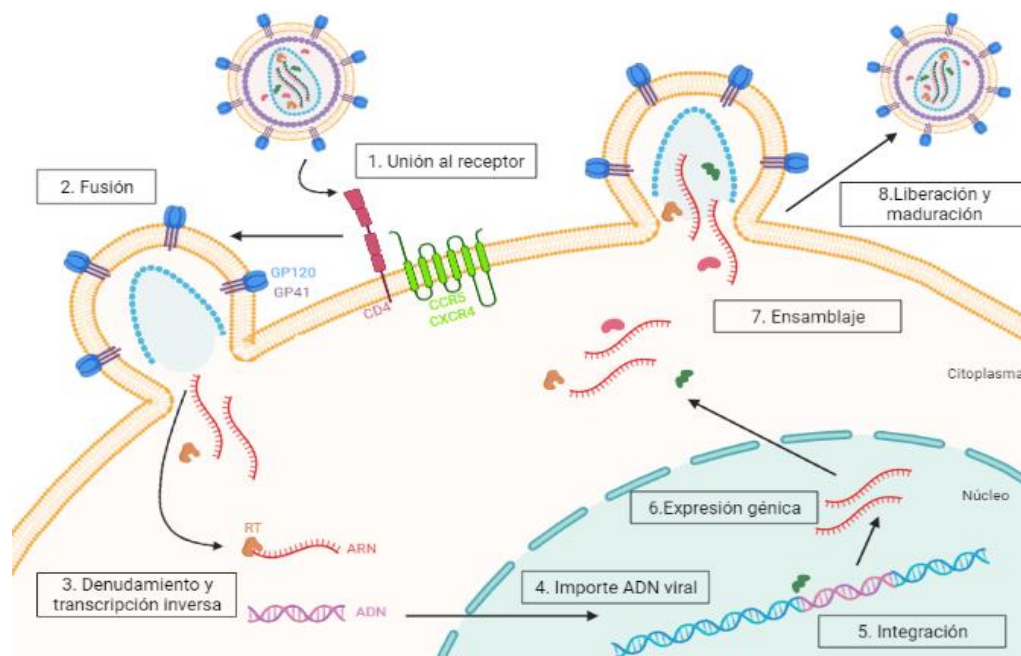


Figura 2: Modelo del ciclo replicativo del VIH-1. Este ciclo comienza con el reconocimiento entre la glicoproteína gp120 el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4. Luego, la proteína gp41 facilita la fusión de la membrana viral y la membrana celular, dando paso al ingreso de la cápside viral para su posterior denudamiento en el citoplasma. Una vez que el ARN es liberado, este es utilizado como molde por la enzima transcriptasa reversa (RT), la que sintetiza una doble hebra de ADN. Este ADN es importado al núcleo para ser integrado en el genoma celular por medio de la integrasa viral (IN), estableciendo un estado de provirus. Posteriormente el genoma viral es transcrito por la ARN polimerasa II y genera un transcrito único de 9-kb el cual es sometido a corte y empalme alternativo, lo que da origen a diferentes clases de transcritos que serán exportados hacia el citoplasma para luego comenzar la síntesis de las proteínas virales. Finalmente ocurre el ensamblaje de las nuevas partículas virales, la liberación y maduración de estas por la acción de la enzima proteasa (PR). Este modelo, es el aceptado hasta la fecha, sin embargo, nuevas evidencias demostrarían que la cápside viral sería capaz de ingresar a través del poro nuclear, liberando en el núcleo el material genético viral.

Por medio del corte y empalme alternativo del ARN_{mc}, se originan los diferentes ARNm virales que deben ser exportados hacia el citoplasma para iniciar la síntesis de las diferentes proteínas que son necesarias para ensamblar una nueva partícula viral (Freed, 2015; Gottlinger et al., 1991). Finalmente, la enzima proteasa (PR) procesa a las glicoproteínas Gag y Gag-Pol generando partículas virales maduras que iniciarán un nuevo ciclo (**Figura 2**) (Craigie and Bushman, 2012; Zhou et al., 2005).

1.2 Regulación de la expresión génica de VIH-1

Al ser transcrito por la ARN pol II, el ARN_{mc} es sometido al procesamiento típico de los ARNm celulares, es decir, posee una estructura cap y una cola de poli-A en los extremos 5' y 3' respectivamente. La presencia de múltiples secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme permite la generación de tres clases de transcritos virales, mediante el proceso de corte y empalme alternativo (Emery et al., 2017; Martin and Purcell, 1993; Mueller et al., 2018). De esta forma, durante las primeras etapas del ciclo replicativo, el ARN_{mc} es procesado completamente, generando transcritos de 2-kb de los cuales se sintetizan las proteínas reguladoras Tat y Rev junto a la proteína accesoria Nef. En etapas posteriores, el ARN_{mc} es parcialmente procesado, generando transcritos de 4-kb que permiten la síntesis de las glicoproteínas de superficie Env (gp120 y gp41) junto a las proteínas accesorias Vpu, Vif y Vpr. Finalmente, a partir del ARN_{mc} se producen las proteínas Gag y Gag-Pol (Martin and Purcell, 1993; Schwartz et al., 1990a, 1990b) (**Figura 3**). Los transcritos que son completamente procesados, es decir los que tienen un tamaño de 2-kb, son exportados hacia el citoplasma a través de la vía de exportación clásica o canónica empleada por los ARNm celulares (Cullen, 2003a, 2003b; Grüter et al., 1998). Por otro lado, los ARNs de 4-kb y 9-kb al poseer intrones no pueden ser exportados por esta vía ya que existen mecanismos de control de calidad que impiden la exportación de estos (Coyle et al., 2011a; Rajanala and Nandicoori, 2012).

Como las proteínas Gag y Gag-Pol se sintetizan a partir del ARN_{mc}, el cual no es sometido a corte y empalme, el virus necesita evadir estos mecanismos de control para lo cual utiliza la proteína viral Rev la que permite la exportación nuclear de aquellos transcritos que contienen intrones. Rev posee en su dominio N-terminal una región rica en arginina, la cual funciona como señal de localización nuclear (NLS), permitiendo así su ingreso al núcleo por medio de la interacción con importinas α/β . Además, tiene un dominio de unión a ARN que permite la interacción con una estructura de ARN denominado Elemento de Respuesta a Rev (RRE), la cual se encuentra en los transcritos virales que poseen secuencias intrónicas, es decir, los transcritos de 4-kb y 9-kb (Felber et al., 1989; Malim et al., 1988, 1989a, 1989b). En el dominio C-terminal de la proteína Rev se encuentra una señal de exportación nuclear (NES) rica en leucinas, la que permite ser reconocida por la carioferina *Chromosome maintenance 1* (CRM1). Es así como se forma un complejo RRE-Rev-CRM1 que permite la exportación de los transcritos virales que poseen intrones mediante una vía alternativa (Fischer et al., 1995; Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Pollard and Malim, 1998). La función de Rev que ha sido descrita de manera más amplia corresponde a su rol en la exportación nuclear de sus ARN blanco, sin embargo, existen diferentes reportes que indican que Rev también promueve la traducción de estos ARNm (Arrigo and Chen, 1991a; Kimura et al., 1996).

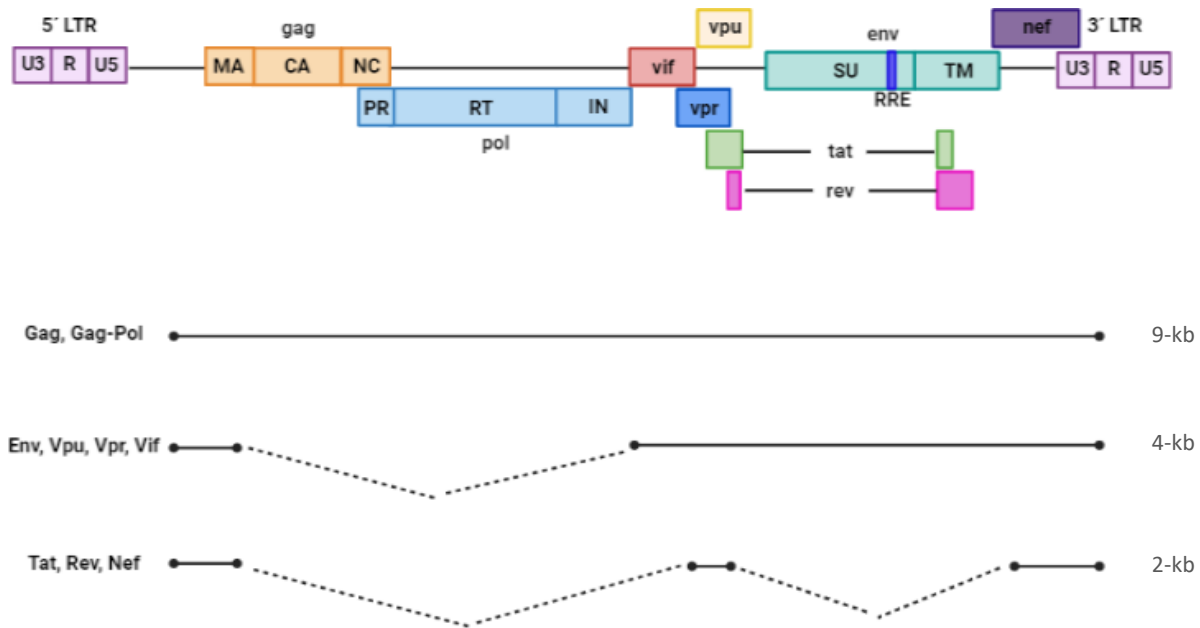


Figura 3: Esquema del genoma de VIH-1 y sus transcritos. Las secuencias codificantes están flaqueadas por la región larga repetida (LTR) ubicadas en los extremos 5' y 3'. El genoma viral posee nueve marcos de lectura abiertos (gag, pol, vif, vpu, vpr, env, tat, rev y nef) (esquema superior). Mediante corte y empalme alternativo se generan tres clases de transcritos: de 9-kb que es utilizado para la síntesis de las proteínas Gag y Gag-Pol, transcritos de 4-kb de los cuales se sintetizan las proteínas Env, Vpu, Vpr y Vif; y los transcritos de 2-kb de los que se generan las proteínas Tat, Rev y Nef (esquema inferior).

Es importante mencionar que la exportación nuclear de los ARNm celulares a través del poro nuclear es un proceso altamente regulado, donde el factor de exportación TAP/NXF1 se recluta al mRNP permitiendo su salida del núcleo (Katahira et al., 1999; Tan et al., 2000). En un primer lugar, la proteína Aly/REF junto con la helicasa de ARN UAP56, se asocian con el complejo THO y forman un complejo denominado TREX, encargado de acoplar la transcripción con la exportación nuclear (Masuda et al., 2005; Palazzo et al., 2007; Ståßer et al., 2002; Taniguchi and Ohno, 2008). El complejo TREX es reclutado al transcrito donde adaptadores como ALY/REF interactúan con el ARNm para que finalmente NXF1 sea reclutado formando un mRNP competente para la exportación (Aibara et al., 2015; Carmody and Wentz, 2009; Katahira, 2012; Masuda et al., 2005; Reed and Hurt, 2002).

La vía de exportación mediada por NXF1 está sometida a mecanismos de control de calidad asociados principalmente a la proteína Tpr, la cual impide la exportación hacia el citoplasma de los ARNm que poseen intrones (Coyle et al., 2011; Rajanala and Nandicoori, 2012; Katahira, 2012; Masuda et al., 2005; Reed and Hurt, 2002).

Además de la eliminación de intrones, el proceso de corte y empalme genera un reordenamiento del mRNP donde se reclutan diferentes proteínas que tendrán un efecto en el destino del ARNm en el citoplasma (traducción, localización, degradación). De esta forma, el mejor ejemplo que nos permite entender el impacto del proceso de corte y empalme en las etapas siguientes del metabolismo del ARNm, es el reclutamiento del EJC (*Exon Junction Complex*), complejo conformado principalmente por las proteínas eIF4AIII, MAGOH, Y14 y MLN51 (Bono and Gehring, 2011; Schlautmann and Gehring, 2020). El EJC es reclutado al ARNm 20-24 nucleótidos río arriba de cada unión exón-exón durante el corte y empalme (Fang et al., 2013; Hir et al., 2001; Merz et al., 2007; Schlautmann and Gehring, 2020). Mientras que eIF4AIII une directamente al ARNm, el heterodímero formado por MAGOH-Y14 estabiliza el EJC al inhibir la actividad ATPasa de eIF4AIII, evitando que se libere del transcrito (Bono and Gehring, 2011; Schlautmann and Gehring, 2020). Una de las funciones más caracterizadas del EJC es durante el proceso de *nonsense-mediated decay* (NMD) el cual tiene como objetivo inducir la degradación de los ARNm que tienen un codón de termino prematuro y así evitar la síntesis de proteínas aberrantes (Kervestin and Jacobson, 2013; Popp and Maquat, 2013).

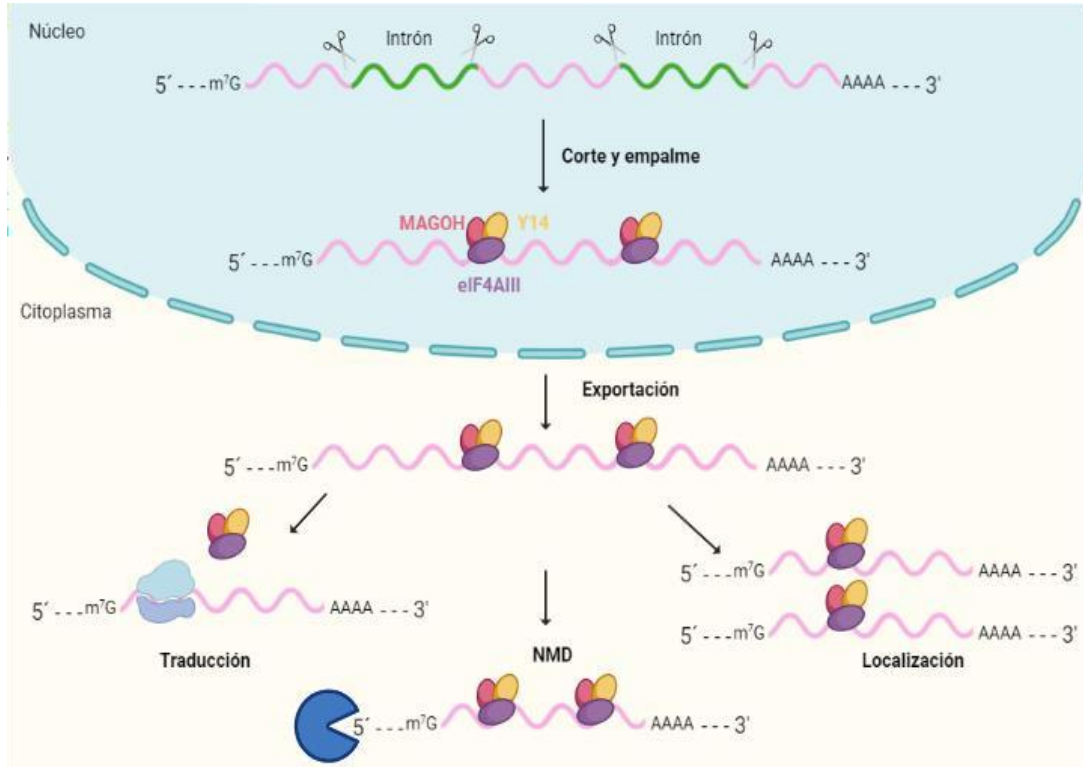


Figura 4: Impacto del EJC en el ARNm. Durante el corte y empalme se eliminan los intrones, reclutando además el EJC el cual se deposita 20-24 nt río arriba de cada unión exón-exón. Una vez que el ARNm es exportado hacia el citoplasma, tendrá diferentes destinos como favorecer la traducción, mecanismo de degradación con el NMD o regular la localización de los ARNm.

Cabe mencionar que además de regular el NMD, el EJC estimula la exportación nuclear a través de sus interacciones con NXF1, ALY/REF y proteínas SR (Singh et al., 2012). Además, el EJC estimula las tasas de traducción de los ARNm. Evidencias sugieren que esta estimulación ocurriría por el reclutamiento de una proteína asociada al ribosoma PYM (Diem et al., 2007) o por medio de la vía mTOR/S6K1, reclutando a la proteína SKAR (Ma et al., 2008). Otro reporte indicó que el EJC participaría en la regulación de la localización del ARNm *oskar* en *Drosophila* (Palacios et al., 2004), demostrando que procesos que ocurren en el núcleo como el corte y empalme, tienen un impacto en el destino del ARNm en el citoplasma (**Figura 4**).

Una vez que el ARNm se encuentra en el citoplasma, se inicia la primera ronda de traducción la que está asociada al CBC y tiene como finalidad realizar un control de calidad del ARNm a través del NMD (Chiu et al., 2004; Isken and Maquat, 2008; Maquat et al., 2010). Posteriormente, se produce un reordenamiento del mRNP donde el complejo de unión al cap CBP80/CBP20 es reemplazado por el factor de inicio de traducción de eucarionte (eIF) 4F (eIF4F) para dar lugar a la síntesis global de proteínas (Maquat, 2004). Como ya se mencionó, los transcritos virales de 2-kb se comportan como un ARNm celular, los cuales son sometidos a corte y empalme total por lo que se espera que formen un mRNP similar al de un transcrito celular, en donde se reclutaría el EJC durante el corte y empalme para luego ser exportado mediante NXF1 (Cullen, 2003b, 2003a). Por otro lado, el ARNm completo no es sometido a corte y empalme y debido a esto, requiere ser exportado por una vía alternativa la cual depende de la proteína viral Rev, por lo cual se espera que la composición de su mRNP sea diferente al de los mensajeros de 2-kb y a los transcritos celulares. Como la exportación mediada por Rev es facilitada por CRM1, se han estudiado diversas proteínas celulares asociadas a Rev que también participan en la exportación del ARNm completo (Suhasini and Reddy, 2009). Entre estas proteínas podemos encontrar a eIF5A, la cual favorece la interacción entre Rev y CRM1 (Hofmann et al., 2001; Ruhl et al., 1993). Sam68 y hRIP que favorecen la exportación del ARNm completo (Modem et al., 2005; Yu et al., 2005) y diversas helicasas de ARN miembro de la familia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box, como DDX1, DDX3, DDX5, DDX17, DDX21 Y DDX56 las cuales se unen a la proteína Rev, promoviendo así la exportación del ARNm (Fang et al., 2004; Yasuda-Inoue et al., 2013; Yedavalli et al., 2004). Si bien la mayoría de las investigaciones se han centrado en identificar diferentes cofactores de Rev que promueven la exportación del ARNm, aún hay escasas evidencias sobre proteínas celulares o cofactores de Rev que promuevan la traducción del ARNm.

Un estudio sugiere que en presencia de Rev los ARNm que son exportados por Rev, se asocian a la proteína de unión a la cola de poli A (PABPC1) (Campbell et al., 1994). Otras investigaciones han demostrado que la helicasa de ARN DDX3 es reclutada al mRNP del ARNmc para promover tanto la exportación como la traducción del ARNmc (Fröhlich et al., 2016; Soto-Rifo et al., 2012, 2013; Yedavalli et al., 2004). Como se ha explicado, el ARNmc forma parte de un mRNP de exportación distinto al de un ARNm celular, pero, al igual que un transcrito celular, el ARNmc se debe asociar a la maquinaria traduccional una vez en el citoplasma con la finalidad de sintetizar cantidades de las proteínas Gag y Gag-Pol suficientes para la generación de la progenie viral.

1.3 Síntesis de proteínas celulares y virales

La traducción de los ARN se puede dividir en 4 etapas: inicio, elongación, término y reciclaje del ribosoma. Si bien cada una de estas etapas está altamente regulada, es durante el inicio de la traducción donde se ejercen mayores niveles de control (Gebauer and Hentze, 2004; Jackson et al., 2010; López-Lastra et al., 2005; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Según el mecanismo por el cual la subunidad 40S del ribosoma es reclutada, el inicio de la traducción puede ser dependiente o independiente del cap (Barrera et al., 2020; Jackson et al., 2010; López-Lastra et al., 2005; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Durante la traducción cap-dependiente, la estructura 5' cap es reconocida por el complejo eIF4F, el cual está compuesto por las proteínas eIF4E, eIF4A y eIF4G. La proteína eIF4E reconoce la estructura cap, eIF4A es una helicasa de ARN que permite desestabilizar las estructuras secundarias del ARNm mientras que eIF4G es una proteína de andamiaje que posee sitios de unión a eIF4A, eIF4E, eIF3 y a PABP (Gingras et al., 1999; Gross et al., 2003; Rogers et al., 2002; Rozen et al., 1990).

De esta forma, eIF4E permite unir el ARNm con la subunidad 40S como parte del complejo 43S compuesto por eIF2-GTP/Met-ARNt, eIF1A, eIF1 y eIF3 (Jackson et al., 2010; López-Lastra et al., 2005).

Luego que la subunidad 40S es reclutada a la estructura cap, el complejo migra a través de la región 5'- no traducible (5'-UTR) en sentido 5' a 3', hasta encontrar un codón de inicio, proceso que se denomina *scanning*. El codón de inicio generalmente corresponde al primer triplete AUG ubicado río abajo del extremo 5', el que generalmente se encuentra en un contexto adecuado de secuencia (A/GXXAUGG, donde X es cualquier nucleótido) (Hinnebusch, 2017; Jackson et al., 2010; Kozak, 1989). Cuando la subunidad 40S se posiciona en el codón de inicio, ocurre una asociación entre el codón AUG y la región anticodón del Met-ARNt y los eIFs son liberados y reciclados permitiendo el reclutamiento de la subunidad 60S, la cual permite el ensamblaje de un ribosoma competente para continuar en la etapa de elongación.

De forma alternativa, el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S puede ocurrir independiente del cap en el extremo 5', a través de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES). Los IRES fueron inicialmente descritos en los ARNm de los picornavirus (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988), sin embargo, la presencia de IRES se ha descrito en diferentes ARNm virales y celulares (Balvay et al., 2007, 2009; Barrera et al., 2020; Martínez-Salas et al., 2018; Vallejos et al., 2012). Si bien el inicio de traducción mediado por IRES de los diferentes ARNm comparten una similitud en el funcionamiento, existen algunas diferencias entre estos. Por ejemplo, en algunos IRES es posible reclutar el complejo 43S sin necesidad de utilizar eIF4F, mientras que en otros utilizan algunos de los factores como eIF4G y eIF4A. Por otro lado, algunos IRES requieren de otras proteínas de unión al ARN que funcionan como factores trans-activadores de IRES (ITAFs) (Balvay et al., 2009; Barrera et al., 2020; Hellen and Sarnow, 2001; López-Lastra et al., 2005; Vallejos et al., 2011).

En el caso del ARNmc de VIH-1, se ha reportado que el inicio de la traducción puede ocurrir de diferentes maneras, como dependiente del cap, dependiente del cap e independiente de eIF4E o a través de IRES (Brasey et al., 2003; Monette et al., 2013; Plank et al., 2013; Ricci et al., 2008; Sharma et al., 2012; Soto-Rifo et al., 2013; Vallejos et al., 2012). En el caso de la traducción dependiente de cap, pero independiente de eIF4E, este factor sería reemplazado por el CBC y/o la helicasa de ARN DDX3 (Sharma et al., 2012; Soto-Rifo et al., 2012a, 2013).

Se ha reportado en diferentes investigaciones que la traducción del ARNm es dependiente del cap en etapas iniciales de la infección (Barrera et al., 2020), sin embargo, mientras la infección avanza, en la célula se induce un estrés osmótico y oxidativo (Gendron et al., 2011; Monette et al., 2009) desfavoreciendo una síntesis de proteína cap-dependiente y dando lugar a un inicio de traducción no canónico, induciendo mediado por IRES. Además, ha sido reportado que la proteasa viral procesa a las proteínas eIF4G y PABP lo que disminuye la traducción cap-dependiente (Castelló et al., 2009; Ohlmann et al., 2002; Perales et al., 2003; Ventoso et al., 2001). Otra manera mediante la cual la síntesis de las proteínas celulares se inhibe, es por la detención del ciclo celular en las etapas G2/M mediados por las proteínas virales Vif y Vpr (Goh et al., 1998; Izumi et al., 2010; Sharma et al., 2012) lo que se acompaña de una hipofosforilación de 4E-BP1 y el consecuente secuestro de eIF4E, evitando así la unión de este factor con eIF4G (Richter and Sonenberg, 2005; Topisirovic et al., 2011; Yamasaki and Anderson, 2008) favoreciendo una traducción del ARNmc mediada por el IRES. Sin embargo, como ocurren los mecanismos de estos cambios en el inicio de traducción del ARNmc aún no están claros.

En un estudio publicado en el año 2012 se observó que el ARNmc estaría asociado a CBP80 durante la detención del ciclo celular inducido por la proteína viral Vpr, encontrando incluso, la presencia de CBP80 y no eIF4E en partículas virales, lo que sugiere un inicio de traducción mediado por el CBC (Sharma et al., 2012). Por otro lado, se reportó que eIF4E es excluido del RNP del ARNmc, siendo sustituido por DDX3 promoviendo así la traducción del ARNmc (Soto-Rifo et al., 2013).

1.4 Rol de la proteína viral Rev en traducción

Anteriormente se mencionó el rol principal de la proteína Rev en la exportación nuclear, sin embargo, evidencias acumuladas han demostrado que Rev también tendría un rol importante en la traducción de sus ARNm blancos. En un estudio realizado en el año 1991 por Arrigo y Chen, se reportó que en ausencia de la proteína Rev o del RRE los transcritos de vif, vpr, env y vpu se acumularon en el citoplasma, pero la asociación de estos ARNs con los ribosomas ocurrió de forma deficiente (Arrigo and Chen, 1991). En este trabajo se concluyó que la proteína Rev no solo tendría un rol en la exportación de los ARNm que poseen RRE, sino que también tendría un rol fundamental en el reclutamiento de los ribosomas sobre estos (Arrigo and Chen, 1991). Continuando con los estudios para identificar el rol de Rev en traducción, D'Agostino y colaboradores en el año 1992, observaron que a pesar de la ausencia de Rev, se logró encontrar transcritos que codifican a la proteína Gag en el citoplasma, mientras que la síntesis de la proteína Gag dependía estrictamente de la presencia de Rev. Esto se determinó ya que en presencia de Rev los niveles de los ARNm gag y la síntesis de Gag aumentaron aproximadamente 4.4 y 845 veces respectivamente (D'Agostino et al., 1992).

En otra publicación, para estudiar la producción de ARNm que contienen intrones, se utilizó un vector proviral reportero con una mutación en el gen *rev*, evitando así la síntesis de esta proteína. Aunque en ausencia de Rev se logró detectar niveles significativos en el citoplasma de los ARNm que codifican a Gag y Env, se sintetizaron cantidades reducidas de estas proteínas. Sin embargo, en presencia de Rev la traducción de estos ARNm aumentó hasta 200 veces. Por otro lado, también se demostró que los ARNm asociados a Rev se estarían asociando a polisomas mientras que el ARNm detectado en el citoplasma, en ausencia de Rev, se encontró asociado a la subunidad ribosomal 40S (Kimura et al., 1996).

En otro trabajo realizado en el año 2005, se reportó que Rev promueve la síntesis de Env, aun incluso cuando la exportación hacia el citoplasma de este transcrito es baja. Además, se estudió el rol que ejerce el RRE en la traducción utilizando un gen reportero de la luciferasa y se observó que la función de Rev en traducción dependería de la presencia de la estructura RRE (Perales et al., 2005). Por otro lado, se identificó un sitio de unión de Rev en el ARN viral ubicado en el loop A del *stem-loop 1* de la región 5'-no traducida (Gallego et al., 2003) (**Figura 5**) el cual se estudió posteriormente para determinar el rol de Rev en traducción (Groom et al., 2009). En esta investigación, se utilizó un sistema de traducción *in vitro* demostrando un efecto inhibitorio de la traducción al usar altas concentraciones de Rev, mientras que a bajas concentraciones se logró observar una estimulación de la traducción en los reporteros que contenían el loop A. Sin embargo, este mecanismo no se estudió en detalle (Groom et al., 2009).

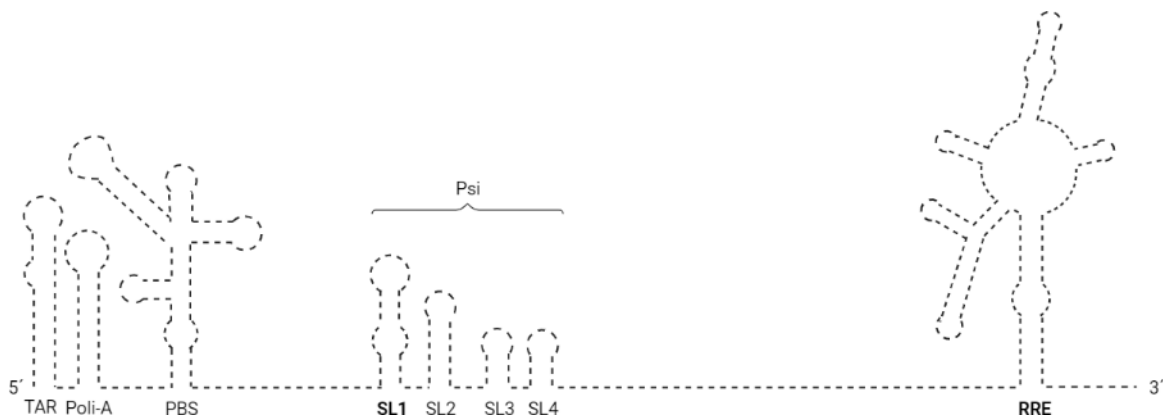


Figura 5: Sitios de unión de la proteína viral Rev en el ARN mensajero completo. En la región 5'-no traducida podemos encontrar las estructuras secundarias TAR: Elemento de Respuesta de transactivación, Poli-A: Señal de Poli adenilación, PBS: Sitio de Unión del cebador, Psi: Señal de empaque. Cercano a la región 3'-no traducida se encuentra la estructura RRE: Elemento de Respuesta a Rev. Los sitios de unión de Rev en el ARN mensajero completo, se marca en color negro. En el **SL1** (*stem-loop 1*) ubicado en la estructura Psi y en el **RRE**

En resumen, si bien la función mayormente estudiada de la proteína viral Rev tiene relación con la exportación de los ARNm que poseen intrones, existen investigaciones que atribuyen una función de Rev en la traducción de estos ARNm.

Es por este motivo que es necesario identificar y caracterizar proteínas y/o factores celulares que son reclutados al ARNm junto a Rev para favorecer su asociación con la maquinaria de traducción.

De manera interesante, un estudio que utilizó un método de captura del ARNm logró identificar más de ciento ochenta proteínas celulares que se asociaban a este transcrito. Entre estas proteínas cabe destacarla helicasa de ARN eIF4AIII, la cual es un principal componente del EJC (Knoener et al., 2017). En este sentido, un estudio anterior demostró que la proteína celular Staufen1, la cual es reclutada al ARNm (Mouland et al., 2000), interactúa con eIF4AIII en presencia de VIH-1 (Milev et al., 2012). El hecho de encontrar a la proteína eIF4AIII formando parte del mRNP del ARNm, es sorprendente ya que esta proteína es reclutada a los ARNm celulares mediante el EJC el cual es dependiente del proceso de corte y empalme.

Tomando en cuenta que el ARNmc estaría asociado al CBC en el citoplasma formando un mRNP de traducción no canónico en el cual también podría asociarse la proteína eIF4AIII y sumado a que a Rev se le han asociado diferentes proteínas celulares, además de ser un regulador post transcripcional en la síntesis de Gag se hace necesario ahondar en la función del CBC y la helicasa eIF4AIII y su relación con Rev en la síntesis de Gag.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

“La proteína Rev de VIH-1 promueve la síntesis de Gag al reclutar la subunidad CBP80 del CBC y la helicasa de ARN eIF4AIII al ARN mensajero completo”

Objetivo general

Estudiar el rol de la proteína viral Rev en el reclutamiento de las proteínas celulares CBP80 y eIF4AIII hacia el ARN mensajero completo de VIH-1

Objetivos específicos

1. Determinar el rol de Rev en el reclutamiento de CBP80 hacia el ARNmc y su impacto en la síntesis de la proteína Gag.
2. Caracterizar la interacción entre Rev y eIF4AIII y su impacto en la síntesis de la proteína Gag.

3. Materiales y métodos

3.1 Vectores de ADN

Los vectores pNL4.3 y pNL4.3R fueron descritos previamente (Fröhlich et al., 2016; Soto-Rifo et al., 2012b). Para generar los vectores pNL4.3- Δ Rev y pNL4.3R- Δ Rev, ambos fueron digeridos con la enzima BamHI y luego se le incorporó nucleótidos mediante un ciclo de elongación utilizando la ADN polimerasa Phusion® (New England Biolabs) de esta forma se provoca un corrimiento en el marco de lectura del gen *rev* resultando en una supresión de la expresión de la proteína Rev (Sodroski et al., 1986). Los vectores pCMV-NL4.3R y pCMV-NL4.3R- Δ Rev, pNL4.3-CTE y pNL4.3R-CTE fueron descritos previamente (Fröhlich et al., 2016; Zolotukhin et al., 1994). El vector pCDNA-Flag-Rev se reportó previamente (Rajanala and Nandicoori, 2012). Los vectores pCDNA-d2EGFP, pCIneo-HA-eIF4A, eIF4E y-eIF3g se describieron previamente (Soto-Rifo et al., 2012a). Los vectores pCMV-myc-eIF4E y pCMV-myc-CBP80 se reportaron previamente (Choe et al., 2012). El vector pBSK-Gag/Pol fue utilizado para generar sondas biotiniladas previamente descritas (Soto-Rifo et al., 2013). Los vectores pCMV-3XFlag-eIF4AIII, pCMV-3XFlag-eIF4AIII N-terminal y pCMV-3XFlag-eIF4AIII C-terminal fueron descrito (Shibuya et al., 2006).

3.2 Cultivo celular y transfección

Las líneas celulares humanas HeLa y HEK293T se mantuvieron en DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y 1% antibiótico y antimicótico (Hyclone) a 37°C con 5% de CO₂. Las células HeLa y HEK293T fueron transfectadas usando polietilenimina (PEI) de 25.000 Da (Polysciences) preparada como se describe en (Reed et al., 2006). Estas células se transfectaron utilizando una proporción μ g DNA/ μ L PEI de 1/15 (Toro-Ascuy, 2018).

3.3 Análisis de la actividad luciferasa

La actividad enzimática de la luciferasa de Renilla se determinó utilizando el kit Renilla Reporter Assay System (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante en el luminómetro GloMax® microplate luminometer (Promega).

3.4 Western blot

Células transfectadas fueron lisadas con un buffer RIPA y se utilizó 20 µg de proteínas totales que fueron resueltas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de PVDF Amersham Hybond™-P (GE Healthcare). Las membranas fueron incubadas con anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína p24 de VIH-1 diluido 1/1000, anticuerpo anti-Flag (Sigma-Aldrich) diluido 1/1000, anticuerpo anti-Actina conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnologies) diluido 1/750. Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP correspondiente para cada ensayo diluido 1/1000 (para la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios, se usó una solución de TBS-T 1X con 0.5% de leche) Las membranas se revelaron utilizando el sustrato Pierce®ECL o SuperSignal™ West femto (Thermo Fisher Scientific) utilizando el equipo HD9 Western blot Imaging System (UVIttec) o el scanner digital C-Digit (Li-Cor).

3.5 Extracción de ARN y RT-qPCR

La extracción del ARN citoplasmático y el posterior análisis mediante RT-qPCR se realizó como se describe en (Fröhlich et al., 2016). Las células posteriormente transfectadas se lavaron con PBS, se recuperaron con PBS-EDTA 10 mM y fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min a 4°C.

El pellet celular fue lisado con 200 µL del 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]) a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4°C y luego se recuperó el sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática. Se utilizó Trizol® Reagent (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante para extraer el ARN. A partir del ARN citoplasmático (300ng) se sintetizó ADNc con el kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para realizar el qPCR, se preparó un mix total de 25 µL con 5 µL de ADNc (diluido previamente 1/10), 10 µL de Fast-Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche), 0.2 µM de los partidores sentido y anti-sentido. La amplificación se realizó utilizando un Rotorgen fluorescence thermocycler (Qiagen). Se amplificó en paralelo el gen endógeno de GAPDH como control. Se comparó el número de copias relativo del ARNmc de VIH-1 con el GAPDH utilizando la fórmula $x^{-\Delta Ct}$ (X corresponde a la eficiencia de amplificación de cada pareja de partidores obtenidas experimentalmente).

3.6 Co-inmunoprecipitación (Co-IP)

Células HEK293T fueron lavadas dos veces con 10 mL PBS, luego fueron recuperadas con 5 mL de PBS y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Las células fueron lisadas con 6 mL de buffer I (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1% Triton X-100, inhibidor de proteasa [Roche]) y fueron incubadas durante 10 min en hielo. El lisado fue sonificado a 40% de amplitud por un total de 16 seg (8 pulsos de 2 seg con intervalos de 10 seg).

El NaCl fue ajustado a 150 mM final y se centrifugó el lisado a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante. Por otro lado, 130 µL de anti-FLAG® beads magnéticas (Sigma-Aldrich) se lavaron 2 veces con 1 mL de buffer I y se dejaron en un volumen final de 180 µL. Se agregaron 30 µL de perlas anti-FLAG® (Sigma-Aldrich) al lisado celular por 30 min a 4°C con rotación, terminado el tiempo se eliminaron las anti-FLAG® conservando el sobrenadante. Del volumen total se extrajo el 10% de la muestra para considerar el input de cada condición, a la parte restante se incubó con 150 µL de perlas anti-FLAG® y se incubó por 2 horas a 4°C con rotación. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 mL del buffer II (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40). Finalmente, las perlas se lavaron 3 veces con 1 mL del buffer II adicionando 0.1% de SDS y 0.1% desoxicolato de sodio, luego de los lavados se resuspendieron en 50 µL de buffer II y se le agregó buffer de carga de proteínas para analizar la inmunoprecipitación mediante Western blot.

3.7 Inmunoprecipitación de ARN (RNA-IP)

Células HeLa fueron lavadas dos veces con 10 mL PBS, luego fueron recuperadas con 5 mL de PBS y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Las células fueron lisadas con 1 mL del buffer DLB (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% desoxicolato de sodio, inhibidor de proteasa [Roche]) se incubó durante 10 min en hielo. El lisado fue sonicado a 40% de amplitud por un total de 6 s (en pulsos de 2 s con intervalos de 10 s) y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. Se agregó 9 mL del buffer DLB en donde el NaCl fue ajustado a 300 mM. El lisado fue incubado con 200 µL de perlas anti-FLAG® de agarosa (Sigma-Aldrich), previamente lavadas dos veces con 1 mL del buffer IsoWB (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40), durante 2 horas a 4°C.

Las perlas anti-FLAG fueron eluidas a temperatura ambiente con 100 mM de glicina pH 2.5 y luego se centrifugó a 15.000 rpm por 1 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y neutralizado con un volumen de buffer Tris-HCl pH 8.0. El RNA fue extraído con fenol: cloroformo: iso-amyl alcohol (25:24:1) (VWR). Se recuperó la fase acuosa y se suplementó con 10 µg de glicógeno, 300 mM de acetato de sodio pH 5.2 y 10 mM MgCl₂. El ARN se precipitó toda la noche con 2.5 volúmenes de etanol 100% a -20 °C. Finalmente el ARN fue lavado con etanol 70% y se resuspendió en 20 µL de H₂O y se realizó un RT-qPCR para determinar la cantidad relativa del ARNmc en el inmunoprecipitado.

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

Por medio de transcripción *in vitro* se generaron sondas específicas que reconocen el ARNmc utilizando el vector pBSK-Gag/Pol digerido con la enzima *EcoRI* tal cual fue descrito (Soto-Rifo et al., 2013). Se realizó la reacción de transcripción utilizando 1 µg del vector lineal, 10 U de ARN polimerasa T3 (Promega), 20 U de RNAsin (Promega), mix de rNTP (1.6 mM de GTP, ATP y CTP y 1.04 mM UTP/0.56 mM 11-digoxigenina-UTP [Roche]), 3 mM de DDT y 5 µL de Transcription Optimized 5X Buffer en un volumen final de 25 µL. El transcrito de 5-kb complementario a la región Gag/Pol del ARNmc generado en la transcripción *in vitro* se fragmentó utilizando el *RNA fragmentation* buffer (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con esta fragmentación se obtuvieron oligonucleótidos de entre 100 a 200 nucleótidos. Los fragmentos obtenidos se purificaron usando perlas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Para los ensayos de FISH, las células HeLa se cultivaron en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos y se transfectaron con 1 µg de cada vector. 24 horas post transfección las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron por 10 min a temperatura ambiente con 4% de paraformaldehído (PFA).

Luego las células se permeabilizaron por 10 min a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0.2% y se hibridó toda la noche en una cámara húmeda a 37°C en 200 µl del mix de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa, 50% formamida, 300 µg ARNt y 120 ng de sonda con 11-digoxigenina-UTP). Las células se lavaron con 0.2X SSC/50% formamida durante 30 min a 50°C. Las células se lavaron tres veces con solución de dilución de anticuerpos (2X SSC, 8% formamida, 2 mM de VRC, 0.02% de BSA libre de ARNasa). Se agregaron los anticuerpos anti-digoxigenina y anti-HA (Sigma Aldrich) diluidos 1/100 en solución de dilución de anticuerpos, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con buffer de dilución de anticuerpo, las células fueron incubadas por 90 min a temperatura ambiente con anticuepo secundario conjugado a Alexa 488 o conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes), ambos diluidos 1/500. Las células fueron lavadas 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 en PBS) (Life Technologies) por 1 min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces en PBS y tres veces con agua libre de nucleasas y finalmente se montaron en el portaobjetos con Fluoromount™ (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y fueron procesadas utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

3.9 Ensayo de ligación proximal (PLA)

Este ensayo se realizó utilizando el kit DUOLINK II In Situ (Sigma-Aldrich) y PLA probe anti-mouse minus y PLA probe anti-rabbit plus (Sigma-Aldrich). Para esto, las células HeLa se fijaron previamente con PFA, se permeabilizaron con Tritón X-100 y se pre-incubaron con una solución de bloqueo (Sigma-Aldrich) por 30 min a temperatura ambiente.

Se utilizaron anticuerpos primarios diluidos 1/100 (ratón anti-HA, Santa Cruz Biotechnologies) y 1/200 (conejo anti-Flag, Sigma-Aldrich) en 40 μ L de solución de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Las muestras se lavaron tres veces con PBS y se continuó con la reacción de ligación a 37°C por 30 min en una cámara húmeda. Luego, las células se lavaron con PBS y se continuó con la reacción de amplificación a 37°C por 100 min en cámara húmeda. Las muestras fueron incubadas con DAPI (0.3 g/mL en PBS) (LifeTechnologies) por un min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS, luego tres veces con agua, se dejaron secar y finalmente se montaron con Fluoromount™ (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y fueron procesadas utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

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

La técnica de ISH-PLA, se desarrolló combinando el ensayo de FISH y PLA descritos previamente. Para ello, células HeLa se sembraron en cubreobjetos y a las 24 horas post transfección se fijaron con PFA. Luego, fueron permeabilizadas por 10 min a temperatura ambiente con 0.2% Tritón X-100 y se dejó hibridando toda la noche a 37°C en una cámara húmeda con 200 μ L de mix de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasas, 50% formamida, 300 μ g ARNt y 120 ng de sonda marcada con 11-digoxigenina-UTP). Luego las células se lavaron con 0.2X SSC/ 50% formamida durante 30 min a 50°C y se incubó con buffer de bloqueo por 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con el buffer 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- proteínas de interés diluidos 1/100 en buffer de dilución de anticuerpos, se añadieron en las células por 2 horas a temperatura ambiente.

Las células fueron lavadas tres veces con buffer de dilución de anticuerpos y dos veces con PBS por 5 min cada lavado, los anticuerpos secundarios (DUOLINK anti-rabbit PLA-plus probe, DUOLINK anti-mouse PLA-minus probe) fueron incubados a 37°C por una hora. Las reacciones de ligación y amplificación se realizaron siguiendo el protocolo de PLA descrito anteriormente. Finalmente, los cubreobjetos se incubaron con DAPI (0.3 g/mL en PBS) (Life Technologies) por un min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS, luego tres veces con agua, se dejaron secar y finalmente se montaron con Fluoromount™ (Life Technologies). Las imágenes se obtuvieron con los microscopios confocales TCS SP8 (Leica Microsystems) o Zeiss LSM 800 (Zeiss) y fueron procesadas utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

4. Resultados

4.1 Objetivo específico 1: “Determinar el rol de Rev en el reclutamiento de CBP80 hacia el ARNmc y su impacto en la síntesis de Gag”

4.1.1. Determinación de la asociación del ARNmc con CBP80 e eIF4E mediante ISH-PLA

La proteína viral Rev promueve la síntesis de Gag al favorecer la exportación nuclear y la traducción del ARNmc, sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurren estas regulaciones aún no están del todo claros. En este sentido, un estudio propuso que el ARNmc se mantendría asociado al CBC luego de la primera ronda de traducción, evitando la interacción con eIF4E (Sharma et al., 2012). Siguiendo esta idea se propuso analizar si el ARNmc se asocia preferentemente al CBC o eIF4E determinando el rol de Rev en este proceso. Para esto, se desarrolló un protocolo en el cual se combinan las técnicas de hibridación *in situ* con PLA (ISH-PLA) con el objetivo de determinar y cuantificar interacciones entre el ARNmc y una proteína de interés (Roussis et al., 2017; Toro-Ascuy et al., 2021). Si el ARNmc y la proteína de interés están a una distancia inferior a 40 Å, será posible observar una señal en forma de un punto rojo utilizando microscopía confocal. En esta ocasión células HeLa fueron transfectadas con los vectores pNL4.3 y pCMV-myc-CBP80 o pCMV-myc-eIF4E y luego de 24 horas post transfección se procedió con el ensayo ISH-PLA. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-digoxigenina que reconocen el ARNmc y anti-myc para reconocer cada una de las proteínas de interés. Al analizar la asociación del ARNmc con CBP80 o eIF4E, podemos observar señal en ambas condiciones, sin embargo, al cuantificar las interacciones en cada condición observamos una mayor cantidad de interacciones con CBP80 que con eIF4E sugiriendo una interacción mayoritaria del ARNmc con el componente del CBC (**Figura 6A**).

Se realizó ensayos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en paralelo a los ensayos ISH-PLA, observando que la mayoría de la señal de la proteína CBP80 se encontraba principalmente en el núcleo mientras que la señal de eIF4E fue citoplásmica (**Figura 6B**, panel izquierdo), mientras que la interacción entre ARNm y CBP80 se encuentra principalmente en el citoplasma, indicando que el ARNm quedaría asociado al CBC tras su exportación nuclear. Se cuantificó la intensidad de la señal de los FISH, observando que no hubo diferencias en la expresión de las proteínas con el tag-myc (**Figura 6B**, panel derecho). Estos resultados sugieren que el ARNm se asocia preferentemente a CBP80 en el citoplasma de células HeLa.

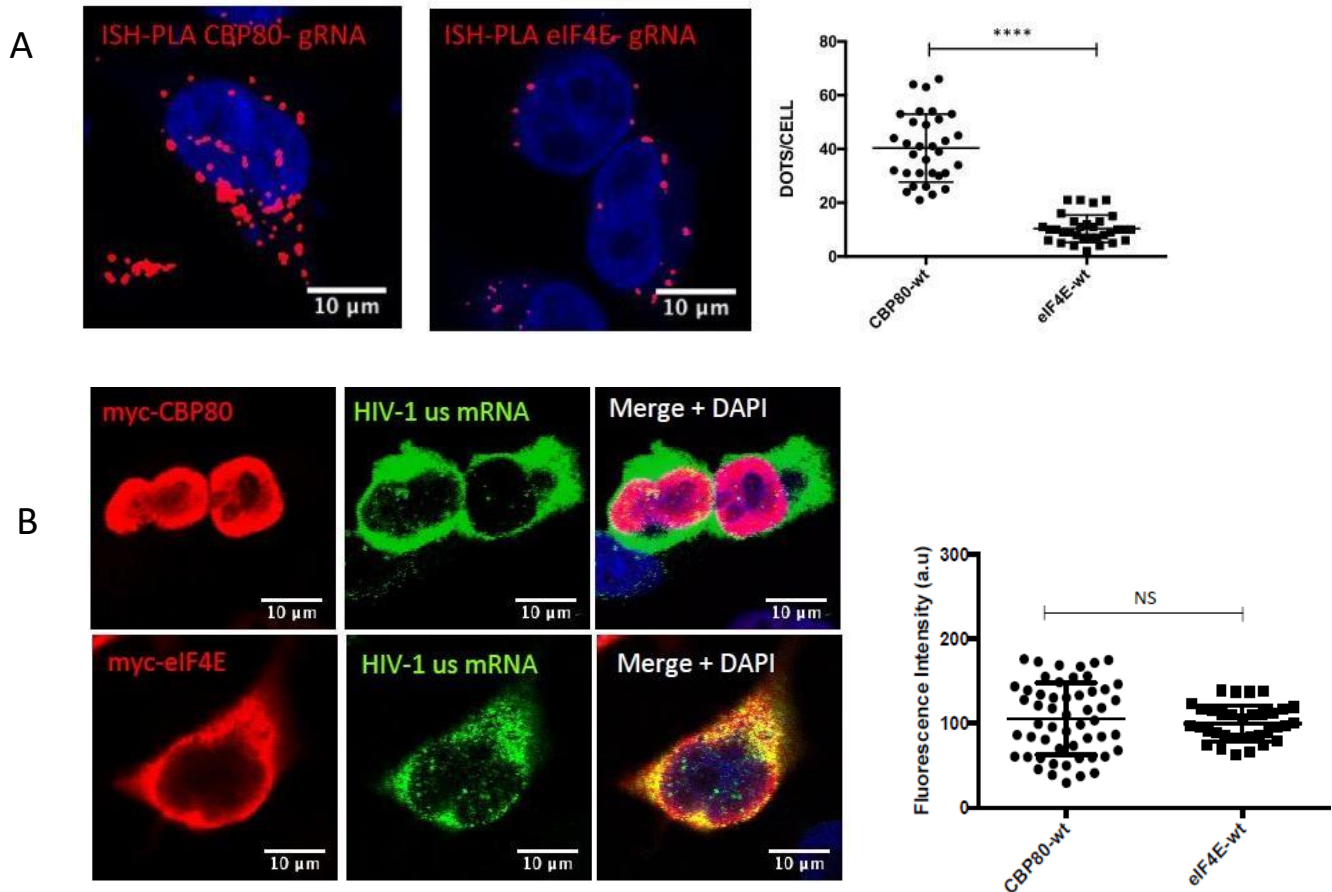


Figura 6: El ARN mensajero completo interactúa con la subunidad CBP80 del CBC en células HeLa. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g del vector pNL4.3 *wild type* junto a 1 μ g del vector pCMV-myc-CBP80 o pCMV-myc-eIF4E. 24 horas post-transfección, la interacción entre el ARNm y las proteínas con la etiqueta myc fueron analizadas mediante ISH-PLA. Los puntos rojos indican interacción entre el ARNm y la proteína correspondiente. Escala de la barra 10 μ m. La cuantificación de los puntos por célula en cada condición se presenta a la derecha (**** P <0.0001, test Mann-Whitney). (B) FISH y los análisis con microscopía confocal se realizaron en paralelo a los ensayos de ISH-PLA mostrados en la Fig. 6A. Las proteínas

myc-eIF4E y myc-CBP80 fueron marcadas en rojo mientras que el ARNmc se marcó con verde. Escala de la barra 10 μm (panel izquierdo). La intensidad de fluorescencia de los canales rojos de las expresiones de las proteínas con tag-myc fueron cuantificadas y graficadas (NS, no significativo, test Mann-Whitney) (panel derecho).}

4.1.2 Impacto de la sobre expresión de CBP80 y eIF4E en la expresión del ARNmc dependiente de Rev

Para estudiar el rol de CBP80 y eIF4E sobre la expresión génica del ARNmc, células HeLa fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3R (el cual expresa la proteína de fusión Gag-Renilla) en conjunto con los vectores pCMV-myc-CBP80 o pCMV-myc-eIF4E. A las 24 horas post transfección se analizó la síntesis de Gag, se cuantificó los niveles de ARNmc presente en el citoplasma y finalmente se determinó la eficiencia de traducción. Consistente con el resultado anterior, observamos que la sobre expresión de CBP80, pero no así la sobre expresión de eIF4E, incrementa la síntesis de Gag en un efecto asociado a un aumento en los niveles de ARNmc que se encuentran en citoplasma y a un aumento en la eficiencia traduccional (**Figura 7A**).

Como se ha mencionado, la proteína viral Rev es el regulador principal en la expresión del ARNmc, por lo que quisimos determinar el rol de Rev en el efecto observado al sobreexpresar CBP80. Para esto, utilizamos un vector proviral pNL4.3R que posee una mutación sin sentido en el gen *rev* (pNL4.3R- Δ Rev o Δ Rev). Observamos que la sobreexpresión de CBP80 aumenta discretamente la síntesis de Gag (cerca de dos veces) en ausencia de Rev al ser comparado con el control, resultado similar cuando analizamos los niveles del ARNmc presente en el citoplasma y cuando calculamos la eficiencia de traducción (**Figura 7B**). Este resultado nos sugiere que el efecto de CBP80 depende en gran medida de la proteína viral Rev.

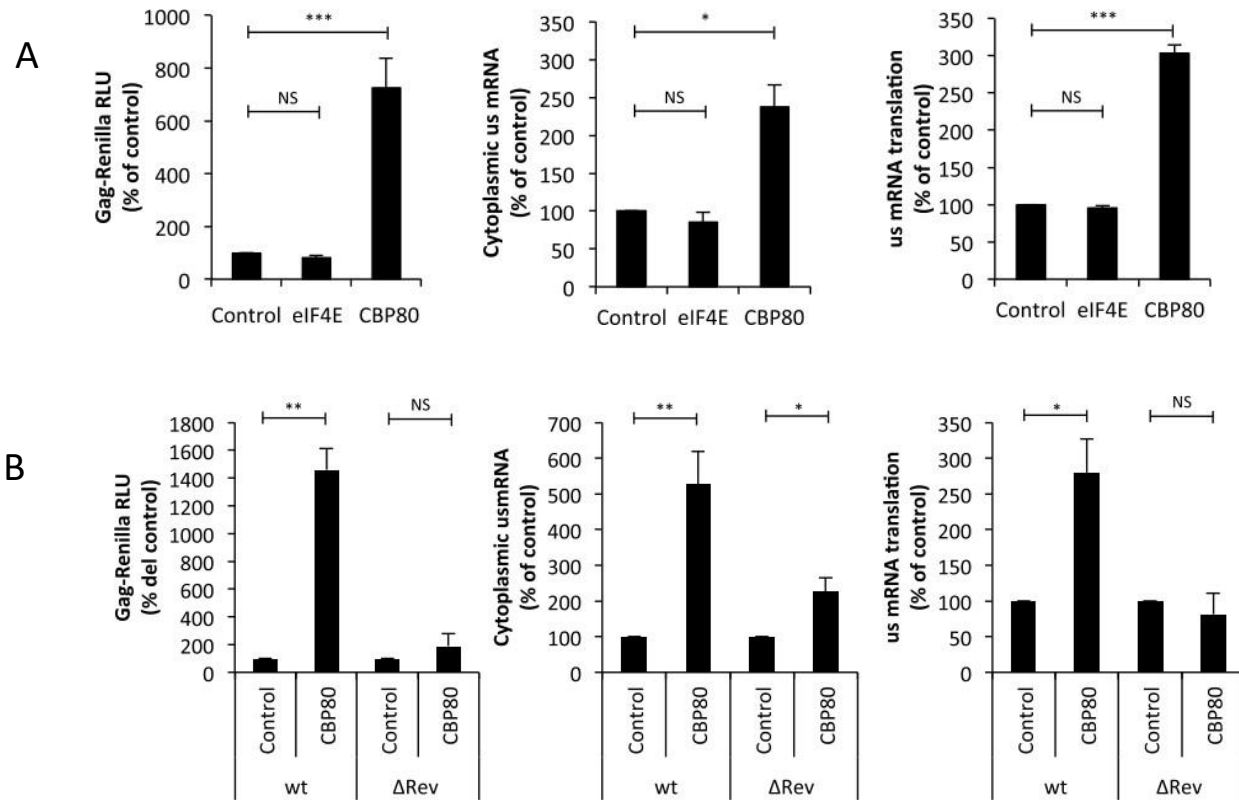


Figura 7: La proteína CBP80 requiere de la proteína viral Rev para promover la síntesis de Gag: (A) Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μ g del vector pNL4.3R o del vector pNL4.3R Δ Rev más 1 μ g del vector pCMV-myc-CBP80 o pCMV-myc-eIF4E (pCMV-myc-d2EGFP fue usado como control). 24 horas post transfección, el extracto celular fue preparado para medir la actividad Gag-Renilla (panel izquierdo) y se realizó una extracción de ARN citoplasmático el cual fue cuantificado mediante un RT- qPCR (panel central). La eficiencia de traducción (panel derecho) se realizó mediante una razón entre la actividad Gag-Renilla y el ARNmc presente en el citoplasma. Los resultados fueron normalizados con respecto al provirus *wild type* para la condición *wild type* y normalizados con provirus Δ Rev para la condición Δ Rev (considerado como 100%) y se presenta el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. ($P^* < 0.05$, $***P < 0.001$ y NS, no significativo, t-test). (B) Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μ g del vector pNL4.3R o del vector pNL4.3R- Δ Rev más pCMV-myc-CBP80 (pCMV-myc-d2EGFP fue usado como control). 24 horas post-transfección, el extracto celular fue utilizado para para medir la actividad Gag-Renilla (panel izquierdo) y se realizó una extracción de ARN citoplasmático el cual fue cuantificado mediante un RT- qPCR (panel central). La eficiencia de traducción (panel derecho) se realizó mediante una razón entre la actividad Gag-Renilla y el ARNmc presente en el citoplasma. Los resultados fueron normalizados con respecto al provirus *wild type* para condición *wild type* y normalizados con provirus Δ Rev para la condición Δ Rev (considerado como 100%) y se presenta el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. ($P^* < 0.05$, $**P < 0.01$ y NS, no significativo, t-test).

4.1.3 Rev se asocia con CBP80 en células HeLa

Considerando un reporte en el que se demostró que CBP80 interactúa con Rev *in vitro* (Taniguchi et al., 2014), además de los resultados ya mencionados, nos preguntamos si existe asociación entre las proteínas CBP80 y Rev en células. De esta manera es que realizamos un ensayo de PLA, en la cual se observará la presencia de puntos rojos cuando dos proteínas estén próximas.

Para este ensayo utilizamos los vectores pCDNA-Flag-Rev y pCDNA-V5-CBP8 y logramos observar la presencia de puntos rojos en el núcleo de las células mediante microscopia confocal, lo que nos indica que existe una cercanía entre las proteínas Rev y CBP80 (**Figura 8**). En conjunto, los resultados obtenidos nos sugieren que el ARNmc se asocia en mayor medida a la subunidad CBP80 del CBC que al factor eIF4E, además CBP80 ejerce un efecto positivo en la síntesis de Gag ya que facilita la exportación nuclear del ARNmc, dejándolo disponible en el citoplasma para su asociación con la maquinaria de traducción.

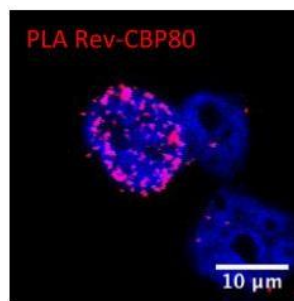
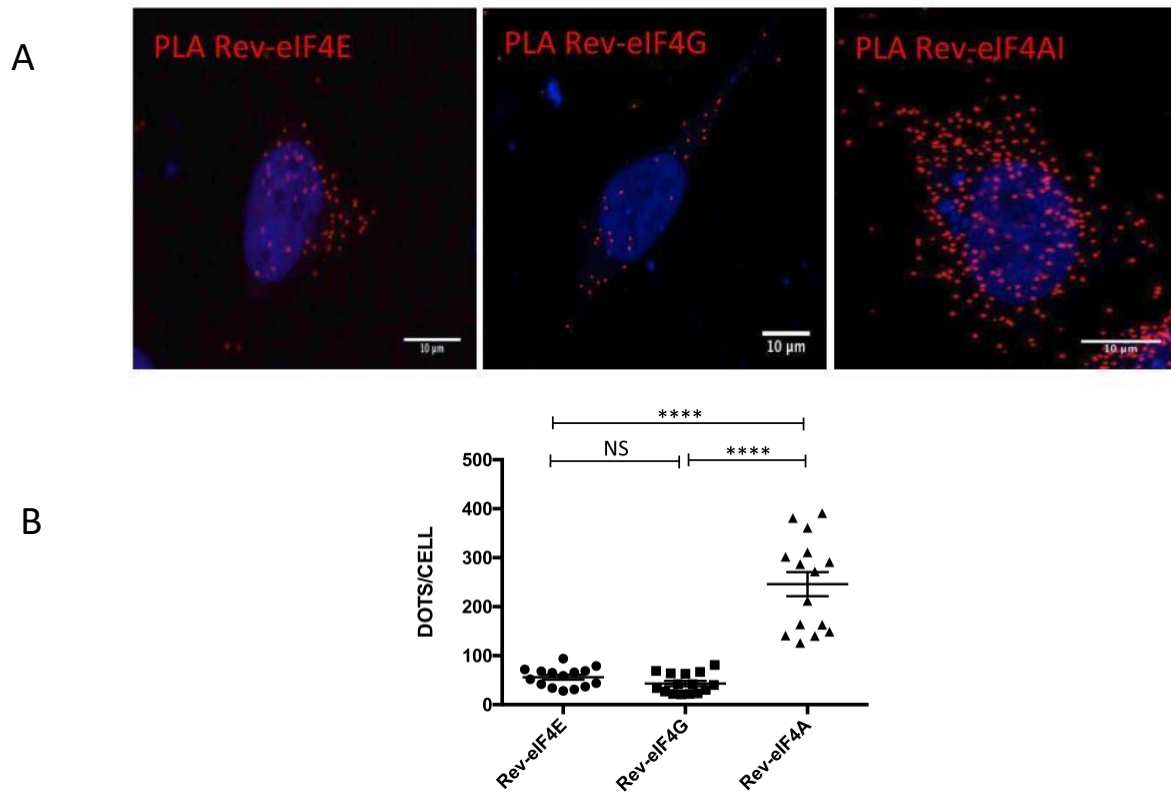


Figura 8: La subunidad CBP80 del CBC interactúa con la proteína viral Rev en células HeLa. Células HeLa fueron transfectadas con 1 μg de vector pCDNA-Flag-Rev y 1 μg de pCDNA-V5-CBP80. 24 horas post transfección la interacción entre Flag-Rev y V5-CBP80 fue analizada por PLA. Puntos rojos indican interacción entre ambas proteínas. Escala de la barra 10 μm.

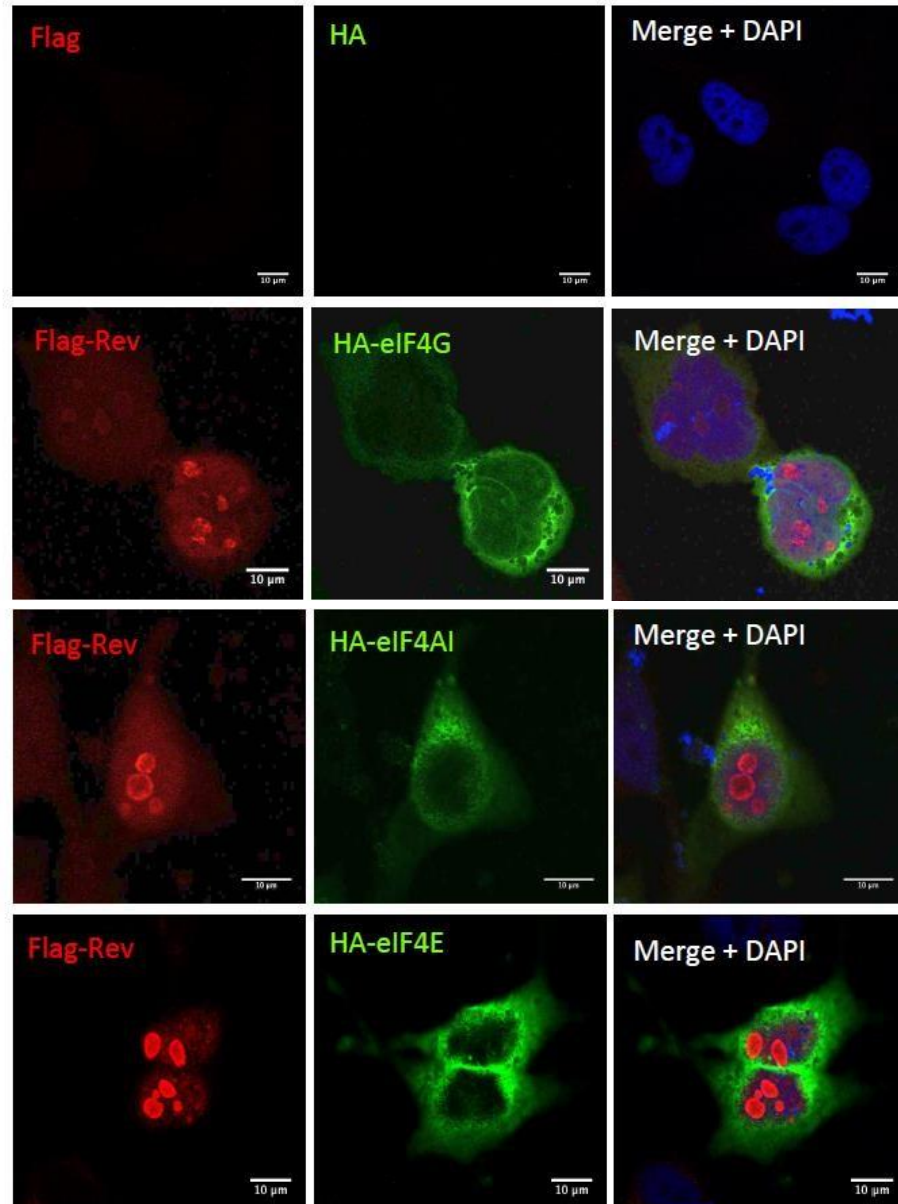
4.1.4 La helicasa de ARN eIF4AI interactúa con la proteína viral Rev y promueve la síntesis de Gag desde el ARNmc

Como determinamos que el ARNmc se asocia a la proteína CBP80 y que además esta proteína interactúa con Rev, nos preguntamos si otros factores de inicio de traducción también estarían asociándose con Rev para promover la síntesis de Gag. Si bien, se ha demostrado que el factor de inicio de traducción dependiente del CBC (CTIF), es un elemento importante para la traducción CBC-dependiente, resultados de nuestro laboratorio mostraron que CTIF tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de Gag (García-de-Gracia et al., 2020).

Por esto, nos preguntamos si Rev y CBP80 forman un mRNP diferente al CBC canónico. Como demostramos que eIF4E no ejerce un efecto en la traducción del ARNmc, nos preguntamos si los otros componentes del complejo eIF4F (eIF4GI y eIF4AI), se asocian a Rev. Para esto, utilizamos vectores para la expresión de los factores de inicio de traducción en conjunto al vector Flag-Rev para ver interacción mediante PLA. Podemos apreciar que Rev se asocia mayoritariamente con eIF4AI y de forma muy marginal con eIF4E y eIF4GI (**Figura 9A y B**). Análisis de inmunofluorescencia indirecta realizados en paralelo muestran que no hay diferencia en las intensidades de las señales de las proteínas eIFs con el tag HA y la proteína Flag-Rev, lo que sugiere que el aumento de las interacciones entre eIF4AI y Rev no se debió a diferencias en los niveles de la expresión ectópicas de las proteínas (**Figura 9C y D**). Estos resultados sugieren que la proteína viral Rev recluta a eIF4AI al ARNmc para promover la síntesis de Gag a partir de este transcrito.



C



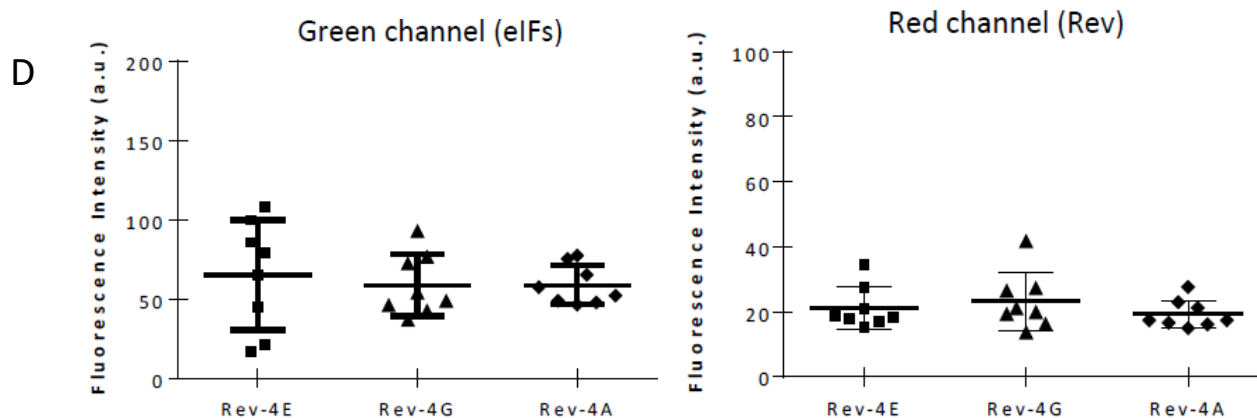


Figura 9: La proteína viral Rev recluta a la helicasa de ARN eIF4AI hacia el ARN mensajero completo para promover la síntesis de Gag. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g pCDNA-Flag-Rev más 1 μ g del vector pCIneo-HA-eIF4AE, pCIneo-HA-eIF4AG o pCIneo-HA-eIF4AI. 24 horas post transfección la interacción entre las etiquetas Flag y HA de cada proteína fue analizada por PLA. Los puntos rojos indican interacción entre Flag-Rev y las distintas proteínas con tag HA. Escala de la barra 10 μ m. (B) Puntos/célula de Rev-4E, Rev-4G y Rev-4A, fueron cuantificados usando Image J (****P<0.0001, test Mann-Whitney). (C) Células HeLa sin transfectar (panel superior) o transfectadas con 1 μ g de Flag-Rev y 1 μ g de HA-eIF4G, HA-eIF4AI o HA-eIF4E. A las 24 horas-post transfección, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas, para Flag (rojo) y HA (verde). Imágenes fueron obtenidas por microscopia confocal como se describe en materiales y métodos. Escala de la barra 10 μ m. (D) La intensidad de fluorescencia de los canales verde y rojos de las expresiones de las proteínas fueron cuantificadas y graficadas.

4.1.5 La helicasa de ARN eIF4AI promueve la exportación nuclear del ARNmc

Con los resultados obtenidos en el punto anterior y considerando el rol fundamental de eIF4A en el inicio de la traducción (Merrick, 2015; Pelletier and Sonenberg, 2019), decidimos sobreexpresar esta proteína para determinar su efecto en la síntesis de Gag y los niveles del ARNmc en condiciones de presencia y ausencia de Rev (**Figura 10**). De manera interesante, observamos que la sobreexpresión de eIF4AI aumenta aproximadamente dos veces la síntesis de Gag cuando usamos el provirus silvestre (*wild type*) y cerca de cinco veces en la condición Δ Rev (panel izquierdo). Al analizar los niveles de ARNmc en el citoplasma, observamos que en el provirus silvestre hay un aumento de dos a tres veces comparado con el control, mientras que en la condición Δ Rev no se observan cambios significativos al ser comparado con el control (panel central).

Estos datos sugieren que la presencia de Rev podría determinar el proceso (exportación o traducción) por el cual eIF4AI promueve la síntesis de Gag.

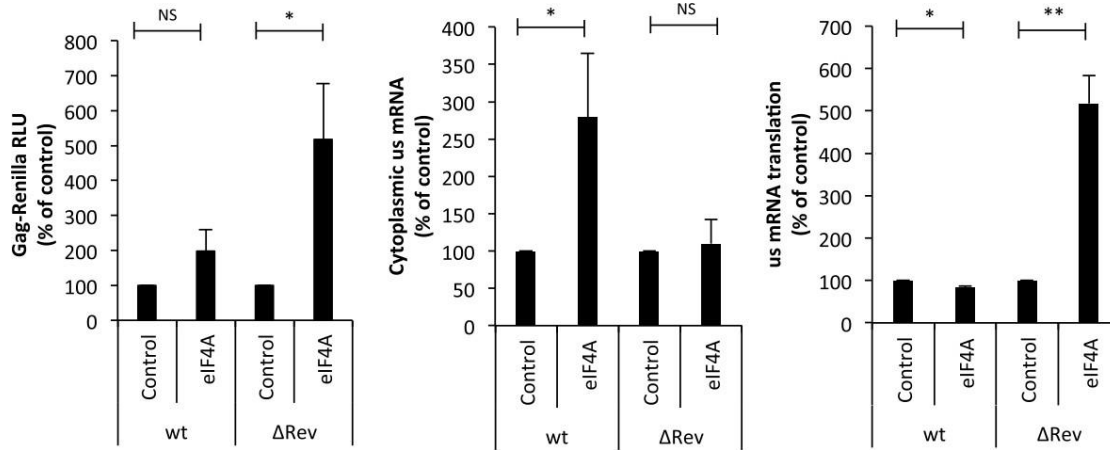


Figura 10: La proteína Rev modula la función de eIF4AI sobre el ARN mensajero completo. Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μ g del vector pNL4.3R-*wild type* o pNL4.3R- Δ Rev junto con 1 μ g del vector pCIneo-HA-eIF4AI (pCIneo-HA-d2EGFP fue usado como control). 24 horas post transfección, el extracto celular fue preparado para medir la actividad Gag-Renilla (panel izquierdo) y se realizó una extracción de ARN citoplasmático el cual fue cuantificado mediante un RT-qPCR (panel central). La eficiencia de traducción (panel derecho) se realizó mediante una razón entre la actividad Gag-Renilla y el ARNmc presente en el citoplasma. Los resultados fueron normalizados con respecto a cada uno de los controles (considerado como 100%) y se presenta el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y NS, no significativo, t- test).

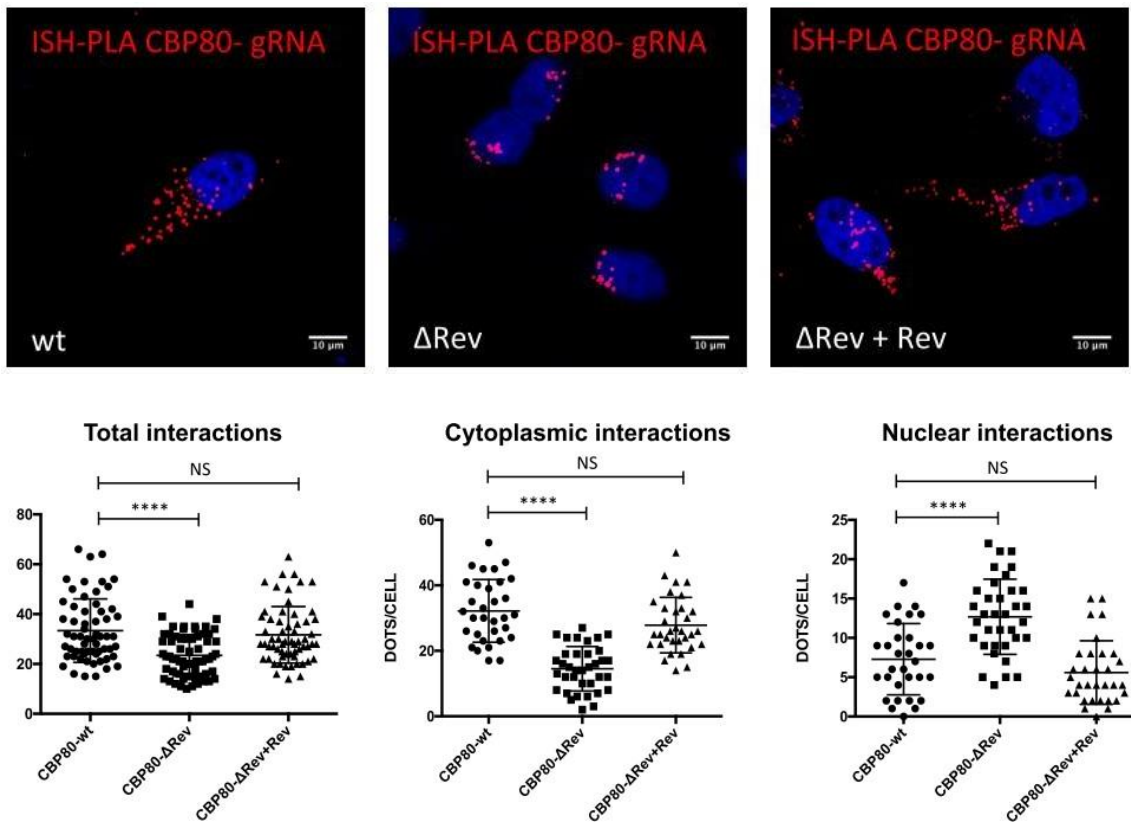
4.1.6 La proteína viral Rev regula la asociación de CBP80 y eIF4AI hacia el ARNmc

Tomando en cuenta que Rev interactúa con las proteínas celulares CBP80 y eIF4AI, modulando su actividad en la síntesis de Gag nos preguntamos si Rev, además, participa en el reclutamiento de estas proteínas hacia el ARNmc. Para esto utilizamos la técnica de ISH-PLA previamente descrita y cuantificamos la interacción entre el ARNmc y CBP80 o eIF4AI en condiciones de presencia y ausencia de Rev. Observamos que en ausencia de Rev la interacción entre CBP80 y el ARNmc disminuye, sin embargo, cuando restablecemos la expresión de Rev en *trans*, vemos que Rev favorece o estabiliza la asociación entre CBP80 y el ARNmc (**Figura 11A**, panel derecho).

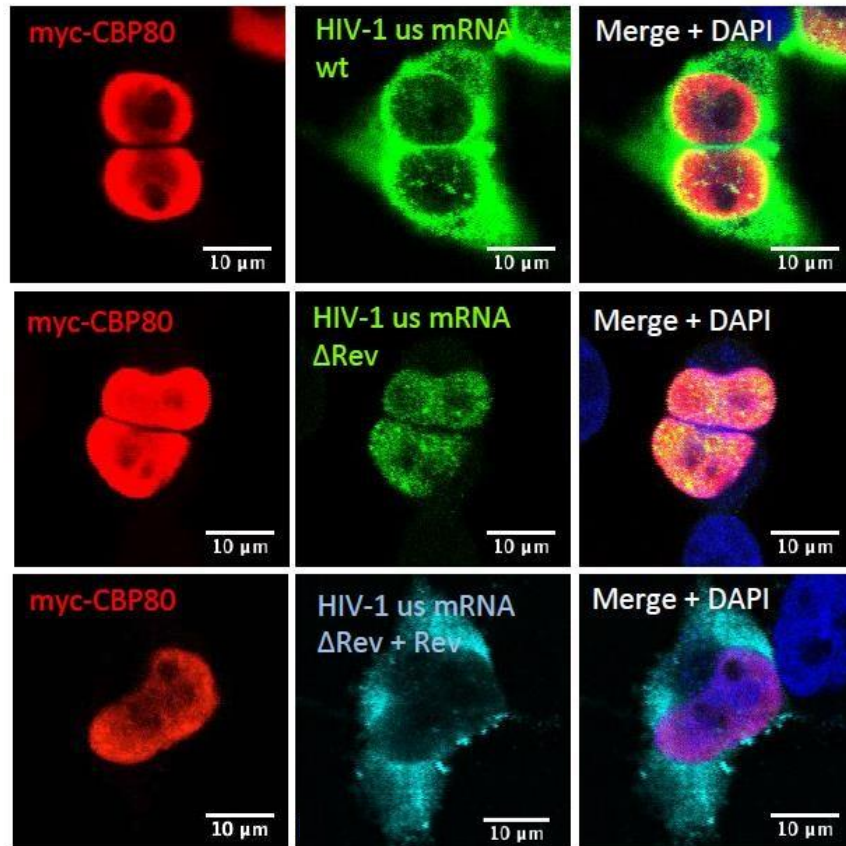
El análisis de la señal nuclear y citoplasmática revela que Rev es necesaria para mantener la interacción entre CBP80 y ARNmc en el citoplasma (**Figura 11A**, comparar panel central con panel derecho). En paralelo del ISH-PLA, se realizaron ensayos de FISH-IF en los cuales se analizó la intensidad de fluorescencia roja revelando que no hay diferencias en la expresión de CBP80 en cada una de las condiciones (**Figura 11B y C**).

También observamos que la interacción entre eIF4A1 y el ARNmc disminuye en ausencia de Rev y esta interacción se reestablece una vez que Rev es expresada en *trans* (**Figura 11D**, panel izquierdo). Sorpresivamente, nos percatamos que la mayoría de las interacciones entre eIF4A1 y el ARNmc que ocurren en el citoplasma son independientes de Rev, mientras que las interacciones nucleares estarían favorecidas por Rev (**Figura 11D**, panel central y derecho). Los ensayos de FISH-IF realizados en paralelo demuestran que no hay diferencias en la expresión de eIF4A1 en cada una de las condiciones (**Figura 11E y F**). Estos resultados son consistentes con lo observado en la Figura 9E, en que la expresión de eIF4A1 en presencia de Rev favorece la acumulación del ARNmc en el citoplasma. Además, observamos un aumento en la señal nuclear de HA-eIF4A1 con el virus silvestre en comparación a la condición con el virus Δ Rev, sugiriendo que una fracción de eIF4A1 es traslocada al núcleo en presencia de Rev (**Figura 11E y G**). Todos estos resultados nos indican que Rev regula la asociación entre CBP80 y eIF4A con el ARNmc en el citoplasma y en el núcleo, respectivamente.

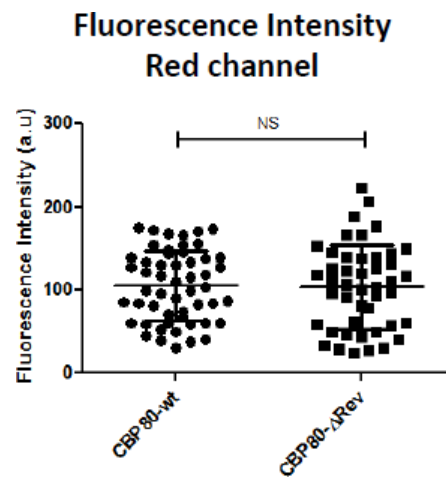
A



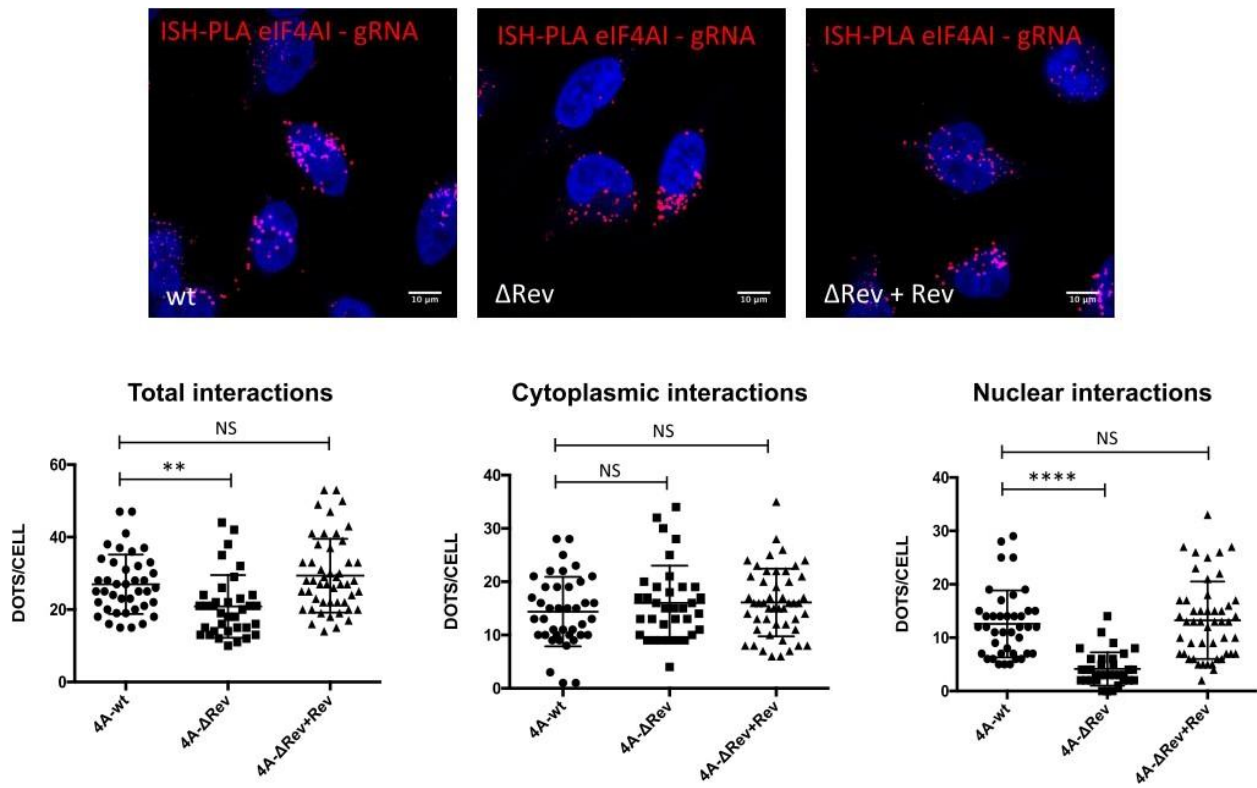
B



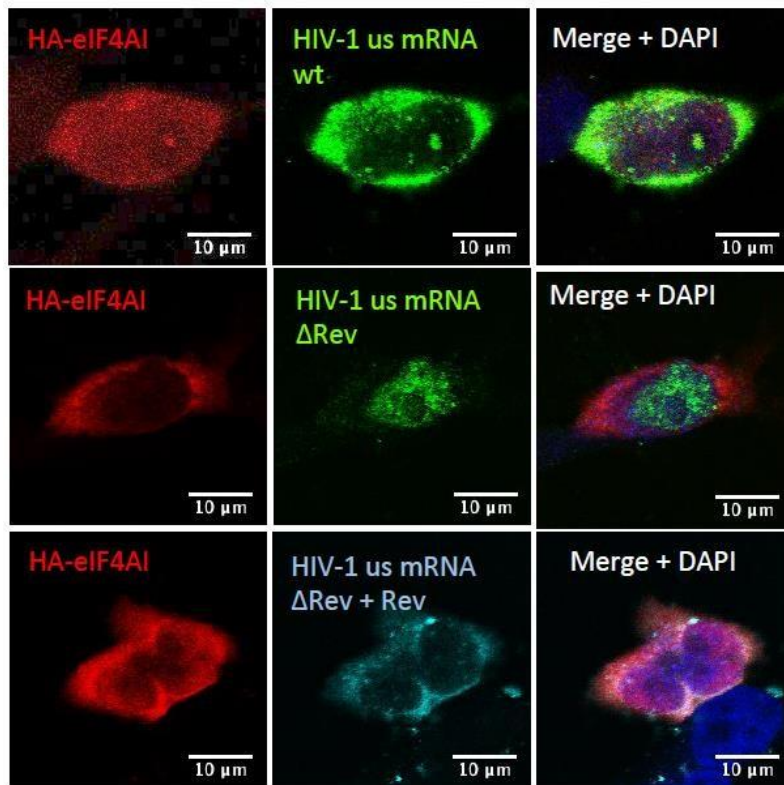
C



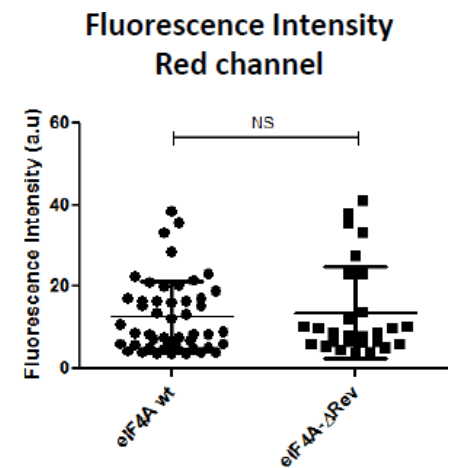
D



E



F



G

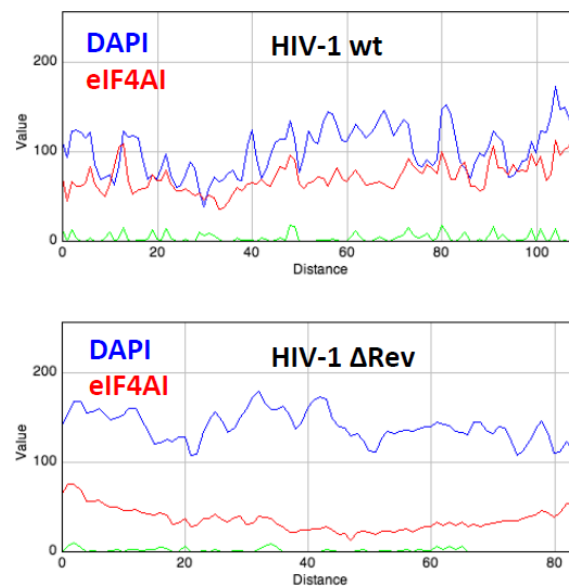


Figura 11: Rev promueve el reclutamiento de CBP80 y eIF4A1 hacia el ARNm. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g del vector pNL4.3-*wild type*, 1 μ g de pNL4.3- Δ Rev o 1 μ g de pNL4.3- Δ Rev + 0.3 μ g de CDNA-Flag-Rev junto a 1 μ g de pCMV-myc-CBP80. 24 horas post transfección se analizó la interacción entre CBP80 y el ARNm mediante ISH-PLA. Escala de la barra 10 μ m (panel superior). Cuantificación de puntos por célula de interacciones ARNm-CBP80 totales (panel izquierdo), interacciones citoplasmáticas (panel central) e interacciones nucleares (panel derecho) se presentan abajo.

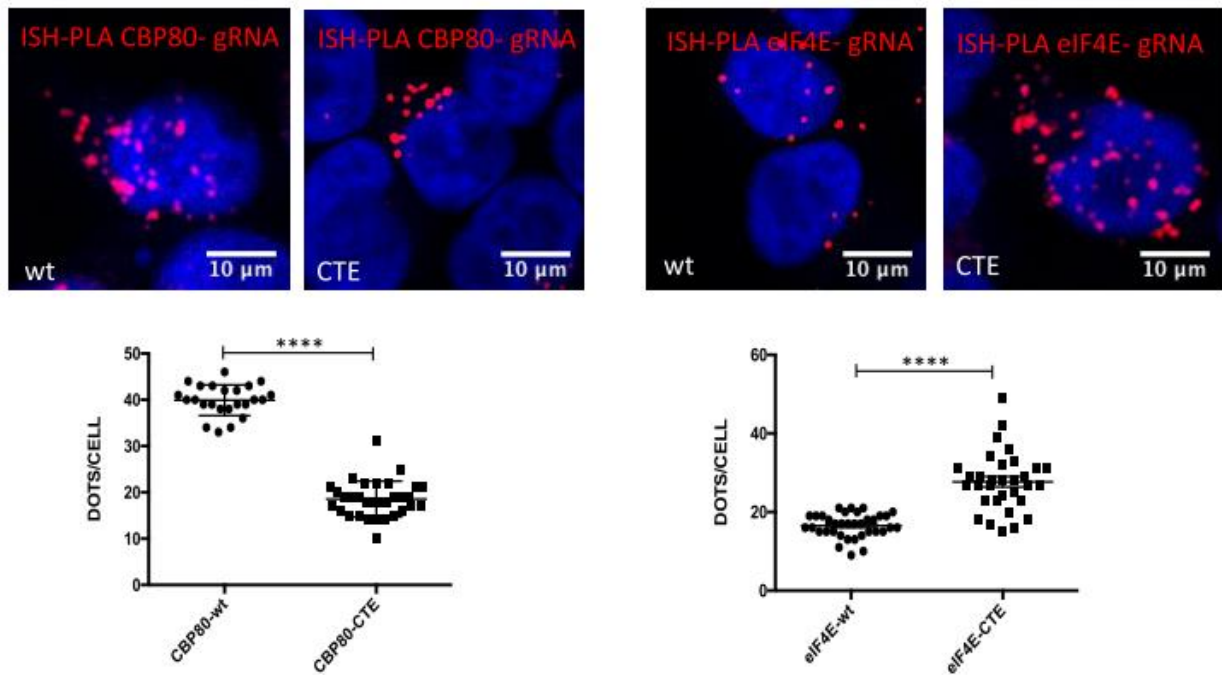
Todas las interacciones fueron cuantificadas usando Image J (**** $p < 0.0001$ y NS, no significativo, test Mann-Whitney) (panel inferior). (B) FISH y los análisis con microscopia confocal se realizaron en paralelo a los ensayos de ISH-PLA mostrados en la Fig. 8A. La proteína myc-CBP80 se marcó en rojo y el ARNmc se marcó con color verde. Escala de la barra 10 μm . (C) La intensidad de la fluorescencia del canal rojo de la expresión de la proteína myc-CBP80 fue cuantificada y graficada (NS, no significativo, test Mann-Whitney). (D). Células HeLa fueron transfectadas con 1 μg del vector pNL4.3-wt, 1 μg de pNL4.3- ΔRev o 1 μg de pNL4.3- ΔRev + 1 μg de CDNA-Flag-Rev junto a 1 μg de pCIneo-HA-eIF4AI. 24 horas post transfección se analizó la interacción entre eIF4AI y el ARNmc mediante ISH-PLA. Escala de barra 10 μm (panel superior). Cuantificación de puntos por célula de interacciones ARNmc-eIF4AI totales (panel izquierdo), interacciones citoplasmáticas (panel central) e interacciones nucleares (panel derecho) se presentan abajo. Todas las interacciones fueron cuantificadas usando Image J (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ y NS, no significativo, test Mann-Whitney) (panel inferior). (E) FISH y los análisis de microscopia confocal se realizaron en paralelo a los ensayos de ISH-PLA mostrados en la Fig. 8D. La proteína HA-eIF4AI se marcó con rojo y el ARNmc se marcó con verde. Escala de la barra 10 μm . (F) La intensidad de la fluorescencia del canal rojo de la expresión de proteína HA-eIF4AI fue cuantificada y graficada (NS, no significativo, test Mann-Whitney). (G) La intensidad de los gráficos obtenidos desde la señal nuclear de eIF4AI (línea en rojo) y DAPI (línea en azul) en presencia de VIH-1 *wild type* (panel superior) y VIH-1 ΔRev (panel inferior).

4.1.7 El eje Rev/RRE favorece el reclutamiento del complejo CBP80-eIF4AI hacia el ARNmc.

Basándonos en nuestros resultados que indican que Rev recluta a las proteínas CBP80 y eIF4AI hacia el ARNmc para promover la síntesis de Gag, más los antecedentes en que Rev interactúa con la estructura RRE para facilitar la exportación del ARNmc, quisimos analizar si esta asociación Rev/RRE era importante para el reclutamiento de CBP80 y eIF4AI al ARNmc. Para realizar esto, utilizamos el vector pNL4.3-CTE, el cual genera un ARNmc que contiene mutaciones que irrumpen el eje Rev/RRE, sin embargo, el ARNmc puede ser exportado mediante el Elemento de Transporte Constitutivo (CTE) del virus de simio Manson-Pfizer a través de la vía NXF1 (Zolotukhin et al., 1994). Observamos que el ARNmc sintetizado desde el provirus silvestre se asocia preferencialmente con CBP80, mientras que el ARNmc se asocia a eIF4E cuando es exportado por el eje CTE/NXF1 (**Figura 12A**). Además, observamos que el ARNmc se asocia de manera más eficiente a eIF4AI cuando es exportado a través del eje Rev/RRE (**Figura 12B**). Estos resultados indican que el eje Rev/RRE es necesario para la asociación de CBP80 y eIF4AI con el ARNmc. De tal modo, empleamos la técnica de PLA para analizar si el eje Rev/RRE está involucrado en la interacción entre las proteínas CBP80 y eIF4AI.

Observamos que la interacción entre CBP80 y eIF4AI es mayor en presencia del provirus *wild type* con respecto al provirus que contiene el CTE (**Figura 12C**). Considerando que Rev se asocia con CBP80 y eIF4AI, finalmente determinamos si Rev favorece la interacción entre las proteínas CBP80 y eIF4AI. Para ello, realizamos PLA en condiciones de presencia y ausencia de Rev, observando que la proteína viral favorece la interacción entre ambas proteínas celulares (**Figura 12D**). Estos resultados sugieren que el eje Rev/RRE favorece la formación de un complejo CBP80-eIF4AI y el reclutamiento de este al ARNmc.

A



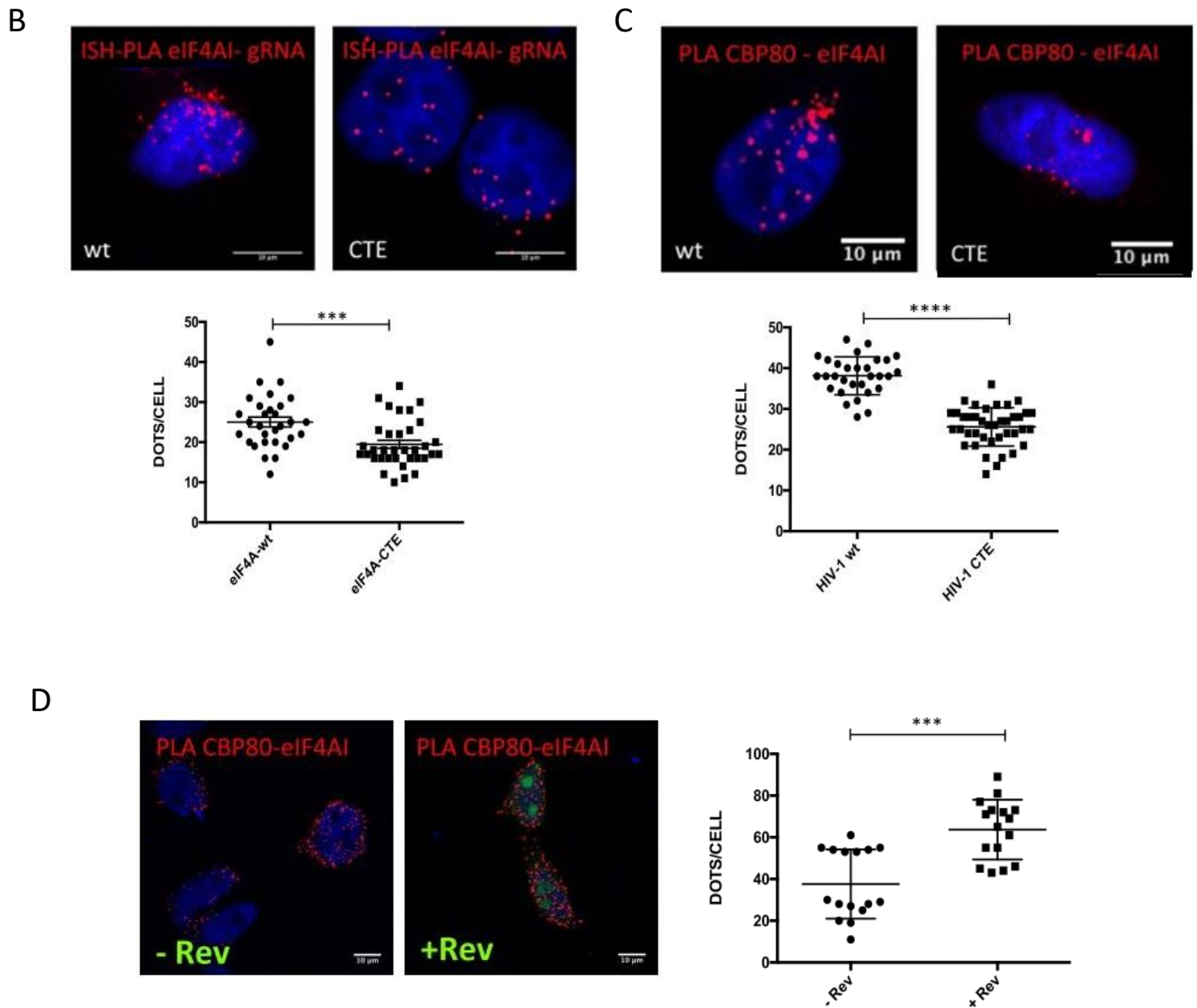


Figura 12: El eje Rev/RRE favorece el reclutamiento de las proteínas CBP80 y eIF4AI hacia el ARNm. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g del vector pNL4.3-*wild type* o 1 μ g de pNL4.3-CTE más 1 μ g de pCMV-myc-CBP80 o de pCMV-myc-eIF4E. 24 horas post transfección la interacción entre el ARNm y CBP80 o eIF4E fue analizada por ISH-PLA. Escala de barra 10 μ m (panel superior). Cuantificación de puntos por célula de interacciones ARNm-CBP80 o ARNm-eIF4E se presentan abajo. Todas las interacciones fueron cuantificadas usando Image J (**** $p < 0.0001$, test Mann-Whitney). (B) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g del vector pNL4.3-wt o 1 μ g de pNL4.3-CTE más 1 μ g de pCIneo-HA-eIF4AI. 24 horas post transfección la interacción entre el ARNm y eIF4AI fue analizada por ISH-PLA. Escala de barra 10 μ m (panel superior). Cuantificación de puntos por célula de interacciones ARNm-eIF4AI se presentan abajo. Todas las interacciones fueron cuantificadas usando Image J (** $p < 0.001$ y NS, no significativo, test Mann-Whitney). (C) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g del vector pNL4.3-wt o 1 μ g de pNL4.3-CTE más 1 μ g de pCMV-myc-CBP80 y 1 μ g de pCIneo-HA-eIF4AI. 24 horas post transfección la interacción entre HA-eIF4AI y myc-CBP80 fue analizada por PLA (panel superior). Escala de barra 10 μ m. Cuantificación de puntos por célula de interacciones de eIF4AI y CBP80 fueron cuantificadas usando Image J (**** $p < 0.0001$, test Mann-Whitney). (D) Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g de pCMV-myc-CBP80 y 1 μ g de pCIneo-HA-eIF4AI junto a 1 μ g de pEGFP-Rev (pEGFP fue usado como control). 24 horas post transfección la interacción entre HA-eIF4AI y myc-CBP80 fue analizada por PLA (panel izquierdo). Escala de barra 10 μ m. Cuantificación de puntos por célula de interacciones entre eIF4AI y CBP80 fueron cuantificadas usando Image J (*** $p < 0.001$, test Mann-Whitney).

4.2 Objetivo específico 2: “Estudiar y caracterizar la interacción entre Rev y eIF4AIII”

4.2.1 La helicasa de ARN eIF4AIII favorece la síntesis de Gag.

Dos estudios proteómicos han evidenciado que uno de los componentes del EJC, la helicasa de ARN eIF4AIII, formaría parte del mRNP del ARNmc (Knoener et al., 2017; Milev et al., 2012). Aunque el reclutamiento de eIF4AIII al ARNmc no ha sido validado experimentalmente, estos antecedentes llaman altamente la atención puesto que esta proteína es reclutada a los ARNm celulares de forma dependiente del proceso del corte y empalme (Shibuya et al., 2004). Considerando que eIF4AIII es reclutada al ARNmc más los antecedentes que indican que la proteína viral Rev recluta a las proteínas celulares CBP80 y eIF4AII hacia el ARNmc para promover la síntesis de Gag, nos preguntamos si eIF4AIII participa en la síntesis de Gag y si Rev es la responsable de reclutar a eIF4AIII al ARNmc. En primer lugar, nos enfocamos en estudiar si algunos componentes del EJC como eIF4AIII, Y14 y PYM eran reclutados al ARNmc. Por este motivo, células HeLa fueron transfectadas con los vectores pCIneo-HA-eIF4AIII, pCIneo-HA-Y14 o pCIneo-HA-PYM más el vector pNL4.3 y posteriormente se realizó un ensayo de FISH-IF (**Figura 13**). Los resultados obtenidos, nos indican que el heterodímero compuesto por las proteínas Y14-MAGOH y PYM no colocalizan con el ARNmc, indicando que no habría una asociación entre estos componentes del EJC con el transcrito viral. Sin embargo, observamos que la helicasa eIF4AIII colocaliza con el ARNmc, lo que nos sugiere que estarían formando parte de un mismo complejo.

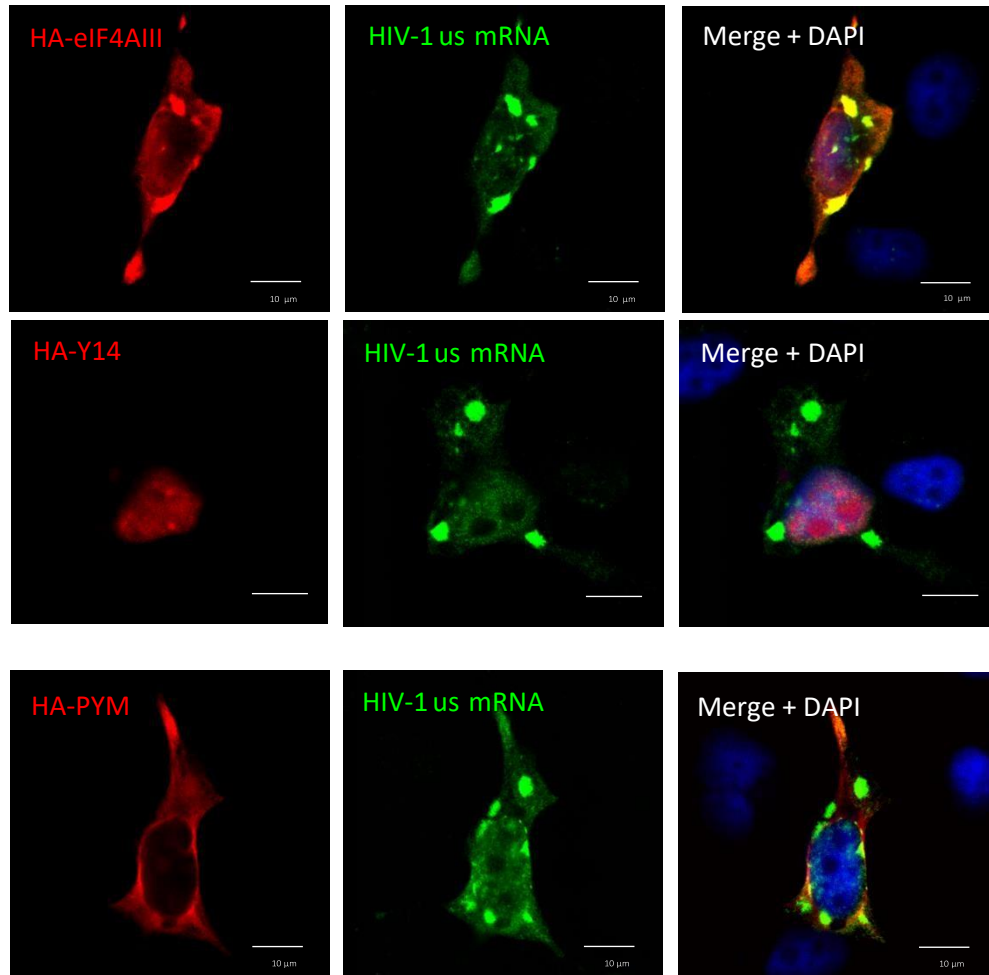
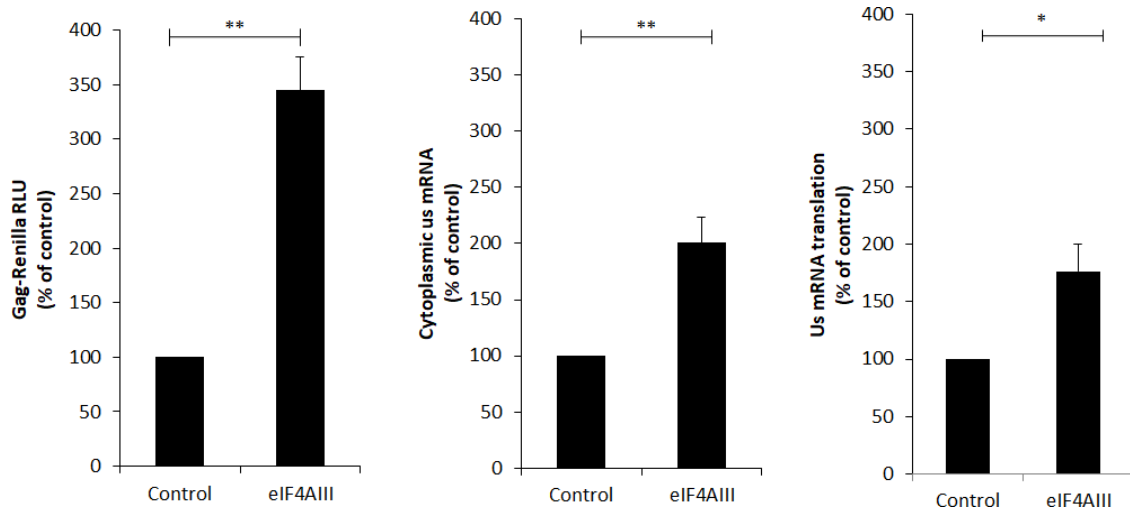


Figura 13: La helicasa de ARN eIF4AIII del EJC colocaliza con el ARNmc. Células HeLa fueron transfectadas con 0.5 µg del vector pNL4.3 más 0.5 µg de los vectores pCIneo-HA-eIF4AIII, pCIneo-HA-Y14 o pCIneo-HA-PYM. 24 horas post-transfección se realizó ensayo de FISH. Las proteínas con tag HA se marcaron en rojo y el ARNmc se marcó en verde. Escala de la barra 10 µm.

Conociendo que sólo eIF4AIII colocaliza con el ARNmc formando parte de un mismo complejo, analizamos la sobreexpresión de esta helicasa para determinar el efecto en la síntesis de Gag y en los niveles del ARNmc en el citoplasma (**Figura 14A**). Los resultados nos señalan que la sobreexpresión de eIF4AIII aumenta la síntesis de Gag cerca de tres veces comparado con el control (panel izquierdo).

Observamos que hay un aumento de dos veces en la acumulación citoplasmática del ARN_{mc} cuando se sobreexpresa eIF4AIII cuando es comparado con el control (panel central) lo que también sugiere un leve aumento en la eficiencia de traducción del ARN viral en estas condiciones. Estos resultados sugieren que eIF4AIII tiene un efecto positivo sobre el ARN_{mc} ya que promueve la síntesis de Gag, principalmente aumentando la acumulación citoplásmica del ARN_{mc}. Con estos resultados, nos preguntamos si eIF4AIII necesita de la proteína viral Rev para favorecer la síntesis de Gag, por lo que realizamos un análisis similar utilizando el vector proviral pNL4.3R-ΔRev más el vector de expresión pCMV-3XFlag-eIF4AIII. Consistente con el experimento anterior, este ensayo mostró que la sobreexpresión de eIF4AIII aumenta la síntesis de Gag de dos a tres veces con el virus silvestre, sin embargo, este efecto se pierde en ausencia de Rev (**Figura 14B**). Todos estos resultados indican que eIF4AIII tiene un efecto positivo en la síntesis de Gag, probablemente durante la exportación nuclear del ARN_{mc} y, además, este efecto sería dependiente de Rev.

A



B

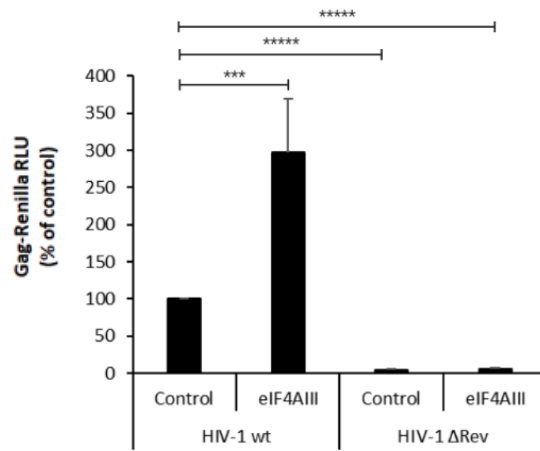


Figura 14: La proteína eIF4AIII coopera con Rev para promover la síntesis de Gag. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μ g del vector pNL4.3R más 1 μ g del vector pCMV-3XFlag-eIF4AIII (pCMV-3XFlag-EGFP fue usado como control). 24 horas post-transfección, el extracto celular fue preparado para medir la actividad Gag-Renilla (panel izquierdo) y se realizó una extracción de ARN citoplasmático el cual fue cuantificado mediante un RT- qPCR (panel central). La eficiencia de traducción (panel derecho) se realizó mediante una razón entre la actividad Gag-Renilla y el ARNm presente en el citoplasma. Los resultados fueron normalizados con el control (considerado 100%) y se presenta el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (* p <0.05 y ** p <0.01, t-test). (B) Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μ g del vector pNL4.3R (VIH-1 wt), o pNL4.3R- Δ Rev (VIH-1 Δ Rev) más 1 μ g del vector pCMV-3XFlag-eIF4AIII (pCMV-3XFlag-EGFP fue usado como control). 24 horas post transfección se determinó la actividad de la proteína fusión Gag-Renilla. Los resultados fueron normalizados contra el control (considerado como 100%) y se presenta el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. (** p <0.001; **** p <0.000001; t-test).

4.2.2. La proteína viral Rev favorece la asociación de eIF4AIII hacia el ARNmc

Con los resultados anteriores, nos preguntamos si Rev media la asociación entre eIF4AIII y el ARNmc. Para responder esta pregunta, expresamos la proteína 3x-Flag- eIF4AIII en células HeLa transfectando el vector pCMV-3XFlag-eIF4AIII en conjunto con el vector proviral pNL4.3 o pNL4.3ΔRev y realizamos una inmunoprecipitación de RNA (**Figura 15**). Como observamos, existe un mayor enriquecimiento del ARNmc inmunoprecipitado junto a eIF4AIII cuando Rev está presente. La asociación perdida entre el ARNmc y eIF4AIII en ausencia de Rev es recuperada cuando Rev es expresada en *trans* indicando que eIF4AIII se asocia al ARNmc y que la proteína viral Rev está involucrada en este proceso.

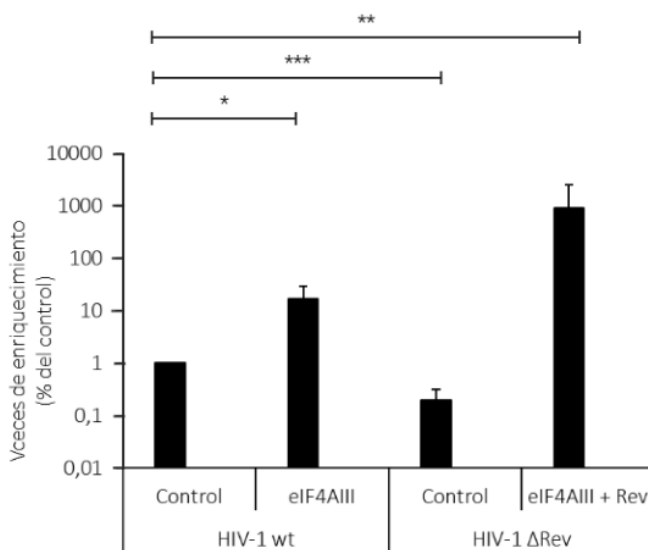


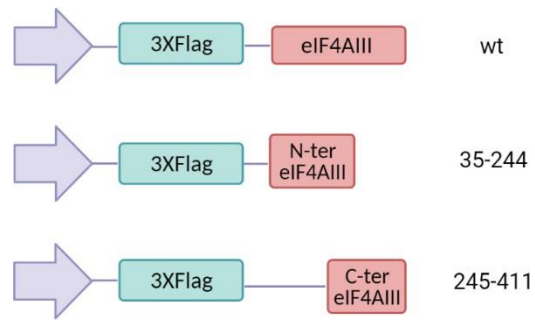
Figura 15: La proteína viral Rev contribuye a la asociación entre eIF4AIII y el ARNmc. Células HeLa fueron transfectadas con 0.3 μg del vector pNL4.3 wt (HIV-1 *wild type*) o pNL4.3ΔRev (HIV-1 ΔRev) más 1 μg de pCMV-3XFlag-eIF4AIII (pCMV-3XFlag-GFP usado como control) y 0.1 μg de pEGFP-Rev.c1 (pEGFP.c1 usado como control). 24 horas post transfección se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de ARN el cual fue cuantificado por medio de RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados contra el control (considerado como 100%) y se presenta el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. (*p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001; ttest)

4.2.3. La helicasa de ARN eIF4AIII se asocia a la proteína viral Rev a través de su dominio C-terminal

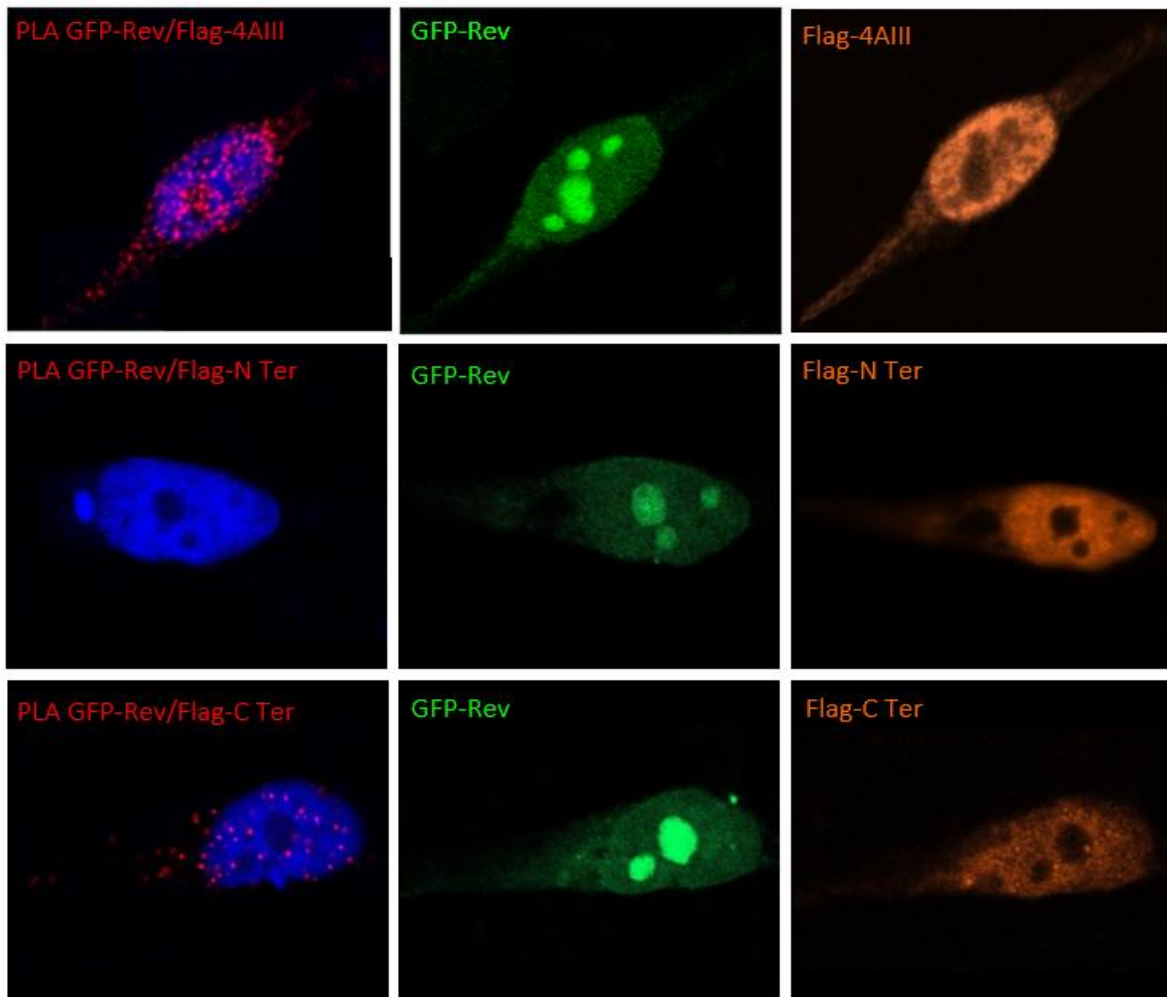
Los ensayos descritos indican que eIF4AIII favorece la síntesis de Gag en un proceso que involucra la proteína viral Rev, por este motivo nos preguntamos si eIF4AIII y Rev se asocian en células. Para responder esto, se realizó un ensayo de PLA y para esta ocasión utilizamos células HeLa las cuales fueron transfectadas con los vectores pCMV-3XFlag-eIF4AIII y pEGFP-Rev.C1 y 24 horas post transfección se realizó el ensayo de PLA. Además, a esta técnica se acopló un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para corroborar la correcta expresión de las proteínas en la misma muestra donde se analizó la interacción. Los resultados indican que existe una asociación entre las proteínas eIF4AIII y Rev (**Figura 16A y B**, panel superior). Adicionalmente, nos preguntamos si los dominios N-terminal o C-terminal de la helicasa de ARN están involucrados en esta asociación. Para ello, células HeLa fueron transfectadas con los vectores pEGFP-Rev.C1 junto a pCMV-3XFlag-eIF4AIII N-terminal (N-ter) o pCMV- 3XFlag-eIF4AIII C-terminal (C-ter) (**Figura 16A y B**). Observamos una pérdida total de la interacción con Flag-eIF4AIII-N-ter, lo cual indica que no habría asociación entre Rev y el dominio N-Terminal de eIF4AIII (Figura 16B, panel central e inferior). Los ensayos de IFI realizados sobre la misma muestra confirman que tanto EGFP-Rev como Flag-eIF4AIII-N-ter se expresan de forma correcta dentro de la célula, por lo cual que pérdida de puntos rojos ocurre únicamente porque no hay asociación entre Rev y el dominio N-terminal de eIF4AIII.

Por otro lado, al observar el resultado del PLA de EGFP-Rev con Flag-eIF4AIII-C-ter, nuevamente podemos observar presencia de puntos rojos distribuidos en la célula, aunque en menor proporción que con la proteína completa. Estos ensayos indican que el dominio C-terminal de la proteína eIF4AIII es importante para su asociación con Rev (**Figura 16B**).

A



B



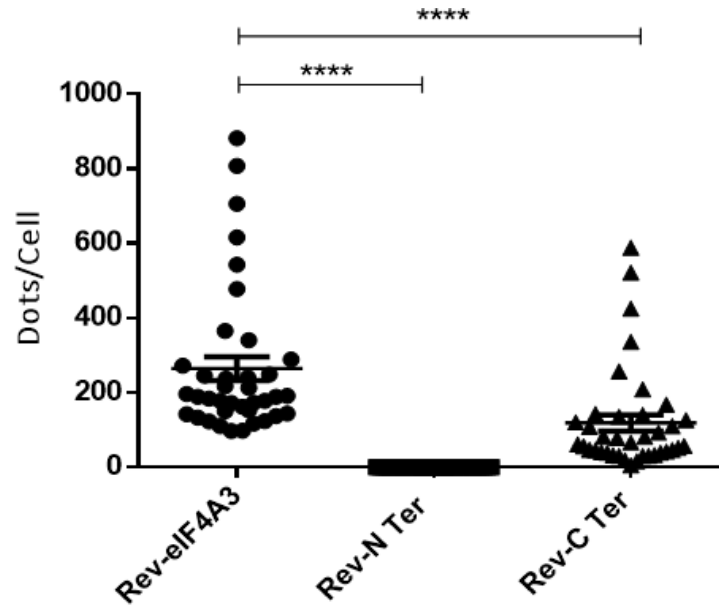


Figura 16: El dominio C-terminal de eIF4AIII se requiere para la asociación a Rev. (A) Esquema de los tres vectores utilizados para el ensayo de PLA acoplado a inmunofluorescencia indirecta. En la parte superior se representa el vector que expresa a la proteína eIF4AIII *wild type*, en la parte central se indica el vector que expresa el dominio N-terminal de eIF4AIII (residuos 35-244) y en la parte inferior se representa el vector que sintetiza el dominio C-terminal de eIF4AIII (residuos 245-411). (B) Células HeLa fueron transfectadas con 1 µg de pEGFP-Rev.C1 junto a 1 µg pCMV-3XFlag-eIF4AIII, 1 µg pCMV-3XFlag-eIF4AIII N-terminal o 1 µg pCMV-3XFlag-eIF4AIII C-terminal. 24 horas post transfección la interacción de EGFP-Rev con los dominios N- o C-terminal de eIF4AIII fueron analizadas mediante PLA acoplado a una inmunofluorescencia indirecta para determinar la expresión de las proteínas Rev (verde) y eIF4AIII y sus dominios (naranja). La cuantificación de los puntos por célula del total de interacciones entre Rev y eIF4AIII (panel superior), Rev y eIF4AIII N-Ter (panel central), Rev y eIF4AIII C-Ter (panel inferior) se presentan abajo. Todas las interacciones fueron cuantificadas usando Image J (**** $p < 0.0001$, test Mann-Whitney).

5. Discusión

El control post transcripcional de la expresión génica contempla diversos procesos que están altamente regulados. Durante cada una de estas etapas, diferentes proteínas son reclutadas hacia el ARN mensajero (ARNm) para formar un complejo ribonucleoproteico (RNP) que sea competente para ser exportado del núcleo y traducido en el citoplasma. En este sentido, la composición proteica del mRNP determina el destino del ARNm en el citoplasma, favoreciendo la exportación, traducción, localización y/o degradación del transcrito (Haimovich et al., 2013; Moore, 2005; Moore and Proudfoot, 2009). Esto puede ejemplificarse fácilmente cuando analizamos la multifacética funcionalidad del *cap-binding complex* (CBC), el cual está compuesto por las proteínas de unión al cap CBP20, y la proteína de andamiaje CBP80. Este complejo es reclutado tempranamente al transcrito nascente para favorecer los procesos de elongación de la transcripción, corte y empalme, exportación nuclear, estabilidad del ARNm, entre otros (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Rambout and Maquat, 2020). Otro ejemplo ampliamente estudiado corresponde al *Exon Junction Complex* (EJC), el cual está compuesto principalmente por las proteínas eIF4AIII junto al heterodímero Y14-MAGOH y se recluta al ARNm durante el proceso de corte y empalme. Entre las funciones reportadas para el EJC están la de favorecer la exportación nuclear y la traducción de los transcritos, así como de comandar el mecanismo de control de calidad de los ARNm conocido como *nonsense-mediated decay* (NMD) (Le Hir et al., 2003; Nott et al., 2004; Tange et al., 2004). De esta forma queda en manifiesto que los mRNP celulares se componen de diversas proteínas que definen e interconectan el metabolismo del transcrito.

De forma contraria, sabemos que el ARNmc de VIH-1, al ser un transcrito que no es sometido al proceso de corte y empalme (por lo que mantiene sus intrones), forma un complejo ribonucleoproteico diferente al de los ARNm celulares. Por un lado, se ha descrito que la proteína viral Rev reconoce la estructura RRE presente en el ARNmc y junto al factor de exportación nuclear CRM1, permite la exportación hacia el citoplasma, evitando así los mecanismos de control de calidad asociados a la exportación nuclear canónica de ARNm celulares dependientes de la proteína NXF1 (Taniguchi et al., 2014).

Si consideramos que se requieren en promedio 5000 moléculas de Gag para generar una partícula viral (Briggs et al., 2004), es esperable que su síntesis a partir del ARNmc sea un proceso crítico para una replicación viral exitosa. Es así como diferentes estudios se han focalizado en identificar diferentes proteínas celulares que estarían actuando como cofactores de Rev, principalmente para favorecer la exportación nuclear del ARNmc. No obstante, la caracterización funcional de proteínas celulares que actúen como cofactores de Rev sigue siendo necesaria para comprender de mejor manera como el mRNP no canónico que alberga al ARNmc recluta de manera eficiente los ribosomas. En este trabajo se identificaron tres proteínas celulares que se asocian a Rev para promover tanto la exportación nuclear como la traducción del ARNmc.

Como se había observado previamente que el ARNmc se mantendría asociado a la subunidad CBP80 del CBC, sumado a que se encontró a la proteína CBP80 y no eIF4E en las partículas virales, se propuso que la traducción del ARNmc estaría mediada por el CBC (Sharma et al., 2012). Esto, sumado a otras evidencias que indican que eIF4E sería excluido del ARNmc siendo reemplazado por DDX3 (Soto-Rifo et al., 2013), nos propusimos determinar si el CBC (a través de CBP80) o eIF4E se asocia al ARNmc y evaluar el rol de estas proteínas en la síntesis de Gag.

Desarrollamos la estrategia de ISH-PLA que nos permitió no solo identificar y cuantificar interacciones entre el ARNmc y proteínas de interés como CBP80 y eIF4E, sino que también pudimos tener una idea del compartimento subcelular (núcleo o citoplasma) donde ocurren estas interacciones. Como observamos que existe una asociación preferencial entre el ARNmc y la subunidad CBP80 del CBC en el núcleo, estudiamos el rol que tendría CBP80 sobre el ARNmc y observamos que favorece tanto la acumulación citoplásmica como la traducción del transcrito viral, efecto en el cual la proteína viral Rev está participando. Por esta razón, realizamos la técnica de PLA y confirmamos que Rev tiene cercanía con CBP80 favoreciendo así la síntesis de Gag, sin embargo, es necesario complementar este ensayo con un análisis de IF para determinar la expresión de ambas proteínas. No obstante, aún desconocemos si es CBP80 por sí solo o como parte del CBC el que estaría favoreciendo estos procesos. Sin embargo, un estudio publicado por nuestro laboratorio indica que el factor de inicio de la traducción dependiente de CBP80/CBP20 (CTIF) tendría un efecto inhibitorio en la síntesis de Gag (García-de-Gracia et al., 2020), sugiriendo que CBP80 tendría un rol independiente del CBC.

De manera interesante, se identificó una nueva proteína de unión al cap nuclear a la que denominaron NCBP3 y que junto a CBP80 formaría un CBC alternativo, el cual favorece la exportación de los ARNm (Gebhardt et al., 2015).

Por otra parte, en células infectadas con VIH-1 se encontró al ARNmc con la estructura cap monometilada (m^7GpppN) o trimetilada (TMG), esta última modificación estaría incrementando la síntesis proteica (Yedavalli and Jeang, 2010). Es más, en un artículo recientemente publicado se demostró que la trimetilación del ARNmc está mediada por la enzima trimetilguanosina sintasa 1 (TGS1), donde la helicasa de ARN RHA, se une al dominio PBS del 5'UTR, promoviendo el reclutamiento de TGS1 a la estructura cap.

Con la estructura cap trimetilada, el CBC canónico (compuesto por CBP20/CBP80) es intercambiado por el complejo NCBP3/CBP80, formando así un nuevo mRNP compuesto por NCBP3/CBP80-RHA el cual favorece la traducción del ARNmc (Singh et al., 2022). Con esta información se hace relevante conocer si las proteínas NCBP3 y RHA también son parte del mRNP que hemos descrito en este trabajo, puesto que tendríamos más información sobre la composición de este mRNP no canónico lo que nos podría dar información sobre la asociación del ARNmc con los ribosomas.

Considerando variados reportes que indican que la helicasa de ARN DDX3 favorece la exportación nuclear y la traducción del ARNmc (Fröhlich et al., 2016; Soto-Rifo et al., 2012a, 2012b, 2013; Yedavalli et al., 2004), además de otro trabajo que indica que DDX3 también promueve la traducción mediada por el complejo CBC-eIF3 (Chen et al., 2018), es altamente probable que DDX3 también coopere con Rev y CBP80 para promover la síntesis de Gag. Como se demostró que el ARNmc se asocia preferentemente a CBP80 y no a eIF4E, analizamos si otros componentes del complejo eIF4F (como eIF4GI y eIF4AI) se estaban asociando a Rev, por este motivo realizamos un ensayo de PLA y logramos determinar que la helicasa de ARN eIF4AI se asocia o tiene cercanía con la proteína Rev, revelando que la sobreexpresión de eIF4AI promueve tanto la exportación del ARNmc hacia el citoplasma como la traducción de este transcrito. De esta forma, en presencia de Rev la helicasa eIF4AI es reclutada al ARNmc para promover su exportación y en ausencia de Rev el mRNP compuesto por CBP80-eIF4AI no puede ser reclutado hacia el ARNmc, posiblemente por que se favorece una traducción canónica.

Una vez que demostramos que las proteínas CBP80 y eIF4AI favorecen la síntesis de Gag, proceso en el cual participa Rev, por medio del ensayo de ISH-PLA analizamos si Rev era capaz de favorecer la cercanía de estas proteínas celulares hacia el ARNmc.

De acuerdo con estos resultados, demostramos que Rev favorece o estabiliza la asociación entre ambas proteínas celulares con el ARNmc en el citoplasma y en el núcleo, respectivamente. Sin embargo, es necesario realizar un ensayo de IF para corroborar los niveles de expresión de la proteína Rev en todas las condiciones. De todos modos, es necesario continuar con estudios para analizar el mecanismo mediante el cual eIF4AI coopera con Rev en el proceso de exportación nuclear y si en este proceso también es posible encontrar a eIF4AII, puesto que tiene alto porcentaje de homología con la proteína eIF4AI (Nielsen and Trachsel, 1988). Además, los resultados obtenidos en esta tesis también demuestran que CBP80 es capaz de asociarse con la helicasa eIF4AI. Debido a que Rev se une al ARNmc por medio del RRE permitiendo su exportación, con la ayuda del vector pNL4.3-CTE (el cual permite que el ARNmc sea exportado independiente de Rev) observamos que la vía de exportación dependiente de Rev es necesaria para mantener la asociación de CBP80 y eIF4AI con el ARNmc. Quizás de esta forma se genera un punto de control de calidad para garantizar que el ARNmc sea destinado hacia los ribosomas y así finalizar con la síntesis proteica.

Por otro lado, estudiamos la helicasa de ARN eIF4AIII, la cual se recluta a los ARNm celulares a través del proceso de corte y empalme pero que curiosamente ha sido identificada entre los componentes del mRNP del ARNmc de VIH-1 (Knoener et al., 2017; Milev et al., 2012). Con estos antecedentes nos preguntamos si solo eIF4AIII por si sola o junto a otros componentes del EJC es reclutada al ARNmc. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia determinamos que el ARNmc está formando un complejo solo con eIF4AIII independiente de otros componentes del EJC como Y14 o PYM. De esta forma, esta helicasa estaría ejerciendo una función o rol diferente a su función canónica como parte del EJC. Así, observamos que eIF4AIII tiene un efecto positivo en la síntesis de Gag, ya que facilita la acumulación citoplásmica del ARNmc, función en la que participa la proteína Rev.

Mediante la técnica de PLA pudimos observar y confirmar que Rev es capaz de asociarse al dominio C-terminal de eIF4AIII, el cual incluye los dominios involucrados en el funcionamiento del NMD. Por este motivo es interesante y necesario estudiar si en células infectadas con VIH-1 ocurre una inhibición del NMD debido a que Rev interfiere con el ensamblaje de este complejo celular.

Considerando que eIF4AIII actúa junto a Rev para favorecer la exportación y traducción del ARNmc, nos preguntamos si Rev recluta a eIF4AIII hacia el ARNmc y así promover la síntesis de Gag, por lo cual realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de ARN en donde capturamos a la proteína eIF4AIII y analizamos el enriquecimiento de ARNmc en presencia y ausencia de Rev. Es así como determinamos que eIF4AIII se asocia al ARNmc y corroboramos que la proteína viral Rev es la responsable de reclutar a la helicasa eIF4AIII hacia el ARNmc para promover la síntesis de Gag. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de silenciamiento de la proteína eIF4AIII para determinar si la disminución de la expresión de eIF4AIII impacta de forma negativa la síntesis de Gag. Por otro lado, sería interesante analizar como mutantes de eIF4AIII, las cuales ya se han caracterizado, (Shibuya et al., 2006) afectan en la síntesis de Gag. Además, si consideramos la evidencia que CTIF interactúa con Rev, reteniendo esta proteína viral en el citoplasma y evitando así el ensamblaje del complejo Rev-CBP80, el cual es importante para la síntesis de Gag (García-de-Gracia et al., 2020), sumado al trabajo en el que se reportó que la proteína eIF4AIII es reclutada por CTIF hacia los ARNm celulares con regiones 5'-no traducidas altamente estructuradas para promover la traducción dependiente del CBC (Choe et al., 2014), sería interesante estudiar si en el complejo propuesto entre CBP80-CTIF-eIF4AIII, CTIF sería reemplazado por Rev en un contexto de infección por VIH-1.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo entregan evidencia adicional sobre la composición del mRNP del ARNmc, donde sabemos que se forma un complejo Rev-CBP80-eIF4AI y Rev-eIF4AIII los cuales favorecen la síntesis de Gag al promover la exportación y

traducción de este transcrito. Tomando en consideración que el ARNm contiene intrones que generan una retención y degradación de este transcrito en ausencia de Rev, se ha demostrado que algunos ARNm retrovirales que contienen intrones logran escapar de mecanismos de control de calidad como el NMD (Balistreri et al., 2017; Mocquet et al., 2015). De esta manera, sería interesante estudiar si Rev a través de sus interacciones con CBP80, CTIF y eIF4AIII tiene un efecto en la primera ronda de traducción y en la regulación del NMD.

6. Conclusiones

- La subunidad CBP80 del CBC, se asocia con la proteína viral Rev y favorece la síntesis de Gag al promover la exportación nuclear del ARNmc.
- La helicasa de ARN eIF4AI, interactúa con Rev para favorecer la exportación nuclear del ARNmc.
- La proteína viral Rev participa en la asociación entre CBP80 y eIF4AI con el ARNmc.
- La exportación mediada por el eje Rev/RRE favorece el reclutamiento del complejo CBP80/eIF4AI hacia el ARNmc.
- La proteína viral Rev se asocia con la proteína eIF4AIII y favorece la exportación nuclear del ARNmc.
- eIF4AIII interacciona mediante su extremo C-Terminal con la proteína Rev.
- La proteína viral Rev contribuye a la asociación entre eIF4AIII y el ARNmc.

7. Referencias bibliográficas

- Aibara, S., Katahira, J., Valkov, E., and Stewart, M. (2015). The principal mRNA nuclear export factor NXF1:NXT1 forms a symmetric binding platform that facilitates export of retroviral CTE-RNA. *Nucleic Acids Res.* 43, 1883–1893.
- Arrigo, S.J., and Chen, I.S.Y. (1991a). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* 5, 808–819.
- Arrigo, S.J., and Chen, Y.-S. (1991b). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env / vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* 5, 808–819.
- Balvay, L., Lastra, M.L., Sargueil, B., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. (2007). Translational control of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 128–140.
- Balvay, L., Rifo, R.S., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1789, 542–557.
- Barrera, A., Olguín, V., Vera-Otarola, J., and López-Lastra, M. (2020). Cap-independent translation initiation of the unspliced RNA of retroviruses. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1863, 194583.
- Bono, F., and Gehring, N.H. (2011). Assembly, disassembly and recycling. *RNA Biol.* 8, 24–29.
- 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.
- Carmody, S.R., and Wentz, S.R. (2009). mRNA nuclear export at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 1933–1937.
- Castelló, A., Franco, D., Moral-López, P., Berlanga, J.J., Álvarez, E., Wimmer, E., and Carrasco, L. (2009). HIV-1 protease inhibits cap-and poly(A)-dependent translation upon eIF4G1 and PABP cleavage. *PLoS One* *4*.
- Chen, H.H., Yu, H.I., Yang, M.H., and Tarn, W.Y. (2018). DDX3 Activates CBC-eIF3–Mediated translation of uORF-containing oncogenic mRNAs to promote metastasis in HNSCC. *Cancer Res.* *78*, 4512–4523.
- Chiu, S., Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* *18*, 745–754.
- 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.
- Choe, J., Ryu, I., Park, O.H., Park, J., Cho, H., Yoo, J.S., Chi, S.W., Kim, M.K., Song, H.K., and Kim, Y.K. (2014). EIF4AIII enhances translation of nuclear cap-binding complex-bound mRNAs by promoting disruption of secondary structures in UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E4577–E4586.
- Courtney, D.G., Tsai, K., Bogerd, H. p, Kennedy, E.M., Law, B.A., Emery, A., Swanstrom, R., Holley, C.L., and Cullen, B.R. (2019). Epitranscriptomic addition of

- m5 C to HIV-1 transcripts regulates viral gene expression. *Cell Host Microbe* 26, 217–227.
- Coyle, J.H., Bor, Y.C., Rekosh, D., and Hammarskjold, M.L. (2011a). The Tpr protein regulates export of mRNAs with retained introns that traffic through the Nxf1 pathway. *RNA* 17, 1344–1356.
 - Coyle, J.H., Bor, Y.C., Rekosh, D., and Hammarskjold, M.L. (2011b). The Tpr protein regulates export of mRNAs with retained introns that traffic through the Nxf1 pathway. *Rna* 17, 1344–1356.
 - Craigie, R., and Bushman, F.D. (2012). HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–18.
 - Cullen, B.R. (1986). Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46, 973–982.
 - Cullen, B.R. (2003a). Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* 116, 587–597.
 - Cullen, B.R. (2003b). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem. Sci.* 28, 419–424.
 - Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., and Campbell, E.M. (2020). Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat. Microbiol.* 5, 1088–1095.
 - Diem, M.D., Chan, C.C., Younis, I., and Dreyfuss, G. (2007). PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1173–1179.
 - Dimitrova, D.G., Teyssset, L., and Carré, C. (2019). RNA 2-O-Methylation (Nm) modification in human diseases. *Genes (Basel).* 10, 1–23.
 - Emery, A., Zhou, S., Pollom, E., and Swanstrom, R. (2017). Characterizing HIV-1 Splicing by Using Next-Generation Sequencing Curriculum in Genetics and

Molecular Biology. *J. Virol.* 91, 1–21.

- Fang, Y., Bateman, J.F., Mercer, J.F., and Lamandé, S.R. (2013). Nonsense-mediated mRNA decay of collagen -emerging complexity in RNA surveillance mechanisms. *J. Cell Sci.* 126, 2551–2560.
- Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G.N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1495–1499.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattajt, L.W., and Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475–483.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich. *Cell* 90, 1051–1060.
- 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.
- 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., et al. (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, 719–730.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308–311.

- García-de-Gracia, F., Gaete-Argel, A., Riquelme-Barrios, S., Pereira-Montecinos, C., Rojas-Araya, B., Aguilera, P., Oyarzún-Arrau, A., Rojas-Fuentes, C., Acevedo, M.L., Chnaiderman, J., et al. (2020). CBP80/20-dependent translation initiation factor(CTIF) inhibits HIV-1 Gag synthesis by targeting the function of the viral protein Rev.RNA Biol. 18, 745–758.
- Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 827–835.
- Gebhardt, A., Habjan, M., Benda, C., Meiler, A., Haas, D.A., Hein, M.Y., Mann, A., Mann, M., Habermann, B., and Pichlmair, A. (2015). mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3. Nat. Commun. 6, 1–13.
- Gendron, K., Ferbeyre, G., Heveker, N., and Brakier-Gingras, L. (2011). The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. Nucleic Acids Res. 39, 902–912.
- Gingras, A., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 Initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosome and regulators of translation. Annu. Rev. Biochem. 68, 913–963.
- Goh, W.C., Rogel, M.E., Matthew Kinsey, C., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H., and Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: A mechanism for selection of Vpr in vivo. Nat. Med. 4, 65–71.
- Golding, H., Blumenthal, R., Manischewitz, J., Litfman, D.A.N.R., and Dimitrov, D.S. (1993). Cell Fusion Mediated by Interaction of a Hybrid CD4 . CD8 Molecule with the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Does Occur after a Long Lag Time. J. Virol. 67, 6469–6475.

- Gonatopoulos-Pournatzis, T., and Cowling, V.H. (2014). Cap-binding complex (CBC). *Biochem. J.* 457, 231–242.
- Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3195–3199.
- Gross, J.D., Moerke, N.J., Von Der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E.G., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115, 739–750.
- Grüter, P., Tabernero, C., Von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B.K., and Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell* 1, 649–659.
- Guedán, A., Caroe, E.R., Barr, G.C.R., and Bishop, K.N. (2021). The role of capsid in hiv-1 nuclear entry. *Viruses* 13, 1–14.
- Haimovich, G., Choder, M., Singer, R.H., and Trcek, T. (2013). The fate of the messenger is pre-determined: A new model for regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 643–653.
- Hellen, C.U.T., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15, 1593–1612.
- Hinnebusch, A.G. (2017). Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends Biochem. Sci.* 42, 589–611.
- Hir, H. Le, Gatfield, D., Braun, I.C., Forler, D., and Izaurralde, E. (2001). The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* 2, 1119–1124.
- Le Hir, H., Nott, A., and Moore, M.J. (2003). How introns influence and enhance

- eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 28, 215–220.
- Isken, O., and Maquat, L.E. (2008). The multiple lives of NMD factors: Balancing roles in gene and genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 699–712.
 - Izumi, T., Io, K., Matsui, M., Shirakawa, K., Shinohara, M., Nagai, Y., Kawahara, M., Kobayashi, M., Kondoh, H., Misawa, N., et al. (2010). HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20798–20803.
 - Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.
 - Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* 62, 2636–2643.
 - Jones, K.A. (1993). Tat and the HIV-1 promoter. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 461–468.
 - Karn, J., and Stoltzfus, C.M. (2012). Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, 1–17.
 - Katahira, J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819, 507–513.
 - Katahira, J., Sträßer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U., and Hurt, E. (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* 18, 2593–2609.
 - Katz, R.A., and Skalka, A.M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 133–173.
 - Kennedy, E.M., Bogerd, H. p, Kornepati, A.V.R., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall,

- J.B., Poling, B.C., Tsai, K., Gokhale, N.S., Horner, S.M., et al. (2016). Post-transcriptional m6A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell Host Microbe* 19, 675–685.
- Kervestin, S., and Jacobson, A. (2013). NMD: A Multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 1199–1216.
 - 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 β -actin and viral protein expression. *Biochimie* 78, 1075–1080.
 - Knoener, R.A., Becker, J.T., Scalf, M., Sherer, N.M., and Smith, L.M. (2017). Elucidating the in vivo interactome of HIV-1 RNA by hybridization capture and mass spectrometry. *Sci. Rep.* 7, 1–16.
 - Kozak, M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5073–5080.
 - Li, G., and De Clercq, E. (2016). HIV Genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 679–731.
 - Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G.M., Bansal, V., Wang, Y., Mason, C.E., and Rana, T.M. (2016). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat. Microbiol.* 1, 16011.
 - López-Lastra, M., Rivas, A., and Barría, M.I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.* 38, 121–146.
 - Ma, X.M., Yoon, S.O., Richardson, C.J., Jülich, K., and Blenis, J. (2008). SKAR Links Pre-mRNA Splicing to mTOR/S6K1-Mediated Enhanced Translation Efficiency of Spliced mRNAs. *Cell* 133, 303–313.
 - Malim, M.H., Hauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B.R. (1988). Immunodeficiency

virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 335, 181–183.

- Malim, M.H., Böhnlein, S., Fenrick, R., Le, S.Y., Maizel, J. V., and Cullen, B.R. (1989a). Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8222–8226.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J. V., and Cullen, B.R. (1989b). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254–257.
- 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.
- Martin, M.A., and Purcell, D.F. (1993). Alternative Splicing of Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNA Modulates Viral Protein Expression , Replication , and Infectivity. *J. Virol.* 67, 6365.
- Martinez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., and Embarek, A.M. (2018). Insights into structural and mechanistic features of viral IRES elements. *Front. Microbiol.* 8, 1–15.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* 19, 1512–1517.
- Merrick, W.C. (2015). eIF4F: A retrospective. *J. Biol. Chem.* 290, 24091–24099.
- Merz, C., Urlaub, H., Will, C.L., and Lührmann, R. (2007). Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein

recruitment. *Rna* 13, 116–128.

- Milev, M.P., Ravichandran, M., Khan, M.F., Schriemer, D.C., and Mouland, A.J. (2012). Characterization of Staufen 1 ribonucleoproteins by mass spectrometry and biochemical analyses reveal the presence of diverse host proteins associated with human immunodeficiency virus type 1. *Front. Microbiol.* 3, 1–21.
- Monette, A., Ajamian, L., López-Lastra, M., and Mouland, A.J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import. Implications for HIV-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 284, 31350–31362.
- 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.
- Moore, M.J. (2005). From birth to death: The complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* (80-). 309, 1514–1518.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688–700.
- Mueller, N., Pasternak, A.O., Klaver, B., Cornelissen, M., Berkhout, B., and Das, A.T. (2018). The HIV-1 Tat Protein Enhances Splicing at the Major Splice Donor Site. *J. Virol.* 92, 1–15.
- Nielsen, P.J., and Trachsel, H. (1988). The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J.* 7, 2097–2105.
- Nott, A., Le Hir, H., and Moore, M.J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: An additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.* 18, 210–222.

- Ohlmann, T., Prévôt, D., Décimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S.J., and Darlix, J.L. (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J. Mol. Biol.* 318, 9–20.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St. Johnston, D., and Izaurralde, E. (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 427, 753–757.
- Palazzo, A.F., Springer, M., Shibata, Y., Lee, C.S., Dias, A.P., and Rapoport, T.A. (2007). The signal sequence coding region promotes nuclear export of mRNA. *PLoS Biol.* 5, 2862–2874.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nat. Artic.* 334, 320–325.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (2019). The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 307–335.
- Perales, C., Carrasco, L., and Ventoso, I. (2003). Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: Effects on translation. *FEBS Lett.* 533, 89–94.
- Pflug, A., Guilligay, D., Reich, S., and Cusack, S. (2014). Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature* 516, 355–360.
- Plank, T.D.M., Whitehurst, J.T., and Kieft, J.S. (2013). Cell type specificity and structural determinants of IRES activity from the 5' leaders of different HIV-1 transcripts. *Nucleic Acids Res.* 41, 6698–6714.
- Pollard, V.W., and Malim, M.H. (1998). THE HIV-1 REV PROTEIN. *Medicine (Baltimore)*. 52, 491–532.
- Popp, M.W.-L., and Maquat, L.E. (2013). Organizing Principles of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Annu. Rev. Genet.* 47, 139–165.
- Rajanala, K., and Nandicoori, V.K. (2012). Localization of nucleoporin Tpr to the

nuclear pore complex is essential for Tpr mediated regulation of the export of unspliced RNA. *PLoS One* 7.

- Rambout, X., and Maquat, L.E. (2020). The nuclear cap-binding complex as choreographer of gene transcription and pre-mRNA processing. *Genes Dev.* 34, 1113–1127.
- Reed, R., and Hurt, E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108, 523–531.
- Reed, S.E., Staley, E.M., Mayginnes, J.P., Pintel, D.J., and Tullis, G.E. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol. Methods* 138, 85–98.
- Ren, X., Yu, Y., Li, H., Huang, J., Zhou, A., Liu, S., Hu, P., Li, B., Qi, W., and Liao, M. (2019). Avian influenza A virus polymerase recruits cellular RNA helicase eIF4A3 to promote viral mRNA splicing and spliced mRNA nuclear export. *Front. Microbiol.* 10, 1–14.
- Ricci, E.P., Rifo, R.S., Herbreteau, C.H., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2008). Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 690–693.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477–480.
- Ringeard, M., Marchand, V., Decroly, E., Motorin, Y., and Bennasser, Y. (2019). FTSJ3 is an RNA 2-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing. *Nature* 565, 500–504.
- Rogers, G.W., Komar, A.A., and Merrick, W.C. (2002). eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 307–331.

- Roussis, I.M., Myers, F.A., and Scarlett, G.P. (2017). RNA whole-mount in situ hybridization proximity ligation assay (rISH-PLA), an assay for detecting RNA-protein complexes in intact cells. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2017, 17.20.1-17.20.10.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1134–1144.
- Ruelas, D.S., and Greene, W.C. (2013). An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell* 155, 519–529.
- Schlautmann, L.P., and Gehring, N.H. (2020). A day in the life of the Exon junction complex. *Biomolecules* 10, 1–17.
- Schumann, U., Zhang, H.N., Sibbritt, T., Pan, A., Horvath, A., Gross, S., Clark, S.J., Yang, L., and Preiss, T. (2020). Multiple links between 5-methylcytosine content of mRNA and translation. *BioRxiv* 1–23.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyő, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990a). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64, 2519–2529.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Fenyő, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990b). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* 64, 5448–5456.
- 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.
- Shibuya, T., Tange, T., Sonenberg, N., and Moore, M.J. (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 346–351.

- Shibuya, T., Tange, T., Stroupe, M.E., and Moore, M.J. (2006). Mutational analysis of human eIF4AIII identifies regions necessary for exon junction complex formation and nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 12, 360–374.
- Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Weng, Z., and Moore, M.J. (2012). The Cellular EJC Interactome Reveals Higher Order mRNP Structure and an EJC-SR Protein Nexus. *Cell* 151, 750–764.
- Singh, G., Seufzer, B., Song, Z., Zucko, D., Heng, X., and Boris-Lawrie, K. (2022). HIV-1 hypermethylated guanosine cap licenses specialized translation unaffected by mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, 1–9.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E., and Haseltine, W. (1986). A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321, 412–417.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanism and biological targets. *Cell* 136, 731–745.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Limousin, T., De Breyne, S., Décimo, D., and Ohlmann, T. (2012a). DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J.* 31, 3745–3756.
- 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. (2012b). 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.
- Stäßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro,

- S., Rondón, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., et al. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304–308.
- Tan, W., Zolotukhin, A.S., Bear, J., Patenaude, D.J., and Felber, B.K. (2000). The mRNA export in *Caenorhabditis elegans* is mediated by Ce-NXF-1, an ortholog of human TAP/NXF and *Saccharomyces cerevisiae* Mex67p. *Rna* 6, 1762–1772.
 - Tange, T., Nott, A., and Moore, M.J. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 279–284.
 - Taniguchi, I., and Ohno, M. (2008). ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol. Cell. Biol.* 28, 601–608.
 - 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.
 - Topisirovic, I., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., and Shatkin, A.J. (2011). Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 277–298.
 - Toro-Ascuy, D., Gaete-Argel, A., Celis-Rojas, V., and Valiente-Echeverría, F. (2021). In Situ Hybridization-Proximity Ligation Assay (ISH-PLA) to Study the Interaction of HIV-1 RNA and Remodeling Proteins.
 - Tsai, K., Ayyappan, A., Vasudevan, J., Campos, C.M., Swanstrom, R., and Cullen, B.R. (2020). Acetylation of cytidine residues boosts HIV-1 gene expression by increasing viral RNA stability. *Cells Host Microbe* 28, 306–312.
 - UNIADS (2022). UNAIDS Data 2022.
 - 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.
- Vallejos, M., Carvajal, F., Pino, K., Navarrete, C., Ferres, M., Huidobro-Toro, J.P., Sargueil, B., and López-Lastra, M. (2012). Functional and structural analysis of the internal ribosome entry site present in the mrna of natural variants of the hiv-1. *PLoS One* *7*, 1–12.
 - Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12966–12971.
 - Yamasaki, S., and Anderson, P. (2008). Reprogramming mRNA translation during stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 222–226.
 - Yedavalli, V.S.R.K., and Jeang, K.T. (2010). Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14787–14792.
 - Yedavalli, V.S.R.K., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L., and Jeang, K.T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* *119*, 381–392.
 - Zhou, J., Huang, L., Hachey, D.L., Chen, C.H., and Aiken, C. (2005). Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral Gag protein in immature HIV-1 particles. *J. Biol. Chem.* *280*, 42149–42155.
 - Zila, V., Margiotta, E., Turoňová, B., Müller, T.G., Zimmerli, C.E., Mattei, S., Allegretti, M., Börner, K., Rada, J., Müller, B., et al. (2021). Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell* *184*, 1032-1046.e18.

- Zolotukhin, A.S., Valentin, A., Pavlakis, G.N., and Felber, B.K. (1994). Continuous propagation of RRE(-) and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.* 68, 7944–7952.