

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



Rol de la lectora de m⁶A YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de
Magíster en Bioquímica, área de especialización Proteínas y Biotecnología, y
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Por:

FELIPE IGNACIO LEÓN DÍAZ

Director de Tesis

Dr. Ricardo Soto Rifo

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

SANTIAGO-CHILE

Abril 2020

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE
BIOQUÍMICO**

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

FELIPE IGNACIO LEÓN DÍAZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Soto Rifo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Puente

Dra. Alejandra Loyola

Dr. Carlos Santiviago

*A mi madre y a mi abuela por
acompañarme muchos años*

Agradecimientos

Agradecer es lo menos que puedo hacer después de haber recorrido tanto para finalizar esta etapa. Comienzo por agradecerme a mi mismo por permitirme llegar acá, por la fuerza y el coraje que me han permitido no rendirme jamás en la vida. A mi familia, mi madre, mi padrastro y mi abuela, por mostrarme que solo con esfuerzo todo es posible y por siempre apoyarme en los sueños que deseo.

A la Universidad por darme la oportunidad de estudiar y crecer en lo personal, también a todas las becas y ayudas que recibí para darme el privilegio de completar esta hermosa carrera. También a todos los profes que se me cruzaron en el camino, gracias por ser mis guías. A las profes del Valentín Letelier, Vilma y Alejandra por creer en mí y quedarse después de clases conmigo para preparar la PSU.

Al Laboratorio de Virología Molecular y Celular por recibirme y a todos quienes le dan vida a ese lugar día a día. En especial a mi Director de Tesis Dr. Ricardo Soto por darme esta maravillosa oportunidad sin dudarlo, por su confianza y compromiso no solo conmigo sino con todos sus estudiantes. A la Dra. Daniela Toro por enseñarme a hacer tantos experimentos y tenerme tanta paciencia, también por la exigencia y al Dr. Fernando Valiente por su apañe.

A los hermanos del alma que encontré en este camino, gracias por compartir su luz conmigo. En especial a Matilde, Mirit, Cata Abril, Gabi, Chela, Coni, Aldriom, José, Nigel, Ale, Samy gracias por la compañía y el amor. En especial al team almuerzo por siempre ser tan puntuales y por la compañía diaria mientras hacíamos las tesis. A mis queridas de la PUC Javiera y Yanara por las risas y la compañía cuando éramos unos bebés y a todos los que siempre han estado ahí para lo que sea necesite.

A los amigos que me apoyaron en Canadá, que nunca me dejaron solo y me mostraron un mundo nuevo. Gracias a Sebas y Fer por acogerme en su casa y al Dr. Moulard por recibirme en su laboratorio.

Y a tantos otros MUCHAS GRACIAS!

BECAS Y FINANCIAMIENTO

BECAS

2017-2019 Beca de Rebaja de Arancel de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

2019 Beca para Estadías cortas de Investigación de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile. Estadía realizada en el Instituto Lady Davis, Universidad de McGill, Montréal, Canadá.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1160176

Proyecto FONDECYT 1190156

Proyecto Anillo ACT 1408

PRESENTACIONES A CONGRESOS

2017. Toro-Ascuy D, **León-Díaz F**, Rojas-Araya B, Soto-Rifo R. Isolation of the ribonucleoprotein complexes associated to HIV-1 Rev protein during viral replication in T-cells. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, La Serena, Chile. 14 al 17 de noviembre 2017.

2018. León-Díaz F, Toro-Ascuy D, Valiente-Echeverría F, Soto-Rifo R. La proteína lectora de m⁶A YTHDC2 se asocia con el ARNm completo de VIH-1 para regular su expresión. XXXV Congreso Nacional de estudiantes de Bioquímica y carreras afines. Agosto 2018. Ganador Segundo Lugar en Competencia de Presentación de Póster.

2018. Toro-Ascuy D, Fuentes-Rojas C, Garcia-de-Gracia F, **León-Díaz F**, Soto-Rifo R. Analysis of the RNAome associated to the HIV-1 Rev protein during viral replication in T-cells. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, Santiago, Chile. 13 al 16 noviembre 2018.

2018. León-Díaz F, Toro-Ascuy D, Bueno-Nieto C, Valiente-Echeverría F, Soto-Rifo R. La proteína lectora de m⁶A YTHDC2 se asocia con el ARNm completo de VIH-1 para regular su expresión. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, Santiago, Chile. 13 al 16 noviembre 2018.

Índice General

Índice General	vi
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Introducción	1
- Virus de la Inmunodeficiencia Humana	1
- Ciclo replicativo de VIH-1 y su expresión génica.....	3
- Control de la expresión génica y modificaciones del ARN	5
- Modificaciones químicas del ARNm.....	5
- Modificación N ⁶ -metiladenosina	7
- N ⁶ -metiladenosina en VIH-1	9
- Dominio YTH y lectoras de m ⁶ A	10
- Rol de las lectoras de m ⁶ A	11
- YTHDC2: Helicasa y lectora de m ⁶ A	11
Hipótesis y Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
- Vectores de ADN	16
- Digestión de vectores pCIneo-NHA.....	16
- Anticuerpos	17
- Cultivo celular y transfección de ADN	17
- Ensayo de actividad de Luciferasa de Renilla	17
- <i>Western blot</i>	18

- Silenciamiento de la expresión de YTHDC2 mediante ARN interferente	19
- Inmunofluorescencia Indirecta	19
- Hibridación in situ fluorescente (FISH) del ARNmc de VIH-1 con IFI (FISH-IFI)	20
- Hibridación in situ Fluorescente acoplado al Ensayo de Ligación Proximal (ISH-PLA)	21
- Extracción de ARN total y RT-qPCR	22
- Análisis y procesamiento de datos	23
Resultados	24
1. La sobre-expresión de YTHDC2 promueve la síntesis de la proteína viral Gag de VIH-1	24
2. El silenciamiento parcial de YTHDC2 disminuye la expresión de la proteína viral Gag de VIH-1	26
3. La lectora de m ⁶ A YTHDC2 se asocia con el ARNmc de VIH-1	29
4. Los dominios Helicasa e YTH de YTHDC2 son preferencialmente requeridos para estimular la síntesis de la proteína viral Gag de VIH-1	30
5. Los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de YTHDC2 contribuyen a la asociación de YTHDC2 con el ARNmc de VIH-1	33
6. La sobre-expresión de mutantes de YTHDC2 modula la abundancia del ARNmc de VIH-1	37
Discusión	39
Conclusiones	47
Bibliografía	48
Anexos	56

Lista de Figuras

Figura 1: Estructura del VIH y organización de su genoma	2
Figura 2: Ciclo replicativo del VIH	4
Figura 3: Modificaciones químicas en el ARNm	6
Figura 4: Dinámica de la modificación m ⁶ A	8
Figura 5: Dominios de las lectoras YTH	12
Figura 6: Efecto de la sobre-expresión de YTHDC2-FLAG en la síntesis de Gag de VIH-1....	25
Figura 7: Efecto del silenciamiento parcial de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1	27
Figura 8: Inmunofluorescencia Indirecta de YTHDC2 y Gag en células silenciadas para YTHDC2	28
Figura 9: ISH-PLA del ARNmc de VIH con la lectora de m ⁶ A YTHDC2	30
Figura 10: Determinación a través de ensayo reportero de la influencia de los dominios Helicasa (D/Q), YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Gag	31
Figura 11: Determinación a través de <i>Western blot</i> de la influencia de los dominios Helicasa (D/Q), YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Gag	33
Figura 12: FISH-IFI del ARNmc de VIH-1 y mutantes de YTHDC2	34
Figura 13: ISH-PLA del ARNmc de VIH-1 con las mutantes de YTHDC2	36
Figura 14: Abundancia total del ARNmc de VIH-1 cuando se sobre-expresa a YTHDC2 y sus mutantes	38
Anexo 1: Diferentes mutantes de YTHDC2 usadas en este trabajo	56
Anexo 2: <i>Western blot</i> silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes de YTHDC2	57
Anexo 3: Inmunofluorescencia del ensayo de silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes de YTHDC2	59

Lista de Abreviaturas

µg:	Micro gramos
µL:	Micro Litros
µM:	Micro Molar
3'UTR:	Región 3' no traducida
5'UTR:	Región 5' no traducida
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico circular
ALKBH5:	Dioxigenasa 5 homóloga a ALKB dependiente de alfa-cetoglutarato
ANK:	Ankirina
ARN pol II:	Ácido Ribonucleico transcrito por la ARN polimerasa II
ARN:	Ácido Ribonucleico
ARNg:	Ácido Ribonucleico genómico
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNmc:	Ácido Ribonucleico mensajero completo
CA:	Cápside
CCR5:	Receptor C-C de quimioquinas tipo 5
CDS:	Secuencia Codificante
CRM1:	Mantenimiento cromosómico 1
CXCR4:	Receptor C-X-C de quimioquinas tipo 4
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
dsADN:	Ácido desoxirribonucleico de doble hebra
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
Env:	Envoltura
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente
FTO:	Proteína Asociada a la Obesidad y la Masa Grasa
Gag:	Antígeno Grupo Especifico
gp120:	Glicoproteína 120
gp41:	Glicoproteína 41
hpt:	horas post transfección
HA:	Hemaglutinina
IF:	Inmunofluorescencia

IN:	Integrasa
ISH-PLA:	Hibridación <i>in situ</i> Acoplada al ensayo de Ligación Proximal
LTR:	<i>Long Terminal Repeat</i>
m⁶A:	N ⁶ -metiladenosina
MA:	Matriz
METTL14:	Proteína Tipo Metiltransferasa 14
METTL3:	Proteína Tipo Metiltransferasa 3
NaCl:	Cloruro de Sodio
NC:	Nucleocápside
nM:	Nano Molar
NP-40:	Nonidet P-40
p17:	Proteína de Matriz
p24:	Proteína de la cápside
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PIC:	Complejo de Pre-Integración
PLA:	Ensayo de Ligación Proximal
Pol:	Polimerasa
PR:	Proteasa
Rev:	Regulador del virión
rpm:	Revoluciones por minuto
RRE:	Elemento de Respuesta a Rev
RT-qPCR:	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
siARN:	Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia
ssARN:	Ácido Ribonucleico de hebra simple
Tris-HCl:	Tris Clorhidrato
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIH-1:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de Tipo 1
VIH-2:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de Tipo 2
WTAP:	Proteína Asociada al Tumor de Wilms
YTHDC1:	Proteína 1 que contiene el dominio YTH
YTHDC2:	Proteína 2 que contiene el dominio YTH
YTHDF1:	Proteína 1 miembro de la Familia de dominio YTH
YTHDF2:	Proteína 2 miembro de la Familia de dominio YTH
YTHDF3:	Proteína 3 miembro de la Familia de dominio YTH

Resumen

Una vez integrado en un cromosoma celular, el VIH-1 genera un transcrito único de 9-kb o ARN mensajero completo (ARNmc) que es procesado por corte y empalme para generar los transcritos de 2-kb (completamente procesados) y luego los de 4-kb (parcialmente procesados). El ARNmc es, además, utilizado para la síntesis de las poliproteínas estructurales Gag y Gag-Pol. La regulación de la expresión génica a nivel del ARNm es un excelente punto de control y se sabe que los ARNm pueden sufrir varias modificaciones químicas donde la N⁶-metiladenosina (m⁶A) es la modificación química interna más abundante en los ARNm eucariontes, con un importante impacto en diversas etapas de la expresión génica que incluyen desde la regulación del corte y empalme, exportación nuclear, traducción hasta la degradación de un ARNm. Esta modificación es dinámica y reversible, y regulada por proteínas escritoras, borradoras y lectoras de m⁶A. Las escritoras METTL3 y METTL14 junto con WTAP actúan en conjunto para metilar las adenosinas de los ARNm. Las borradoras son las encargadas de remover específicamente la metilación m⁶A y corresponden a las proteínas FTO y ALKBH5. Las proteínas lectoras detectan y dan la funcionalidad a m⁶A, y corresponden a miembros de la familia YTH: YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 e YTHDC2. Diversos ARNm celulares poseen m⁶A y se ha determinado mediante análisis transcriptómicos la presencia de esta modificación en el ARNmc de VIH-1, sugiriendo una fina regulación de la expresión génica viral a través de la metilación de adenosinas en este transcrito. YTHDC2 se diferencia de las demás proteínas lectoras al poseer una actividad Helicasa de ARN dependiente de ATP y ser perteneciente a la familia de Helicasas de ARN con caja DExD/H. Estas Helicasas son conocidas por poseer dominios auxiliares N- y C- terminales pero YTHDC2 es la única Helicasa de ARN que contiene un dominio YTH y se ha visto que YTHDC2 promueve la traducción de sus ARNm blanco, que su silenciamiento disminuye la traducción global y, además, un *screening* a gran escala sugirió que YTHDC2 es necesaria para la síntesis de la proteína Gag de VIH-1. En este trabajo se propone que YTHDC2 es una lectora de m⁶A en el ARNm completo de VIH-1 que regula post-

transcripcionalmente su expresión génica para favorecer su traducción y se busca caracterizar el mecanismo de regulación mediante la evaluación funcional de YTHDC2 silvestre y mutantes de sus dominios Helicasa, de unión a m⁶A (YTH), R3H y ANK en células transfectadas con un provirus de VIH-1, usando herramientas como el ensayo de gen reportero, *Western blot*, silenciamiento y microscopia confocal. En este trabajo mostramos que la sobre-expresión de YTHDC2 aumenta la síntesis de Gag, que su silenciamiento la disminuye, y que esta proteína celular es capaz de asociarse con el ARNmc. Además, observamos la importancia de los dominios Helicasa e YTH para la síntesis de Gag y de los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK para la asociación con el ARNmc. Los resultados obtenidos sugieren que la abundancia de YTHDC2 modula los niveles de Gag y del ARNmc de VIH-1.

Abstract

“Role of m⁶A reader YTHDC2 in HIV-1 Gag synthesis”

Once integrated into a cellular chromosome, HIV-1 generates a single 9-kb transcript or full-length HIV-1 RNA that is processed by alternative splicing to generate 2-kb transcripts (fully processed) and then those of 4-kb (partially processed). The full-length HIV-1 RNA is also used for the synthesis of the Gag and Gag-Pol structural polyproteins. Regulation of gene expression at the mRNA level is an excellent checkpoint and it is known that mRNAs can undergo several chemical modifications where N⁶-methyladenosine (m⁶A) is the most abundant internal chemical modification in eukaryotic mRNAs, with a significant impact on various stages of gene expression ranging from the regulation of splicing, nuclear export, translation to the degradation of an mRNA. This modification is dynamic and reversible and regulated by writers, erasers and readers of m⁶A. The writers METTL3 and METTL14 together with WTAP act to methylate the mRNA adenosines. The erasers are responsible of removing specifically the m⁶A methylation and correspond to the FTO and ALKBH5 proteins. The reader proteins detect and give the functionality to m⁶A and correspond to members of the YTH family: YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, and YTHDC2. Several cellular mRNAs possess m⁶A and the presence of this modification in the full-length HIV-1 RNA has been determined by transcriptomic analysis, suggesting a fine regulation of viral gene expression through adenosine methylation. YTHDC2 differs from other reader proteins as it possesses an ATP-dependent RNA helicase activity belonging to the family of DExD/H-box RNA helicases. These helicases are known to harbour N- and C-terminal auxiliary domains but YTHDC2 is the only RNA helicase that contains an YTH domain. It has been shown that YTHDC2 promotes translation of its mRNA targets and that its silencing decreases overall translation and, also, a large-scale screening suggested that YTHDC2 is necessary for the synthesis of the HIV-1 Gag protein. In this work it is proposed that YTHDC2 is an m⁶A reader of the full-length HIV-1 RNA that post-transcriptionally regulates viral gene expression at

the level of translation and seeks to characterize the regulatory mechanism through the functional evaluation of wild type YTHDC2 and mutants of its helicase, m⁶A binding (YTH), R3H and ANK domains in cells transfected with an HIV-1 provirus, using tools such as reporter gene assay, Western blotting, gene silencing, and confocal microscopy. In this work, we show that the over-expression of YTHDC2 increases the synthesis of Gag, that its silencing decreases it, and that it can associate with the full-length HIV-1 RNA. Besides, we note the importance of the helicase and YTH domains for the synthesis of Gag as well as the helicase, YTH, R3H and ANK domains for the association with the HIV-1 RNA. These results obtained suggest that the abundance of YTHDC2 modulates the synthesis of Gag and the full-length HIV-1 RNA levels.

Introducción

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y se transmite principalmente mediante vía sexual, parenteral y perinatal. VIH/SIDA se ha convertido en una de las pandemias más devastadoras del último tiempo; cuando la infección no está bajo control el VIH destruye las células del sistema inmune, conllevando a la aparición de enfermedades oportunistas y a la muerte. Se estima que más de 38 millones de personas en el mundo están infectadas con VIH y cada año cerca de 2 millones de nuevos casos son reportados (Gillespie et al., 2019; Dabis & Becker., 2017). Encontrar la cura o nuevos blancos terapéuticos para el VIH/SIDA representa uno de los mayores desafíos de la ciencia actual y requiere un profundo entendimiento de cómo es la interacción entre el virus y la célula infectada.

Se han identificado dos tipos de VIH de orígenes diferentes, VIH-1 y VIH-2, siendo el primero el responsable de la pandemia actual (Sharp et al., 2010). El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) pertenece al género lentivirus de la familia *Retroviridae* y corresponde a un virus envuelto con un tamaño entre los 80 y 100 nm. La partícula viral (Figura 1A) posee las glicoproteínas de superficie gp120 y gp41, una matriz por debajo de la envoltura (formada por la proteína p17) y dentro de ella la cápside viral (formada por la proteína p24) que alberga el material genético viral (ssARN de polaridad positiva) y las proteínas asociadas a él p6 y p7, además de enzimas necesarias para su ciclo replicativo: integrasa (IN), proteasa (PR) y la transcriptasa inversa (RT) (Delgado., 2011). El VIH-1 infecta a las células del sistema inmune, incluyendo linfocitos-T, células dendríticas, macrófagos y microglías (Rohr et al., 2003).

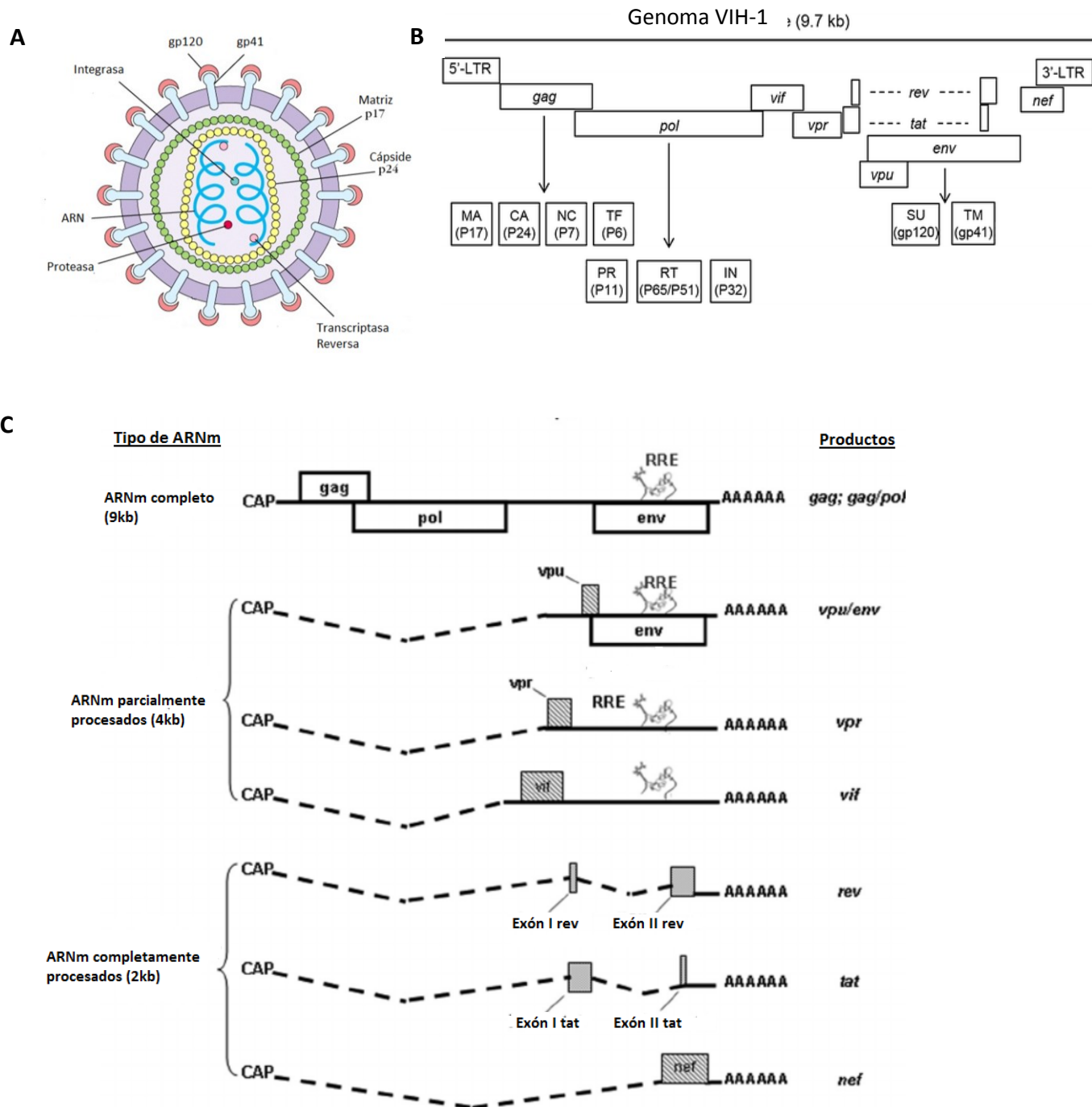


Figura 1: Estructura del VIH y organización de su genoma. Figura 1A: Representación esquemática de una partícula de VIH donde se señalan sus componentes estructurales: glicoproteínas de superficie y transmembrana gp120 y gp41; matriz proteica formada por la proteína p17; cápside formada por la proteína p24, material genético del virus (ssARN positivo) y las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa inversa. Figura extraída y modificada de (Sears, 2009). **Figura 1B:** Organización del genoma del VIH-1 indicando sus genes y productos proteicos. Imagen extraída de (Nkeze et al., 2015). **Figura 1C:** tipos de especies de ARNm de VIH-1 originadas a partir del procesamiento por corte y empalme. Imagen modificada de (Svicher, V et al., 2009).

Ciclo replicativo de VIH y su expresión génica

El ciclo replicativo del virus comienza cuando la glicoproteína viral gp120 hace contacto con el receptor celular CD4 y un correceptor, que puede ser el receptor β -quimioquina CCR5 o con el receptor 4 de quimioquinas del tipo CXC, CXCR4, lo que permite la fusión de la membrana viral y celular catalizado por gp41 y el subsecuente ingreso de la cápside a la célula. Una vez en el citoplasma, la cápside se desintegra liberando el ARN genómico viral (ARNg) (Wilén et al., 2012). La RT mediará la conversión de ARN a ADN de doble hebra (dsADN). Este ADN proviral junto con proteínas virales y celulares forman el denominado complejo de preintegración (PIC), el que es traslocado al núcleo celular, donde por medio de la enzima integrasa (IN) es integrado en un cromosoma hospedero en un sitio al azar, pero preferentemente en uno con alta tasa de transcripción (cromatina descondensada) estableciendo, de esta forma, el estado de provirus (Figura 2) (Avendaño, 2011).

La transcripción del ADN proviral es llevada a cabo por la enzima ARN polimerasa II, la que reconoce un promotor presente en la región 5'LTR del provirus y da lugar a un ARN mensajero (ARNm) viral de 9kb idéntico al ARNg viral. La presencia de señales de corte y empalme en el transcrito viral permite mediar su procesamiento por corte y empalme alternativo, dando origen a más de 100 transcritos diferentes que van a codificar las 9 proteínas virales (Figura 1B) (Ocwieja et al., 2012). Los ARNm virales se clasifican de acuerdo al tamaño que poseen: ARNm no procesado o completo (9kb), ARNm parcialmente procesados (4kb) y ARNm completamente procesados (2kb) (Figura 1C). El transcrito de 9kb o ARN mensajero completo (ARNmc) codifica las poliproteínas estructurales Gag y Gag-Pol. Este ARNmc sufre procesamiento por corte y empalme para dar lugar a los transcritos parcialmente procesados que codifican la glicoproteína de superficie Env y las proteínas accesorias Vpu, Vif y Vpr, y los completamente procesados que dan origen a las proteínas reguladoras Tat y Rev, y la proteína accesoria Nef (Ocwieja et al., 2012; Cullen, 1998).

El ARNmc de VIH-1 tiene la dualidad de ser usado como ARNm o como el genoma que se empacará en una nueva partícula viral. Una vez sintetizada la poliproteína Gag ella interactuará con un dímero de ARNmc a través de su dominio nucleocápside, el que se dirigirá a la membrana de la célula donde se ensamblará una nueva partícula viral, la que será liberada por gemación y ya fuera de la célula madurará y comenzará otro ciclo replicativo de VIH-1 (Figura 2) (Freed et al., 2015).

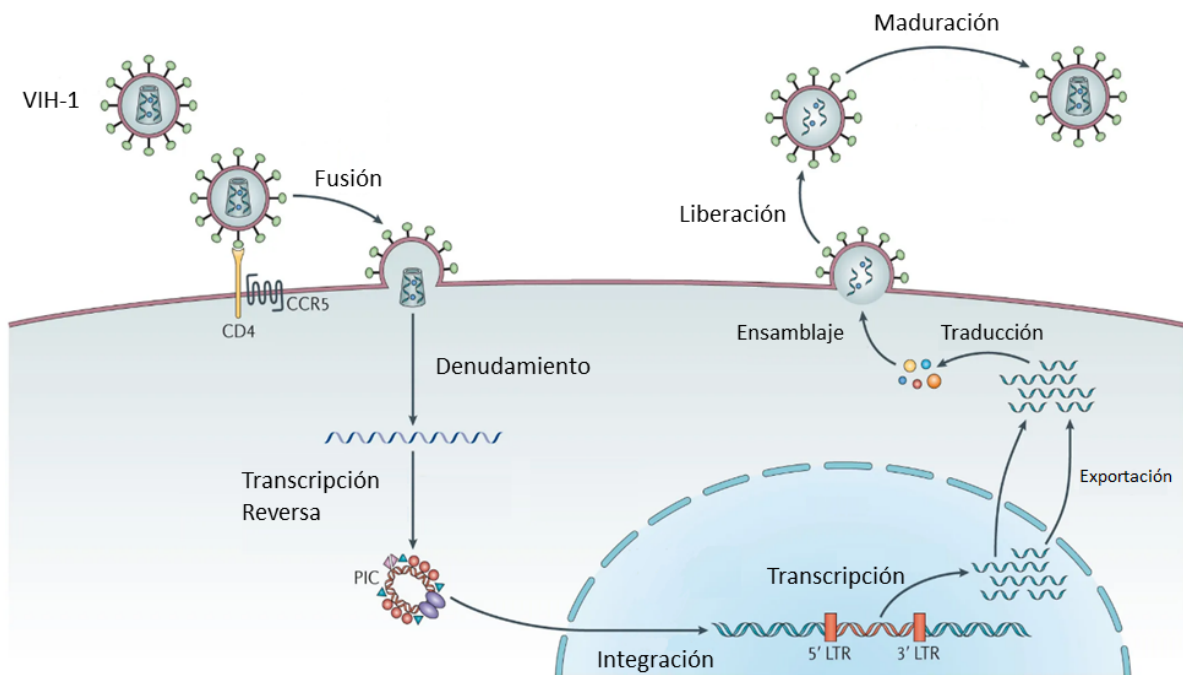


Figura 2: Ciclo replicativo del VIH. Esta ilustración representa las diferentes etapas del ciclo replicativo de VIH: comienza con la fusión de la membrana viral con la de la célula hospedera, lo que permite el denudamiento y la liberación del material genético viral (ARN) en la célula. Este ARN es retrotranscrito a ADN en la transcripción reversa, el que se asocia a proteínas para formar el PIC que es trasladado al núcleo y en donde se producirá la integración del ADN viral al genoma de la célula hospedera, para luego comenzar con la transcripción de este. Los transcritos de VIH son exportados y traducidos, para luego comenzar el ensamblaje de una nueva partícula viral, la cual es liberada y posteriormente madura para comenzar con un nuevo ciclo de replicación (imagen extraída y modificada de Barré-Sinoussi et al., 2013).

Control de la expresión génica y modificaciones del ARN

La expresión génica es un proceso altamente regulado que permite a la célula expresar diferencialmente sus productos proteicos en un momento determinado. Este proceso es muy importante durante el desarrollo y diferenciación, donde se requiere apagar y encender la expresión de ciertos genes, y es un proceso regulado a nivel de ADN, ARN o proteína (Jaenisch & Bird, 2003; O'Connor & Adams, 2010). La regulación sobre el ARN permite a la célula responder de manera más rápida y eficiente a cambios ambientales, ya que se evita la síntesis de un nuevo transcrito y además cientos de proteínas pueden producirse a partir de un solo transcrito (Siomi & Dreyfuss, 1997), por lo que el ARN es un excelente punto de control primario para regular la expresión génica. Las modificaciones sobre los ARN han sido bien documentadas por más de 50 años y ya en la década del 50 se habían descubierto nucleótidos modificados (Xao et al., 2017; Davis & Allen, 1957). La regulación sobre un ARNm se conoce como regulación post-transcripcional, donde el *capping* (m7G) y la poliadenilación (PoliA) en el extremo 3' son las modificaciones post-transcripcionales más conocidas (Figura 3) que ocurren sobre un ARNm no maduro, modificaciones que son esenciales para contribuir a la estabilidad del transcrito, la exportación nuclear, el inicio de la traducción y otros procesos (Zhao et al., 2017; Roundtree et al., 2017).

Modificaciones del ARN mensajero

Aunque las modificaciones químicas de los ARN habían sido largamente conocidas por ser prevalentes, diversas y altamente conservadas, su función y ocurrencia sobre los ARN mensajeros recibió poca atención en el siglo pasado, debido principalmente a la carencia de técnicas adecuadas para su detección y caracterización. Sin embargo, durante los últimos 10 años y gracias al desarrollo de tecnologías basadas en inmunoprecipitación acoplada a secuenciación masiva paralela, este campo ha reemergido y podremos responder a las

preguntas de cómo estas modificaciones químicas sobre los ARNm afectan la expresión génica global (Frye et al., 2016).

El ARN de todos los organismos vivos puede ser modificado químicamente y a la fecha, se han descrito más de 150 diferentes tipos de modificaciones que el ARN puede sufrir (<https://mods.rna.albany.edu/mods/>). Además del *capping* y la poliadenilación, las modificaciones internas N6-metiladenosina (m^6A), 5-metilcitosina (m^5C) y pseudouridina (Ψ) aparecen como las más representadas en los ARNm de eucariontes, además de otras modificaciones que se detallan en la Figura 3 (Gilbert et al., 2016). Aunque algunas de estas modificaciones fueron descritas desde el año 1970 como la N⁶-metiladenosina (Rottman et al., 1974), no fue hasta el desarrollo de la estrategia de MeRIP-seq (secuenciación de la inmunoprecipitación de ARNs metilados) en 2012 que el estudio de la regulación mediada por m^6A retomó relevancia en el mundo científico (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012).

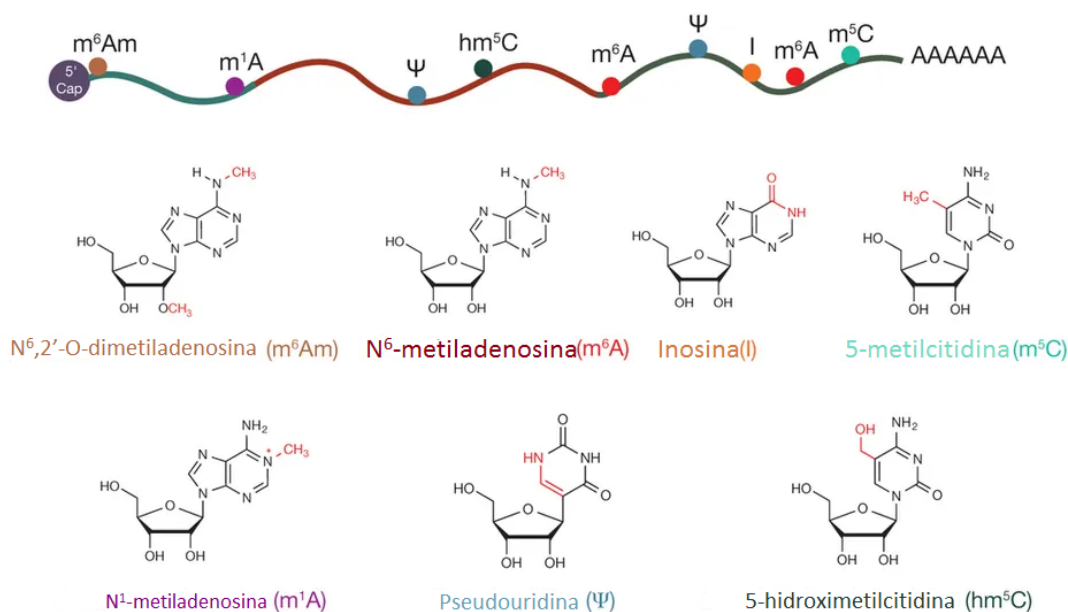


Figura 3: Modificaciones químicas en el ARNm. Esta figura resume las principales modificaciones químicas que ocurren sobre los ARNm de Eucariontes. La N⁶, 2'-O-dimetiladenosina (m^6Am), la N⁶-metiladenosina (m^6A), la Inosina (I), la 5-metilcitosidina (m^5C), la N¹-metiladenosina (m^1A), la Pseudouridina (Ψ) y la 5 hidroximetilcitosidina (hm^5C). Figura modificada de (Li et al., 2017).

Modificación N⁶-metiladenosina (m⁶A)

La N⁶-metiladenosina o m⁶A es la modificación interna más abundante presente en los ARNm de eucariontes y corresponde a la metilación en la posición N6 de una adenosina en un ARN. Esta modificación es altamente conservada y ha sido descrita en eucariontes, incluyendo levaduras, plantas, moscas y mamíferos (Yue et al., 2015) y se ha visto que es importante para el desarrollo, ya que la pérdida de la metilación m⁶A afecta procesos clave como el desarrollo embrionario de plantas, el desarrollo y la determinación de sexo en *Drosophila* o la diferenciación de células madres embrionarias de mamíferos (Kennedy et al., 2017). El estudio de las funciones de m⁶A en la regulación de la expresión génica ha tomado relevancia en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, que han permitido la identificación de nucleótidos modificados a nivel de transcriptoma. Esta información junto con análisis funcionales y la identificación del dinamismo de esta modificación con proteínas capaces de escribir, borrar y leer tales modificaciones han llevado al nacimiento de una nueva capa de regulación de la expresión génica que se conoce como epitranscriptómica (Pereira-Montecinos et al., 2017).

La metilación m⁶A ocurre preferencialmente en la secuencia consenso RRACH (R= G o A; H= A, C o U) y se localiza predominantemente cerca de codones de término y en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR), aunque también se pueden encontrar en las regiones codificantes (CDS) (Meyer & Jaffrey, 2017; Zhao et al., 2017). La principal característica de esta modificación es que es dinámica, reversible y es regulada por 3 grupos diferentes de proteínas conocidas como “escritoras”, “borradoras” y “lectoras” (Figura 4) (Lee et al., 2014). La metilación m⁶A es catalizada por las “escritoras”, un complejo de proteínas compuesto por un heterodímero entre la metiltransferasa tipo 3 (METTL3) y la metiltransferasa tipo 14 (METTL14), junto con la proteína asociada al tumor de Wilms (WTAP) y otros cofactores donde solo METTL3 posee la actividad catalítica (Wang et al., 2017).

El grupo metilo puede ser removido por dos desmetilasas de m⁶A, la proteína asociada a la obesidad y la masa grasa (FTO) y la proteína 5 homóloga de dioxigenasa alkB dependiente de alfa-cetoglutarato (ALKBH5), también conocidas como “borradoras” (Jia et al., 2011; Zheng et al 2013). La m⁶A es reconocida principalmente por miembros de la familia de proteínas homólogas a YT521 (YTH) a las que pertenecen 5 proteínas que contienen el dominio YTH: YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 e YTHDC2 las que se denominan “lectoras”, donde YTHDF1-3 e YTHDC2 son lectoras citoplasmáticas e YTHDC1 es una lectora nuclear (Zhang et al., 2010). Son estas proteínas lectoras las que median las consecuencias funcionales de m⁶A, controlando la estabilidad, abundancia y procesamiento de los ARNs metilados e influyendo sobre la eficiencia de su traducción (Kennedy et al., 2017; Zheng et al., 2013; Xu et al., 2014; Morohashi et al 2011).

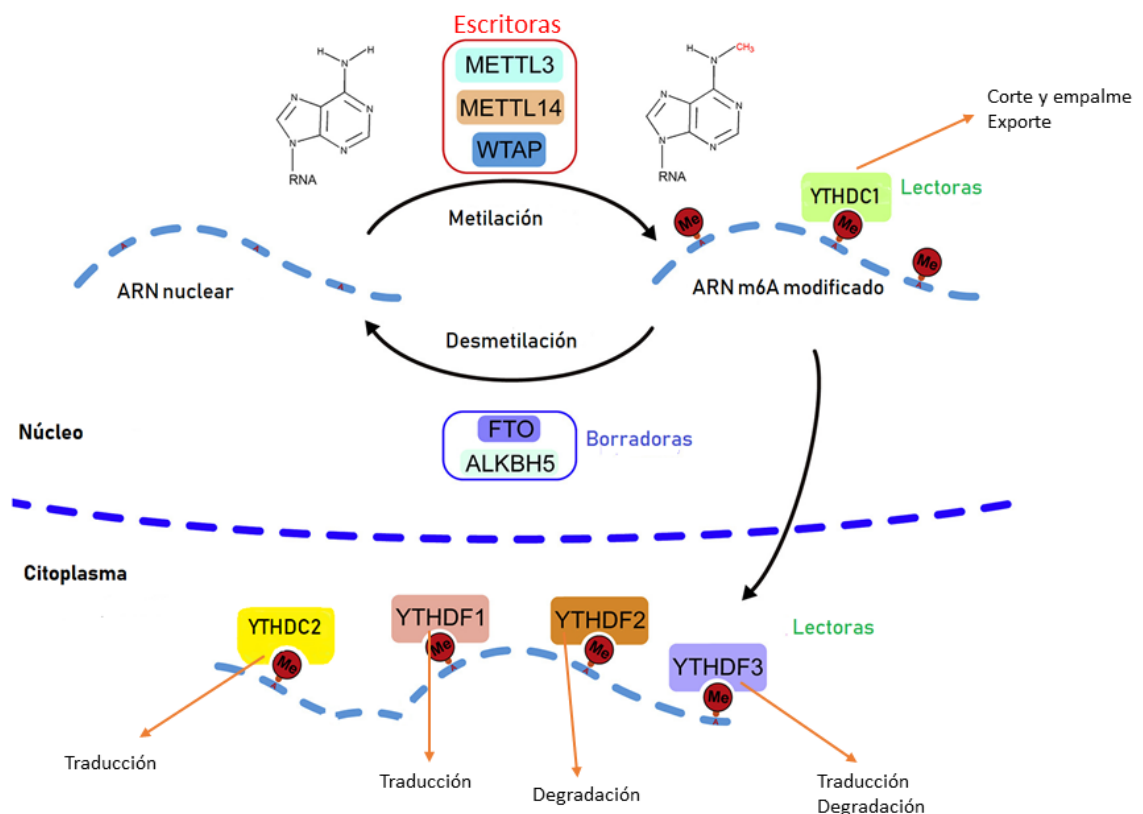


Figura 4: Dinámica de la modificación m⁶A. Dinamismo de la modificación N6-metiladenosina, reacción de metilación sobre adenosinas en ARNm catalizada por las proteínas escritoras (METTL3, METTL14 y WTAP), reversible mediante las proteínas borradoras (FTO y ALKBH5) y funcionalizada a través de las proteínas lectoras (YTHDF1-3, YTHDC1 e YTHDC2). Imagen extraída y modificada de (Wang et al., 2017).

N⁶-metiladenosina en VIH-1

Se ha estimado que los ARNm celulares de mamíferos contienen 3 residuos m⁶A en promedio y que los ARN virales contienen aproximadamente 15 residuos m⁶A (Kennedy et al., 2017). Interesantemente, se ha encontrado que algunos virus como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la influenza A (IAV), virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus del sarcoma de rous (RSV), virus zika (ZIKV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) y otros, contienen residuos m⁶A (Pereira-Montecinos et al., 2017).

Tres grupos independientes han mostrado que el ARN genómico o ARN mensajero completo (ARNmc) de VIH-1 contiene modificaciones m⁶A, aunque con algunas discrepancias en la ubicación y abundancia de las metilaciones, que puede ser debida a las diferentes aproximaciones experimentales que utilizan para la identificación de los sitios metilados (Lichinchi et al., 2016; Kennedy et al., 2016; Tirumuru et al., 2016). De todas formas, se puede decir que estas modificaciones se localizan preferencialmente más cerca de la región 5' y 3' UTR del ARNmc de VIH-1 (Riquelme-Barrios et al., 2018). La modificación m⁶A es importante en el ciclo replicativo de VIH-1 porque se ha observado que el silenciamiento de las metiltransferasas METTL3 y/o METTL14 reduce la replicación de VIH-1 mientras que el silenciamiento de la desmetilasa ALKBH5 aumenta la replicación viral (Lichinchi et al., 2016; Tirumuru et al., 2016).

También se ha reportado que las lectoras YTHDF1-3 cumplen un rol positivo en la expresión génica viral pues cuando son sobre-expresadas aumenta la síntesis de proteínas de VIH-1 (Kennedy et al., 2016). Por otra parte, también se ha reportado que las lectoras YTHDF1-3 cumplen un rol negativo inhibiendo la infección post-entrada de VIH-1 al inducir una disminución de los productos tempranos y tardíos de la RT debido a la degradación del ARNg entrante (Tirumuru et al., 2016; Lu et al., 2018).

Otro grupo encontró que una modificación m⁶A en una región del ARNg de VIH-1 denominada RRE (elemento de respuesta a Rev) promovería la exportación nuclear, al facilitar la unión de la proteína viral Rev a este sitio modificado (Lichinchi et al., 2016). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó la importancia de la modificación m⁶A en la región 5'-UTR del ARNg de VIH como determinante para establecer cual ARNg será traducido y cuál será empacado en una partícula viral naciente (Pereira-Montecinos et al., 2019).

Dominio YTH y lectoras de m⁶A

El miembro más antiguo de la familia de lectoras de m⁶A es la proteína humana YT521-B (hoy en día llamada YTHDC1), la cual fue identificada como un factor de *splicing* en el año 1998 (Imai et al., 1998). Análisis bioinformáticos posteriores dieron cuenta que esta proteína poseía una región altamente conservada y predicha a unir secuencias de ARN a la cual denominaron dominio YTH. Este dominio fue encontrado exclusivamente en eucariontes e incluyendo 5 representantes en la especie humana: YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 (Hazra et al., 2019). El dominio YTH se caracteriza por ser altamente conservado a través de la evolución y tener un tamaño de 100 a 150 aminoácidos, además por poseer 14 residuos invariantes y 19 altamente conservados, y estar compuesto por 4 o 5 alfa hélices y 6 cadenas beta (Zhang et al., 2010). Los análisis estructurales del dominio YTH han mostrado que posee un bolsillo tipo jaula formado por residuos aromáticos conservados donde se acomoda el grupo metilo de m⁶A el que se uniría mediante enlaces puente de hidrogeno (Xu et al., 2014).

Rol de las lectoras de m⁶A

Las proteínas humanas YTHDF1-3 se localizan en el citoplasma y se componen de un solo dominio YTH ubicado en la región C-terminal además de una región N-terminal con dominios de baja complejidad (Hazra et al., 2019). Estas 3 proteínas son altamente homólogas con un 85% de similitud en su secuencia (Figura 5); sin embargo, se sugiere que a pesar de tener un alto porcentaje de homología en su secuencia son capaces de mediar funciones diferentes, por ejemplo YTHDF1 participa aumentando la eficiencia de traducción de ciertos transcritos a los cuales se asocia de una manera dependiente de m⁶A (Wang et al., 2015), YTHDF2 promueve la degradación de sus transcritos blanco (Wang et al., 2014) e YTHDF3 promueve la traducción al asociarse con YTHDF1 y aumenta la degradación de sus transcritos blancos al asociarse con YTHDF2, aunque también se ha demostrado que puede mediar funciones independientes a la asociación con esta dos lectoras de m⁶A (Hazra et al., 2019; Zhang et al., 2019). Por su lado, YTHDC1 se localiza en el núcleo y se ha visto que participa en los procesos de exportación nuclear y *splicing* (Xiao et al., 2016) e YTHDC2 se localiza en el citoplasma y participa en la traducción (Figura 4) (Tanabe et al., 2016).

YTHDC2: Helicasa de ARN y lectora de m⁶A

La Proteína 2 que Contiene el Dominio YTH o YTHDC2 es una proteína de 1430 aminoácidos, con un peso molecular de 160 kDa y es un miembro de la familia de Helicasas de ARN dependientes de ATP con caja DExD/H y también de la familia de lectoras de m⁶A con dominio YTH (Wojitas et al., 2017). Las Helicasas de esta familia cumplen múltiples funciones en el metabolismo del ARN, participando en la transcripción, el corte y empalme y la traducción, siendo su principal rol desenrollar estructuras de ARN de doble hebra utilizando ATP (Wojitas et al., 2017). Estas Helicasas de ARN se caracterizan por contener un dominio central en tándem de dominios tipo RecA (RecA1 y RecA2), los cuales están conectados mediante un *linker* flexible y contiene hasta 12 secuencias de motivos conservados involucrados en la interacción con el substrato de ARN, en la unión e hidrolisis

de NTP y en la coordinación de la actividad Helicasa (Sloan & Bohnsack, 2018). Hacia el amino terminal contiene el dominio R3H, involucrado en la unión de ácidos nucleicos, los dominios Rec1 y Rec2 (o dominios Helicasa), en medio de estos dominios Helicasa contiene el dominio ankirina (ANK), el cual es conocido por mediar interacciones proteína-proteína y hacia el extremo C-terminal el dominio YTH, el que une a m⁶A (Hsu et al., 2017).

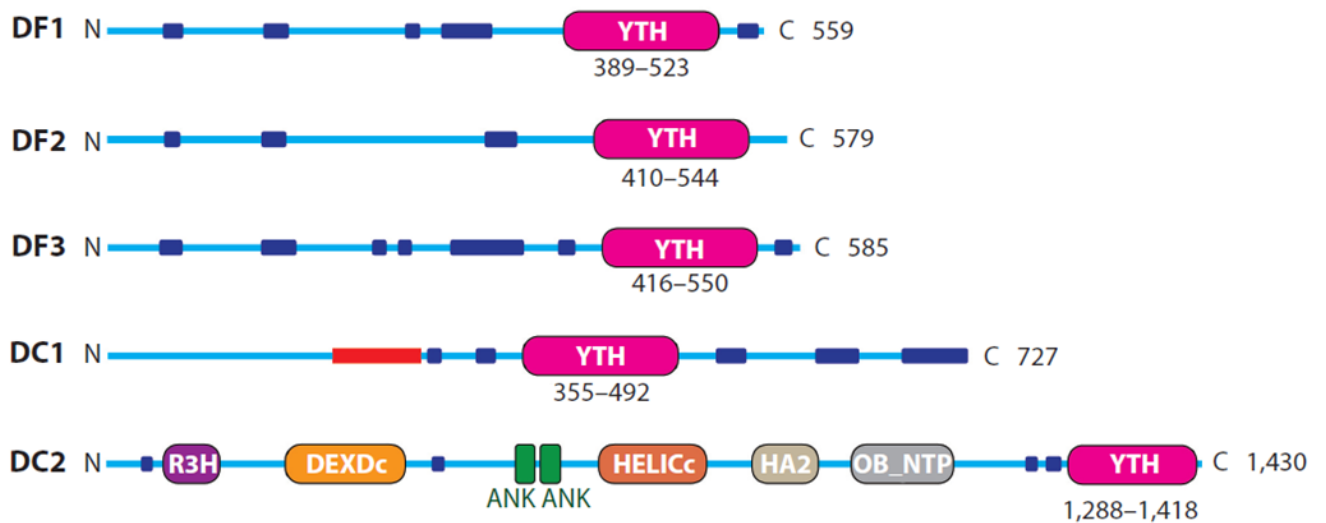


Figura 5: Dominios de las lectoras YTH. Miembros de la familia YTH: YTHDF1 (DF1), YTHDF2 (DF2), YTHDF3 (DF3), YTHDC1 (DC1), YTHDC2 (DC2) y los dominios que contienen. Se observa la clara diferencia de la secuencia de YTHDC2 con las demás lectoras. Las zonas azules indican regiones de baja complejidad y la roja una región rica en glutamina. Imagen extraída de (Meyer & Jaffrey, 2017), HA2 indica dominio asociado a Helicasa y OB_NTP significa *Oligonucleotide Binding*.

YTHDC2 se localiza mayoritariamente en el citoplasma y en el retículo endoplásmico (Morohashi et al., 2011) y está involucrada en diferentes procesos, principalmente asociado a la traducción de sus ARNm blanco, facilitando la traducción de ARNm que contienen regiones 5'UTR altamente estructuradas, ya que se ha observado que facilita la traducción del ARNm de HIF-1 y Twist-1 durante hipoxia (Tanabe et al., 2016). YTHDC2 también es esencial en procesos del desarrollo como la espermatogénesis, donde facilita el apropiado desarrollo de los espermatozoides (Hsu et al., 2017). Además, se han encontrado alterados los niveles de YTHDC2 en patologías como el cáncer pues se ha encontrado que su abundancia está aumentada en varias células cancerosas y que contribuye a la metástasis del cáncer de colon (Tanabe et al., 2016). También ha sido reportado que facilita la transición de mitosis a meiosis en células germinales de ratón (Bailey et al., 2017) y que su silenciamiento disminuye la replicación del genoma del virus de la hepatitis C (Morohashi et al., 2011). Además, recientemente se reportó que YTHDC2 promueve la traducción global y que se une preferencialmente a las regiones CDS de los transcritos modificados con m⁶A para resolver las estructuras secundarias presentes en esta región y promover la eficiencia de traducción (Mao et al., 2019).

Aunque se ha demostrado que YTHDC2 prefiere unirse a secuencias que contienen m⁶A *in vitro* (Bailey et al., 2017), no está claro si funciona mediante el reconocimiento de m⁶A en sus ARNm blancos ni tampoco si los otros dominios de unión a ARN que posee pueden mediar funciones independientes de su unión a m⁶A. Al menos *in vitro* se ha demostrado que la delección del dominio YTH no afecta su unión a ARN (Wojitas et al., 2017), pero creemos que el dominio YTH le otorgaría la selectividad para regular ARNs m⁶A metilados.

Estas características convierten a YTHDC2 en una Helicasa de ARN y lectora de m⁶A con propiedades únicas, y a pesar de que es una de las lectoras de YTH que no se ha caracterizado su rol durante la infección de VIH-1, se tiene un antecedente de un *screening* a larga escala realizado el año 2008 donde el grupo de Brass y colaboradores mediante el uso de una genoteca de siARN identificaron proteínas hospederas necesarias para la replicación de VIH-1. Este trabajo identificó a YTHDC2 como una proteína que es requerida para la replicación viral, ya que cuando se silencia YTHDC2 se inhibe la síntesis de p24 (Gag) en células TZM-bl (células HeLa modificadas) infectadas con VIH-1 (Brass et al., 2008). Aunque esta observación no fue posteriormente confirmada en ese trabajo, u otros siguientes, es un antecedente que da cuenta de lo interesante que es estudiar el rol de esta proteína hospedera en el ciclo replicativo y expresión génica del virus VIH-1. Es por estos antecedentes que en este trabajo se propone evaluar si YTHDC2 actúa sobre el ARNm de VIH-1 para regular post-transcripcionalmente la traducción del ARNm y conocer si esta regulación es dependiente del dominio YTH, el que probablemente le otorgue especificidad a esta Helicasa de actuar sobre este ARNm viral m⁶A modificado.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La proteína YTHDC2 promueve la traducción del ARNmc de VIH-1 en un mecanismo dependiente de su dominio YTH.

Objetivo General

Determinar si YTHDC2 promueve la traducción del ARNm completo de VIH-1 mediante un mecanismo dependiente de su dominio YTH.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1.
2. Determinar si el dominio YTH de YTHDC2 es requerido para mediar la síntesis de Gag de VIH-1.
3. Evaluar el impacto de YTHDC2 en la eficiencia de traducción del ARNm completo de VIH-1.

Materiales y Métodos

Vectores de ADN

Los vectores pNL4.3, pNL4.3R, pCIneoR, pcDNA-d2EGFP, pCIneo-HA-d2EGFP y pcDNA3.1, fueron previamente descritos en (Adachi et al., 1986; Soto-Rifo et al., 2012; Toro-Ascuy et al. 2018; Monette et al., 2009). El vector pcDNA3.1-Flag-YTHDC2 fue adquirido a través de GenScript. Los vectores pCIneo-NHA-YTHDC2 WT, pCIneo-NHA-YTHDC2-D/Q, pCIneo-HA-YTHDC2- Δ YTH, pCIneo-HA-YTHDC2- Δ R3H y pCIneo-HA-YTHDC2- Δ ANK fueron donados por el profesor Dr. Ramesh Pillai (Universidad de Ginebra) previamente descritos (Wojitas et al., 2017). Los vectores pCIneo-HA-YTHDC2 WT y pCIneo-HA D/Q fueron obtenidos a través de la digestión de los vectores pCIneo-NHA-YTHDC2 WT y pCIneo-NHA-YTHDC2 D/Q utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *NheI* (New England Biolabs).

Digestión de vectores pCIneo-NHA

Brevemente, se tomó 10 μ g de los vectores pCIneo-NHA-YTHDC2 WT y pCIneo-NHA-YTHDC2-D/Q y se digirieron con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI* (NEB) durante toda la noche a 37°C, luego 1 μ g de la reacción se cargó en un gel de agarosa al 1% para corroborar la digestión (datos no mostrados). Estos vectores digeridos se precipitaron con etanol 100%, se desfosforilaron y se rellenó con nucleótidos utilizando la polimerasa PFU ultra (Agilent), se precipitó este ADN con etanol 100% y se fosforiló, para finalmente ligar con la enzima ligasa T4 (NEB) y transformar bacterias quimio-competentes *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias y se realizó purificación de ADN, el que luego se secuenció utilizando el servicio de secuenciación de ADN de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas se alinearon con la del vector pCIneo-NHA-YTHDC2 WT sin digerir para verificar la pérdida de la región que codifica el péptido N.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados en este trabajo son anti *mouse* HA (Santa Cruz) dilución 1:200, anti *rat* Flag (Biolegend) dilución 1:5000, anti *mouse* p24 (NIH AIDS Reagent Program) dilución 1:1000, anti *mouse* GAPDH (Santa Cruz) dilución 1:10000, anti *rabbit* Renilla Luciferasa (MBL) dilución 1:1500, anti *mouse* GFP (Santa Cruz) dilución 1:5000, anti *rabbit* YTHDC2 (Novus Biologicals) dilución 1:2000, anti *mouse* β -actina (Abcam) dilución 1:10000. Los anticuerpos (*rat*, *mouse* y *rabbit*) secundarios conjugados a HRP (Jackson ImmunoResearch) se utilizaron a la dilución 1:5000. Los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos Alexa fluor fueron obtenidos en LifeTechnologies (Molecular Probes) y usados a una dilución de 1:500.

Cultivo Celular y Transfección de ADN

En este trabajo solo se utilizó la línea celular humana HeLa (gentilmente donada por el Dr. Théophile Ohlmann, ENS-Lyon, Francia). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Hyclone) y 1% de mix Penicilina/Estreptomina (Sigma-Aldrich), 1% de Glutamina (Corning) y mantenidas en un incubador a 37°C y con CO₂ al 5%. Las células fueron transfectadas usando Polietilenimina (PEI) a 300mg/L (Polysciences) y siguiendo el procedimiento previamente descrito (Reed et al., 2006). Una vez realizada la transfección las células se mantuvieron en el incubador por 24 horas hasta ser lisadas.

Ensayo de actividad de la Luciferasa de Renilla

Se siguió el procedimiento previamente descrito (Soto-Rifo et al., 2012). Brevemente, las células transfectadas con el vector reportero fueron lisadas con el buffer de lisis contenido en el kit *Renilla Reporter Assay System* (Promega), luego se cargaron 20 μ l de muestra en una placa de 96 pocillos y esta se cargó en un luminómetro GLOMAX, utilizando el sustrato contenido en el kit y siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega).

Western Blot

La identificación de proteínas mediante *Western blot* se llevó a cabo como se describe a continuación. Las células fueron cosechadas y lisadas con *buffer* de lisis hipotónico (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1% Tritón X-100, 2 mM VRC, *cocktail* de inhibidores de proteasa 1x), las muestras se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 10 minutos y se descartó el *debris* celular. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y las muestras se desnataron por 10 minutos a 95°C en un *buffer* de carga reductor. Luego se realizó una electroforesis SDS-PAGE utilizando un gel de poliacrilamida en gradiente del 5-15% de poliacrilamida y 20 µg de proteína por carril.

La electroforesis se realizó a 120 V durante 2 horas, luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond (GE Healthcare) a 4°C durante 2 horas a 400 mA. La membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando la solución de bloqueo al 5% (BioRad) en TBS-T. Los correspondientes anticuerpos primarios se prepararon a la dilución deseada empleando solución de bloqueo al 0.5% en TBS-T durante toda la noche a 4°C, luego la membrana se lavó 2 veces con una solución de TBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP en una solución de bloqueo al 0.5% en TBS-T durante una o dos horas a RT.

Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T por 10 minutos y se incubó con el sustrato para revelado Pierce ECL (ThermoFisherScientific) o Immobilon (Milipore) para luego visualizar la presencia de bandas usando *films* fotográficos, el equipo revelador *HD9 Western blot Imaging System* (UVItec) (Laboratorio de Canales Iónicos, ICBM, Universidad de Chile) o el *BioRad ChemiDoc Imaging System* (Instituto Lady Davis, Montreal, Canadá). El análisis de las intensidades de banda se llevó a cabo utilizando la plataforma ImageJ (NIH) e ImageLab (BioRad).

Silenciamiento de la expresión de YTHDC2 mediante ARN interferente

Se utilizó un siARN (Qiagen) con blanco en la región 3'UTR del ARN mensajero de YTHDC2 (No. Catalogo - SI05081489). Como control se utilizó el *siRNA negative control* (siNS) (Qiagen) descrito previamente en Gordon, 2013. Estos siARN fueron transfectados en células HeLa a una concentración de 25 nM, utilizando el reactivo de transfección de ácidos nucleicos JetPrime (Polyplus) y siguiendo las indicaciones del proveedor. Las células fueron sembradas el día 1, y la transfección de los siARN se realizó a las 24 y 48 horas. A las 72 horas luego de ser sembradas las células fueron lisadas con buffer de lisis hipotónico, como se describe en (Gordon et al., 2013). Las muestras se centrifugaron a 13000 RPM por 10 minutos, se descartó el *debris* celular y la concentración de proteínas se calculó utilizando el método de Bradford para posteriormente realizar un *Western blot* utilizando 20 µg de extracto de proteínas.

Inmunofluorescencia Indirecta

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y fueron transfectadas como se describe en la metodología para el silenciamiento de YTHDC2. A las 24 hpt las células se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron 10-20 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS, se lavaron 2 veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en PBS. Luego se bloqueó con la solución de bloqueo 1x para IF (BSA 2% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con PBS y se incubó con anticuerpos primarios en una dilución 1:250 durante 1 hora a RT, se lavó 2 veces con PBS y se incubó con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (Molecular Probes) dilución 1:500 en PBS. Las soluciones de anticuerpos antes de ser añadidos a las células se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos.

Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS 1x, una vez con agua ultra pura, se incubó con DAPI 1x por 1 minuto y se lavó 3 veces con PBS y los cubreobjetos se dejaron secar para luego ser montados en un portaobjetos usando solución de montaje (ThermoFisherScientific) y sellados con esmalte de uñas (Revlon). Las células fueron visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM5 (Instituto Lady Davis, Montreal) recorriendo la totalidad de la superficie de los cubreobjetos por dos observadores y capturando imágenes usando el aumento 63x. Se utilizó la plataforma Imaris (Bitplane) para el análisis de imágenes.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del ARNmc de VIH-1 con IFI (FISH-IFI)

Células HeLa fueron cultivadas sobre un cubreobjetos y transfectadas con el vector viral de VIH-1 y el vector que expresa a Flag-YTHDC2 o HA-YTHDC2. Después de 24 horas las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con Tritón X-100 0,2% por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se hibridaron con una sonda que detecta el ARNm no procesado de VIH-1, contenida en un mix de hibridación (10% sulfato dextrano, 2mM VRC, 0,02% BSA *RNasa free*, 50% Formamida, 300 µg de tARN y 50ng de la sonda UTP-digoxigenada que reconoce el ARNmc de VIH-1 (Soto-Rifo et al., 2013) durante toda la noche en una cámara húmeda a 37°C. Luego, los cubreobjetos se lavaron con 0.2× SSC/50% formamida por 30 min a 50°C y se lavaron 3 veces con la solución de dilución de anticuerpos (2× SSC, 8% formamida, 2 mM VRC, 0.02% BSA *RNase-free*). Los anticuerpos anti-*mouse*-digoxina (Sigma-Aldrich) y anti-*rat* Flag (Sigma-Aldrich) o anti-*mouse*-HA (Merck), diluidos en solución de dilución de anticuerpos y a una dilución de 1:250 se añadieron e incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavó 3 veces con la solución de dilución de anticuerpos y se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados a *Alexa fluor dye* (Molecular Probes) por 90 min a temperatura ambiente a una dilución 1:500.

Después se lavó 3 veces con solución de lavado (2xSSC, 8% Formamida, 2mM VRC), 1 vez con PBS y 1 vez con agua ultra pura, se incubó con solución DAPI 1x (0.3 g/ml en PBS) (Life Technologies), se lavó 1 vez con PBS y 1 vez con agua ultra pura, se dejaron secar los cubreobjetos y se montaron en un portaobjetos limpio con solución de montaje *Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium* (Sigma-Aldrich) y finalmente fueron visualizados en un microscopio confocal Zeiss LSM800 (Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile) con aumento de 63x y se usó FIJI/ImageJ (NIH) como herramienta para visualizar y editar las imágenes.

Hibridación *in situ* Fluorescente acoplada al Ensayo de Ligación Proximal (ISH-PLA)

En el caso de realizar un ISH-PLA, se siguió exactamente el mismo procedimiento descrito para la Hibridación *in situ* Fluorescente del ARNmc de VIH-1, descrito anteriormente hasta la incubación con anticuerpos primarios, donde en este caso se utilizó un anticuerpo primario anti *mouse* digoxigenina (Sigma-Aldrich) y anti *rabbit* Flag (SantaCruz) o anti *rabbit* HA (SantaCruz), luego se lavó con solución de dilución de anticuerpos y los cubreobjetos se incubaron con 10 µl de solución de anticuerpos secundarios para PLA (2 µl de Probe Anti-Mouse MINUS (Sigma-Aldrich), 2 µl de Probe Anti-Rabbit PLUS (Sigma-Aldrich), 6 µl buffer de dilución de anticuerpos para ISH-PLA), durante 60 minutos en una cámara húmeda a 37°C, luego de esto se lavó 3 veces con PBS 1x y los cubreobjetos se incubaron con la solución de ligación (2µl Buffer de ligación (Duolink), 0.25µl de Ligasa (Duolink), 7.75µl de H₂O ultra pura) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1x y se incubó con 10µl de solución RCA (2 µl 1x *Amplification Red*, 0.125 µl Polimerasa 1x, 7,875 µl de H₂O ultra pura) durante 100 minutos a 37°C en una cámara húmeda.

Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1x y se incubaron con solución de DAPI 1x durante 1 minuto a temperatura ambiente y fuera de la luz. Se lavaron 2 veces con PBS 1x y 1 vez con H₂O ultra pura y los cubreobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente y una vez secos se montaron sobre un portaobjetos con 10µl de solución de montaje *Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium* (Sigma-Aldrich). Las células fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio confocal Zeiss LSM800 (Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile) con aumento de 63x, usando 2 observadores que recorrieron el cubreobjetos completo antes de la captura de imágenes. Se usó FIJI/ImageJ (NIH) como herramienta para visualizar y editar las imágenes.

Extracción de ARN total y RT-qPCR

La extracción de ARN total y posterior RT-qPCR se realizó como se describe en Toro-Ascuy, 2018. Brevemente, las células que fueron transfectadas se lavaron con PBS y se despegaron del pozo con PBS-EDTA, luego se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* celular se trató con TRIzol® Reagent (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc a partir del ARN citoplasmático (300 ng) se llevó a cabo con el kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar el PCR cuantitativo (qPCR) se preparó un mix de 25 µl con 5 µl de ADNc (previamente diluido 1/10), 12.5 µl del 2X Brilliant II 24 SYBR Green QPCR master mix (Agilent Technologies), 0.2 µM de los cebadores sentido (Se-GAPDH 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', Se-ARNmc 5'-GCAGTGGCGCCCGAACAGG-3') y antisentido (An-GAPDH 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3', An-ARNmc 5'-TTTTTGGCGTACTCACCAGTC-3') y la amplificación se realizó en el equipo AriaMX Real Time PCR System (Agilent). Como control, el gen endógeno GAPDH se amplificó en paralelo. Se comparó el número de copias relativo del ARNmc de VIH-1 con el de GAPDH utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Análisis y procesamiento de datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la herramienta disponible en Graphpad Prism. La significancia entre el promedio del control y la condición YTHDC2 (o mutantes) fue calculada usando la prueba t de *Student* con un valor de $p < 0.05$ como significativo. El procesamiento de las imágenes obtenidas de *Western blot* y aquellas obtenidas a través de microscopía se realizó usando las herramientas de ImageJ (NIH), FIJI (NIH), Imaris (Bitplane) y Adobe Illustrator.

Resultados

1. La sobre-expresión de YTHDC2 promueve la síntesis de la proteína viral Gag de VIH-1

Estudios previos mostraron que la sobre-expresión de las lectoras citoplasmáticas de m⁶A YTHDF1-3 es capaz de estimular post-transcripcionalmente la síntesis de Gag de VIH-1 al aumentar los niveles de transcritos virales (Kennedy et al., 2016) e YTHDC2 es conocida por promover la traducción de ciertos transcritos (Tanabe et al., 2016), por ello la necesidad de evaluar qué ocurre con la síntesis de Gag cuando YTHDC2 está aumentada en las células que expresan VIH-1. Para esto, células HeLa fueron co-transfectadas con el vector reportero viral de VIH-1 pNL4.3R o con el vector pCIneoR como control y con el vector que expresa a FLAG-YTHDC2 o d2EGFP como control. El vector pNL4.3R contiene el gen reportero Luciferasa de Renilla en el marco de lectura de Gag (Soto-Rifo et al., 2012), por lo que al expresarse dará origen a una proteína de fusión Gag-Luciferasa de Renilla, así luego podemos medir la actividad de esta proteína como indicativo de la síntesis de la proteína viral Gag utilizando un luminómetro. En cambio, el vector pCIneoR solo expresa el gen reportero Luciferasa de Renilla (usado para saber la influencia de la sobre-expresión de YTHDC2 sobre los transcritos celulares). Este experimento que se muestra en la Figura 6A muestra que al sobre-expresar a YTHDC2 hay un aumento significativo de la expresión de Gag:Luciferasa, cercano a 2 veces con respecto a la condición control GFP, además sugiere que este aumento es específico sobre VIH-1 y no sobre los transcritos celulares como se observa en la Figura 6A donde la sobre-expresión de YTHDC2 no promueve la expresión de la Luciferasa de Renilla a partir del vector pCIneo-HA-Renilla. En la Figura 6B se observa la correcta expresión de YTHDC2-FLAG y GFP en las células co-transfectadas.

Luego, de manera similar, pero esta vez utilizando un vector viral de VIH-1 que no contiene el gen reportero (pNL4.3), se co-transfectaron células HeLa con el vector pNL4.3 en conjunto con el vector que expresa a FLAG-YTHDC2 o d2EGFP como control. Se realizó un *Western blot* para evidenciar los cambios en la abundancia de la proteína viral Gag y sus productos de procesamiento, utilizando un anticuerpo contra la proteína viral p24 (NIH

AIDS Reagents Program) (Figura 6C, D) y lo que se observa es que al sobre-expresar YTHDC2 hay un aumento significativo en la abundancia de la proteína viral Gag (Pr55) y sus productos de procesamiento de 1.5 veces con respecto a la condición control. Este resultado es concordante con lo que se obtuvo al medir la actividad del gen reportero con sobre-expresión de YTHDC2 y en conjunto sugieren que cuando se aumenta ectópicamente la abundancia de YTHDC2 se aumenta la abundancia de la proteína viral Gag.

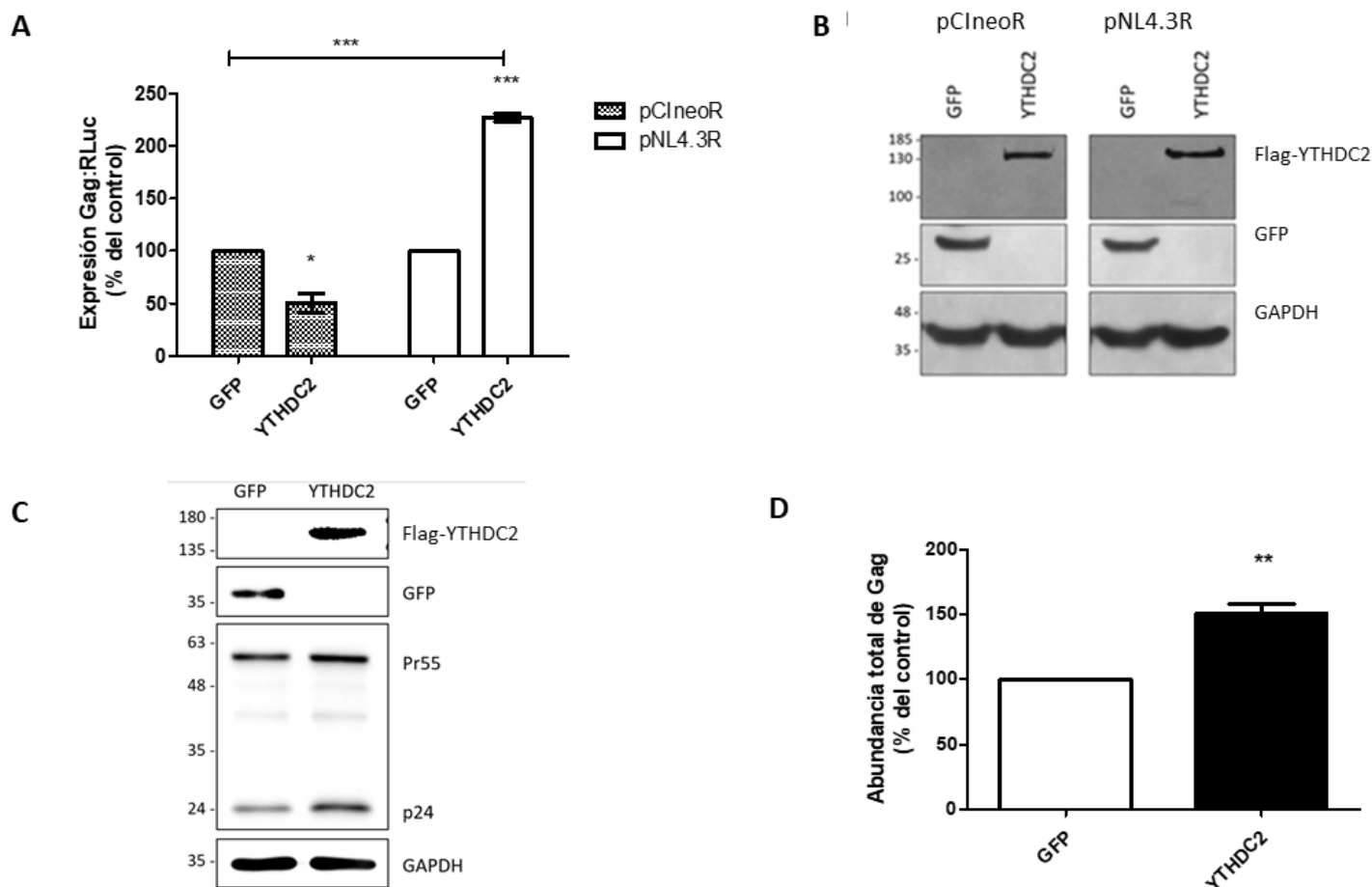


Figura 6: Efecto de la sobre-expresión de YTHDC2-FLAG en la síntesis de Gag de VIH-1. Se determinó el efecto que ejerce la sobre-expresión de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1 a través de la cuantificación de la actividad reportera de la proteína de fusión RLuciferasa-Gag en células HeLa (Figura 6A) y a través de la cuantificación de la abundancia de Gag (Pr55) y sus productos de procesamiento mediante *Western blot* (Figura 6C y D). La abundancia total de Gag se define como la intensidad de la banda para Pr55 y las demás bandas observadas hacia abajo en el mismo carril, normalizada por la intensidad de la banda del control de carga (GAPDH). En la Figura 6B se muestra un *Western blot* de un experimento representativo que da cuenta de la correcta transfección de YTHDF2-Flag o GFP. Se realizó una prueba *t* de Student comparando YTHDC2 con la condición control GFP y un test de ANOVA entre los grupos pClneoR y pNL4.3R (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

2. El silenciamiento parcial de YTHDC2 disminuye la expresión de la proteína viral Gag de VIH-1

En el trabajo de Brass y colaboradores del año 2008 se realizó un *screening* a larga escala utilizando una biblioteca de siARN, donde identificaron a YTHDC2 como una proteína requerida para estimular la síntesis de Gag en células infectadas con VIH-1; sin embargo, ni ellos ni ningún grupo posterior validó esta observación. En este trabajo de tesis se silenció la expresión de la proteína YTHDC2 utilizando un siARN con blanco en la región 3'UTR del ARNm de YTHDC2, el cual fue transfectado a diferentes concentraciones en células HeLa para conocer la concentración de siARN óptima y validar el silenciamiento utilizando un anticuerpo contra YTHDC2 endógena (Figura 7A). Para ello células HeLa fueron sembradas y al siguiente día se transfectó el ARN interferente para YTHDC2 o el control (*SiNonSilencing*, siNS), 24 horas después se volvió a transfectar el siARN, siguiendo el protocolo que se describe en (Gordon et al., 2013) y al día siguiente las células se colectaron para realizar el *Western blot* donde se utilizó un anticuerpo contra YTHDC2 endógena. Como se observa en la Figura 7A, todas las concentraciones de siARN utilizadas logran reducir los niveles de YTHDC2, sin embargo, se escogió la concentración 25 nM pues es la concentración más cercana a la concentración de siARN utilizada en trabajos anteriores (Gordon et al., 2013) y porque además se ha reportado que el silenciamiento de YTHDC2 es capaz de disminuir la viabilidad celular (Tanabe et al., 2016; Mao et al., 2019).

Una vez validado el silenciamiento a la concentración de siARN deseada, lo siguiente fue conocer el efecto del silenciamiento parcial de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1, para lo cual células HeLa se transfectaron con el siARN contra YTHDC2 o control (siNS), y al siguiente día se volvió a transfectar con los siARN y con el vector viral pNL4.3 o pCDNA3.1 como control. En la Figura 7B se muestra un *Western blot* representativo de este experimento en el que se observa que cuando se silencia YTHDC2 parece haber una menor intensidad en las bandas de las proteínas virales Pr55 y CAp24, comparado con la condición control. La abundancia total de Gag se cuantificó y se normalizó por la abundancia de β -Actina para construir el gráfico que se observa en la Figura 7C, el que muestra una

disminución discreta (cerca al 20%) pero significativa en la abundancia total de Gag cuando se silencia a YTHDC2.

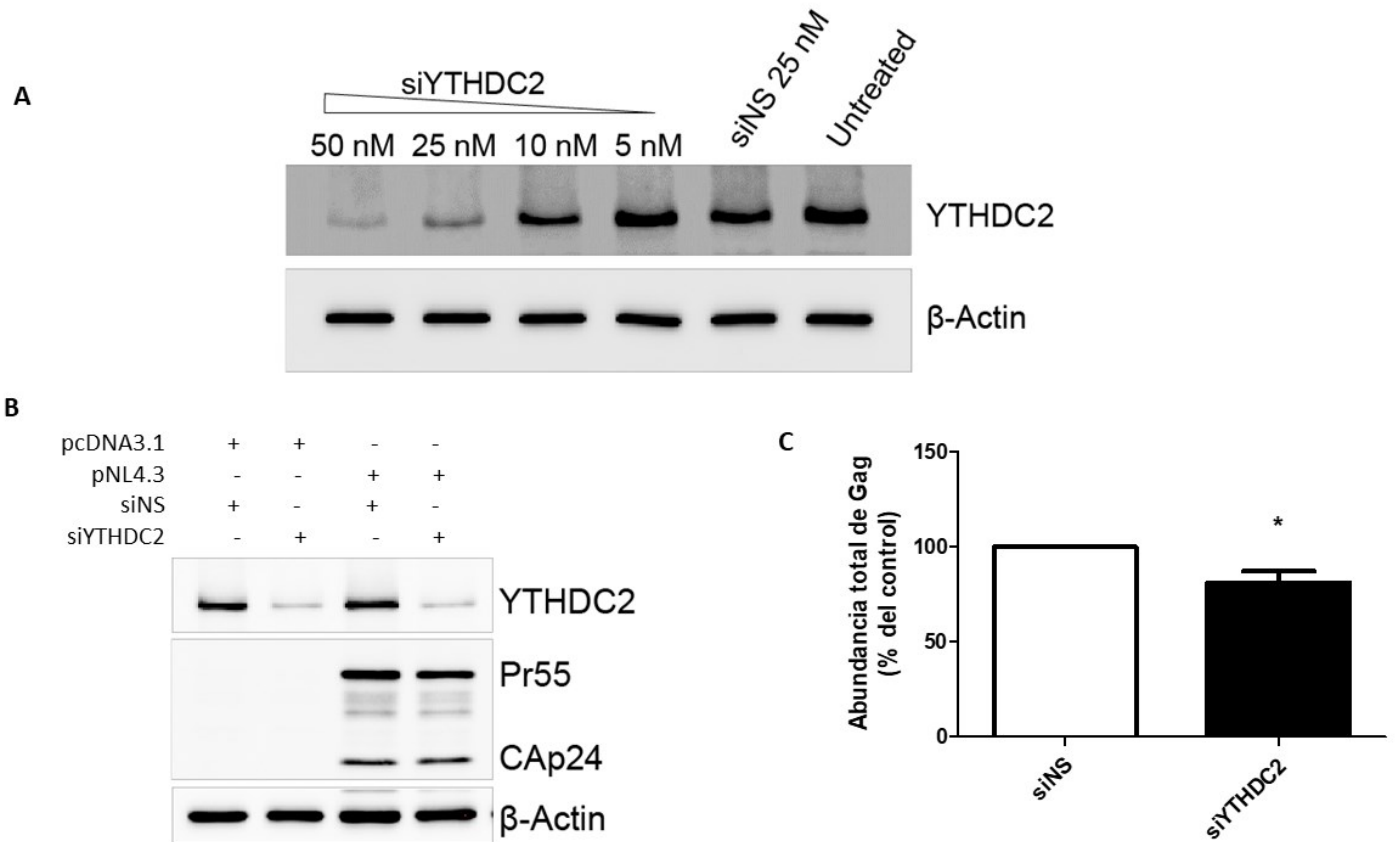


Figura 7: Efecto del silenciamiento parcial de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1. Células HeLa fueron transfectadas con un siARN contra el ARNm de YTHDC2 a diferentes concentraciones y se evaluó el efecto en la síntesis de la proteína YTHDC2 mediante *Western blot* (Figura 7A). Además, se evaluó el efecto que ejerce el silenciamiento de YTHDC2 (25 nM) en la síntesis de Gag, en células HeLa transfectadas con el vector proviral pNL4.3 a través de *Western blot* contra Gag (Figura 7B). Se determinó la abundancia de la proteína Gag y sus productos de procesamiento (relativa a la abundancia de β -Actina) mediante análisis densitométrico, tomando como 100% la abundancia relativa de la condición control (siNS). Se realizaron 3 repeticiones independientes y se utilizó una prueba t de Student (Figura 7C) para evaluar diferencias significativas con respecto al control siNS (* $p < 0.05$).

Utilizando el procedimiento descrito anteriormente, esto es, doble transfección del siARN más transfección viral, pero esta vez sembrando las células sobre cubreobjetos para luego visualizar las proteínas Gag (en color verde) e YTHDC2 (en color rojo), bajo el microscopio confocal mediante inmunofluorescencia indirecta (Figura 8). En estas imágenes obtenidas se observa que YTHDC2 es menos abundante en las células silenciadas para YTHDC2 y que en estas células silenciadas para YTHDC2 se observa una menor abundancia de la proteína viral Gag. Además, se observa que existe co-localización de YTHDC2 con la proteína viral Gag (condición control) y que esta co-localización disminuye en las células silenciadas para YTHDC2. En conjunto, los resultados mostrados en las Figuras 7 y 8 sugieren que al disminuir la síntesis de la proteína YTHDC2 en células HeLa se disminuye la abundancia de la proteína viral Gag de VIH-1.

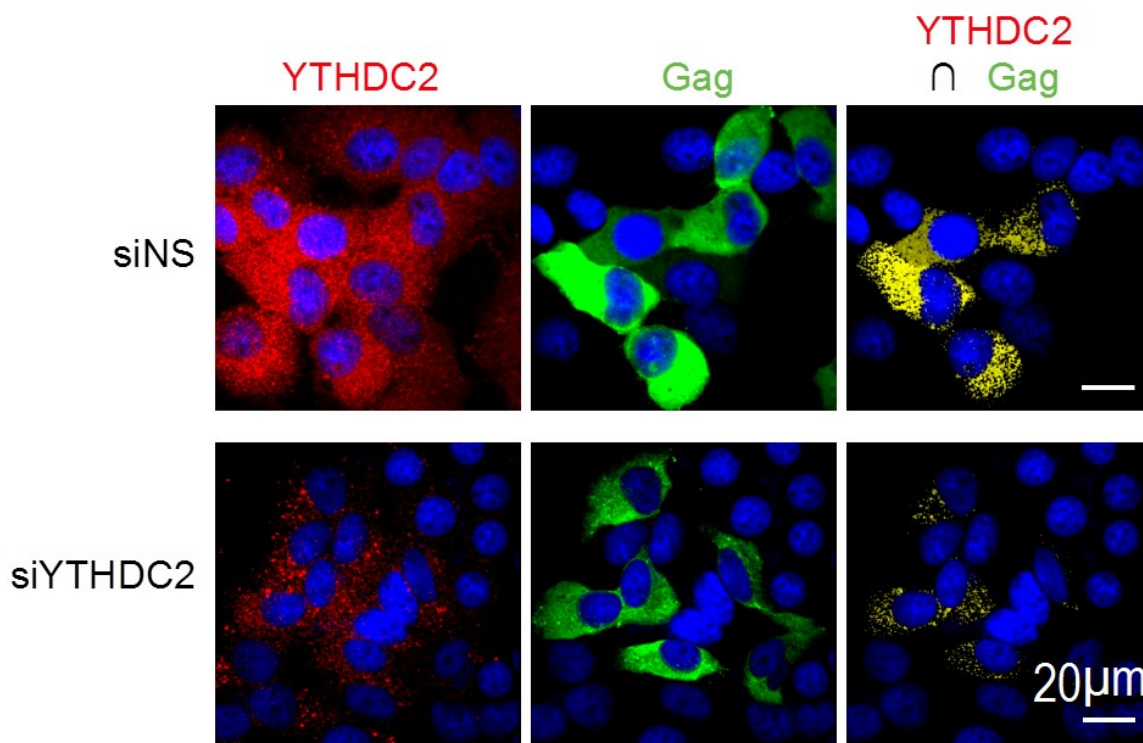


Figura 8: Inmunofluorescencia Indirecta de YTHDC2 y Gag en células silenciadas para YTHDC2. Se silenció la expresión de YTHDC2 en células HeLa utilizando un siARN contra el ARNm de YTHDC2 (siYTHDC2) y las células se transfectaron con el vector proviral de VIH-1 pNL4.3 comparando con la condición control (siNS). Se realizó una inmunofluorescencia indirecta contra YTHDC2 (color rojo), contra Gag (color verde) y el núcleo fue teñido con DAPI, también se determinó la colocalización de Gag con YTHDC2 (color amarillo). Este experimento se realizó 1 vez y se capturaron 10 fotografías por condición.

3. La lectora de m⁶A YTHDC2 se asocia con el ARNmc de VIH-1

El ARNmc de VIH-1 contiene modificaciones m⁶A (Riquelme-Barrios et al., 2018) y las lectoras YTHDF1-3 pueden unirse directamente al ARNmc de VIH-1 (Tirumuru et al., 2016), por lo que es esperable que YTHDC2 pueda unirse a estas modificaciones utilizando su dominio YTH. Para evaluar si YTHDC2 y el ARN mensajero completo de VIH-1 están lo suficientemente cerca como para poder interactuar se utilizó la técnica ISH-PLA que se basa en el uso de anticuerpos secundarios conjugados a oligonucleótidos que hibridan si están cerca y emiten una señal fluorescente roja bajo el microscopio confocal, que solo será visualizada si estas dos especies (ARN y proteína) se encuentran a menos de 40 nm o 400 Å de distancia. Para esto, células HeLa fueron sembradas sobre un cubreobjetos y co-transfectadas con el vector que expresa a Flag-YTHDC2 y con el vector viral pNL4.3. A las 24 hpt las células fueron fijadas, permeabilizadas y luego hibridadas toda la noche con la sonda UTP-digoxigenada que reconoce el ARNmc de VIH-1. Luego se incubó con anticuerpos primarios contra el epítipo Flag y contra digoxigenina, para luego ocupar los anticuerpos secundarios y reactivos del PLA.

En la condición control las células no fueron transfectadas con ningún vector, pero se siguió todo el tratamiento con anticuerpos primarios y secundarios. Lo que se observó bajo el microscopio es lo que se muestra en la Figura 9. En las células control no se observa la presencia de puntos de color rojo, en cambio en las células transfectadas si se observan, mayoritariamente en el citoplasma, pero también hay puntos dentro del núcleo (determinado mediante análisis de *z-stacks*, datos no mostrados). Este resultado sugiere que YTHDC2 y el ARNmc de VIH-1 están lo suficientemente cerca como para establecer que forman parte de un mismo complejo ribonucleoproteico.

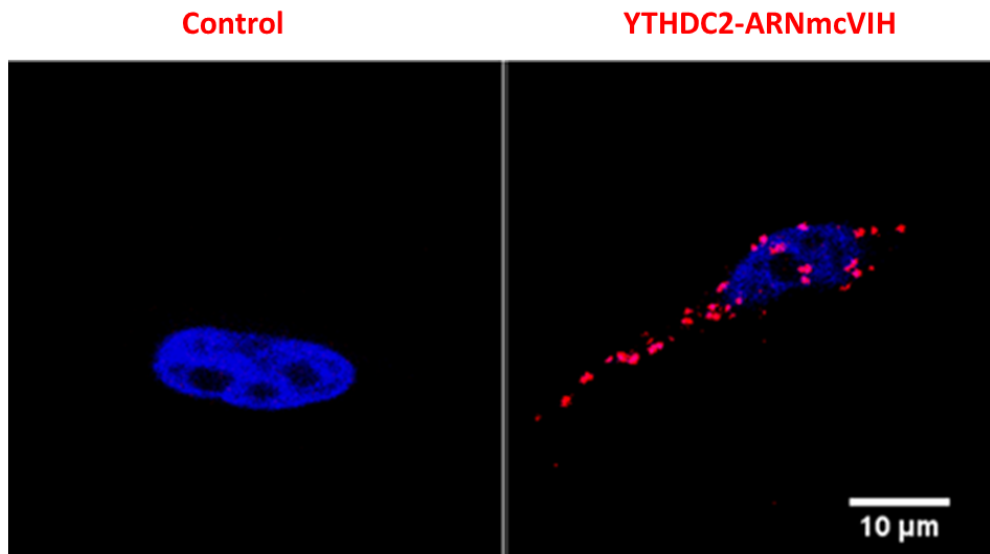


Figura 9: ISH-PLA del ARNmc de VIH con la lectora de m⁶A YTHDC2. ISH-PLA que evalúa la asociación entre el ARN mensajero completo de VIH-1 y la proteína lectora de m⁶A YTHDC2. En color azul se muestra el núcleo de la célula y en color rojo los puntos de asociación.

4. Los dominios Helicasa e YTH de YTHDC2 son preferencialmente requeridos para estimular la síntesis de la proteína viral Gag de VIH-1

YTHDC2 fue inicialmente descrita como una proteína con probable actividad Helicasa. Ya en el trabajo de Wojitas y colaboradores, esta actividad Helicasa fue corroborada y determinada como dependiente de ATP y ocurrir en dirección 3' → 5' (Wojitas et al., 2017). En este mismo trabajo se desarrollaron vectores de expresión de diferentes versiones mutantes de YTHDC2 (Anexo 1). La mutante que carece de actividad Helicasa (YTHDC2 D/Q), la que no puede unir m⁶A (Δ YTH), la que carece del dominio R3H y la que carece del dominio ANK. Para conocer la influencia de cada dominio de YTHDC2 en la síntesis de Gag, lo que se hizo fue co-transfectar células HeLa con el vector reportero de VIH-1 pNL4.3R y con los vectores que expresan a YTHDC2 mutantes. Así, células HeLa fueron co-transfectadas con el vector pNL4.3R junto con el vector de expresión para HA-YTHDC2 WT o mutantes y a las 24 hpt las células fueron lisadas y se midió la actividad de la proteína de fusión Gag-RLuc en un luminómetro. Se tomo como 100% la actividad que se registró con el vector control d2EGFP.

Lo que se observa en la Figura 10A, es que la expresión de YTHDC2 silvestre (WT) estimula la síntesis de Gag cerca de 2 veces, lo que es concordante con los primeros resultados obtenidos utilizando el vector de expresión Flag-YTHDC2. También se observó que las mutantes de la actividad Helicasa (D/Q) y de unión a m⁶A (Δ YTH) no estimulan significativamente la síntesis de Gag, comparado con el control d2EGFP. Las mutantes R3H y ANK no indujeron algún cambio significativo en la síntesis de Gag, comparado con el control d2EGFP. En la Figura 10B se muestra un *Western blot* representativo de los lisados celulares utilizados para la medición de la actividad de la proteína Gag-RLuc. Se observa la correcta expresión de las diferentes versiones de YTHDC2 y la concordancia de la abundancia de Gag-RLuc con la actividad obtenida en el luminómetro Glomax. Es importante destacar que no todas las versiones de YTHDC2 presentaron niveles similares de expresión, donde la mutante D/Q presentó los niveles más bajos.

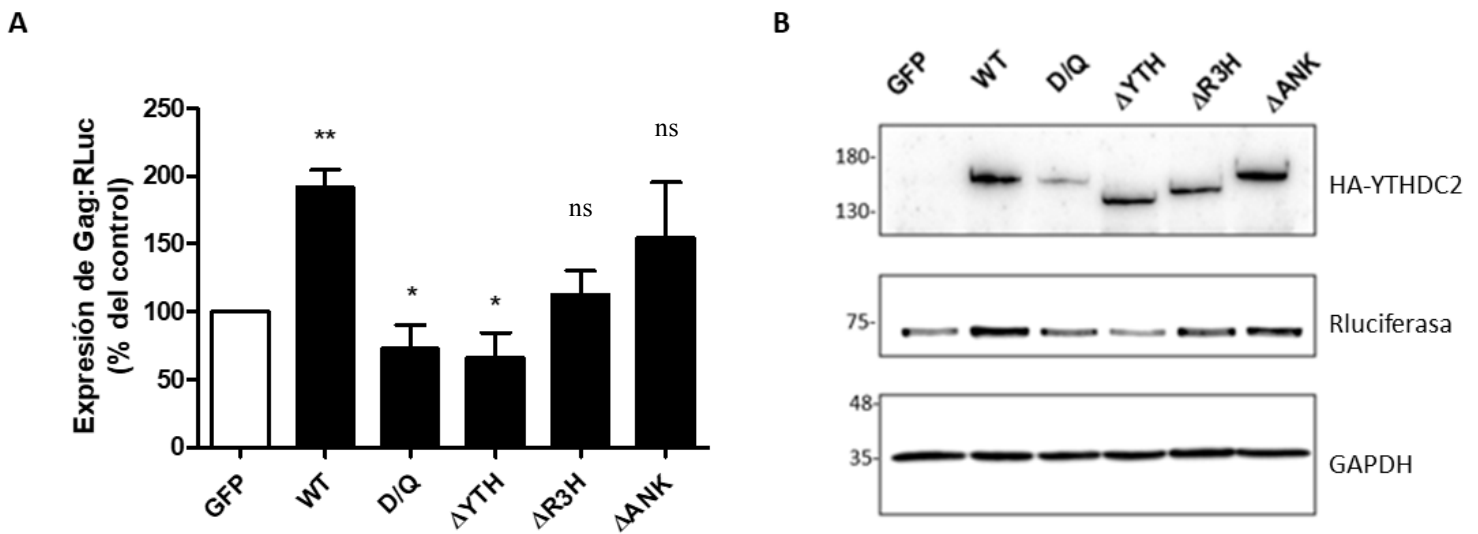


Figura 10: Determinación a través de ensayo reportero de la influencia de los dominios Helicasa (D/Q), YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Gag. Esta figura muestra el efecto de la deficiencia de los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Gag de VIH-1 mediante la cuantificación de la actividad del reportero Gag-Luciferasa de Renilla. En la Figura 10A se observa que la pérdida de los dominios Helicasa e YTH de YTHDC2 afectan negativamente la expresión de Gag, comparado con el control GFP, esta observación fue verificada mediante *Western blot* (Figura 1B). Se realizaron 3 repeticiones independientes y se utilizó una prueba t de Student para evaluar diferencias significativas con respecto al control GFP (* $p < 0.05$, ns: no significativo).

En el siguiente experimento, se utilizó el vector viral pNL4.3, el que fue co-transfectado con un vector que expresa a YTHDC2 silvestre o mutantes, o con el que expresa d2EGFP como control, en células HeLa. Las células fueron colectadas luego de 24 hpt y las muestras se sometieron a electroforesis en un gel en gradiente que se transfirió e incubó con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para mostrar el *Western blot* de la Figura 11A. Se observa que YTHDC2 WT estimula la síntesis de Gag pero que la mutante Helicasa o Δ YTH no lo hace. Este experimento se repitió 3 veces y se realizó un análisis densitométrico de las bandas de Gag (correspondiente al precursor de 55 kDa más sus productos de procesamiento observados en todo el carril) y GAPDH. Se normalizó la abundancia total de Gag con respecto a la abundancia de GAPDH y se tomó como 100% lo que ocurre con el control d2EGFP. Se observa en la Figura 11A y 11B que al expresar a YTHDC2 silvestre (WT) hay un aumento cercano a 2 veces en la síntesis de Gag comparado con la condición control y que cuando se expresó a las mutantes de actividad Helicasa (D/Q) y de unión a m⁶A (Δ YTH) no hay un estímulo en la síntesis de Gag con respecto al control. En cambio, cuando se expresó a las mutantes Δ R3H y Δ ANK hubo un estímulo en la síntesis de Gag pero este es semejante al observado cuando se expresa a YTHDC2 silvestre. De forma similar a lo obtenido con el virus reportero que expresa Gag-RLuc (Figura 10), este resultado sugiere que los dominios requeridos de YTHDC2 para estimular la síntesis de Gag son principalmente los dominios Helicasa e YTH. Aunque una vez más no fue posible obtener niveles de expresión similares de las diferentes versiones de YTHDC2, los resultados obtenidos fueron consistentes en las diferentes réplicas biológicas del experimento.

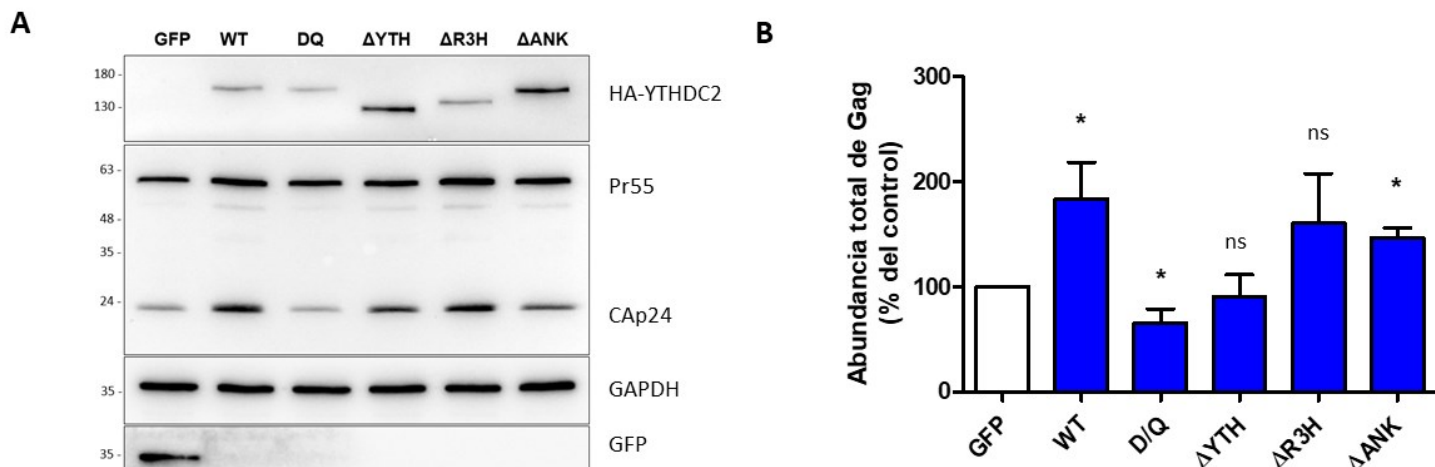


Figura 11: Determinación a través de *Western blot* de la influencia de los dominios Helicasa (D/Q), YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Gag. Efecto de la deficiencia de los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de YTHDC2 en la síntesis de Pr55 (Gag) y p24 de VIH-1, determinada por *Western blot* (Figura 11A) y análisis de densitometría de la abundancia total de Gag relativa a GAPDH y normalizada por el control GFP (Figura 11B). Este experimento de *Western blot* se repitió 3 veces y en la Figura 11A se muestra un *Western blot* representativo de una de las repeticiones, contra HA, GFP, p24 y GAPDH. En la Figura 11B se utilizó una prueba t de Student comparando cada YTHDC2 con la condición control GFP (* $p < 0.05$, ns: no significativo).

5. Los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de YTHDC2 contribuyen a la asociación de YTHDC2 con el ARNmc de VIH

YTHDC2 contiene diferentes dominios de unión a ARN, como el R3H, el Helicasa y el dominio YTH, por ello lo interesante es dilucidar si uno de estos dominios le otorga la especificidad de actuar sobre ciertos transcritos, como el ARNmc de VIH-1. Sabiendo que YTHDC2 se asocia con el ARNmc de VIH-1 lo siguiente fue conocer qué dominios de YTHDC2 son requeridos para mediar esta asociación y evaluar si el dominio YTH es el que más contribuye a ello. Para esto, células HeLa se sembraron sobre un cubreobjeto y se co-transfectaron con el vector viral pNL4.3 y con los vectores que expresan las versiones silvestre y mutantes de YTHDC2. A las 24 hpt, las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron toda la noche con la sonda UTP-digoxigenada que reconoce al ARNmc de VIH-1. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios contra HA y Digoxigenina, y por un lado se realizó un FISH contra el ARNmc de VIH-1 acoplado a inmunofluorescencia indirecta contra YTHDC2, utilizando

anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (Figura 12). En este resultado se observa que las células están expresando al ARNmc de VIH-1 (color verde) y a YTHDC2 silvestre o mutantes (color rojo), además, no se observa un cambio notorio en la localización subcelular de estas especies. Esta figura sugiere que las células fueron correctamente transfectadas con los vectores deseados (vector viral y vector que expresa a YTHDC2).

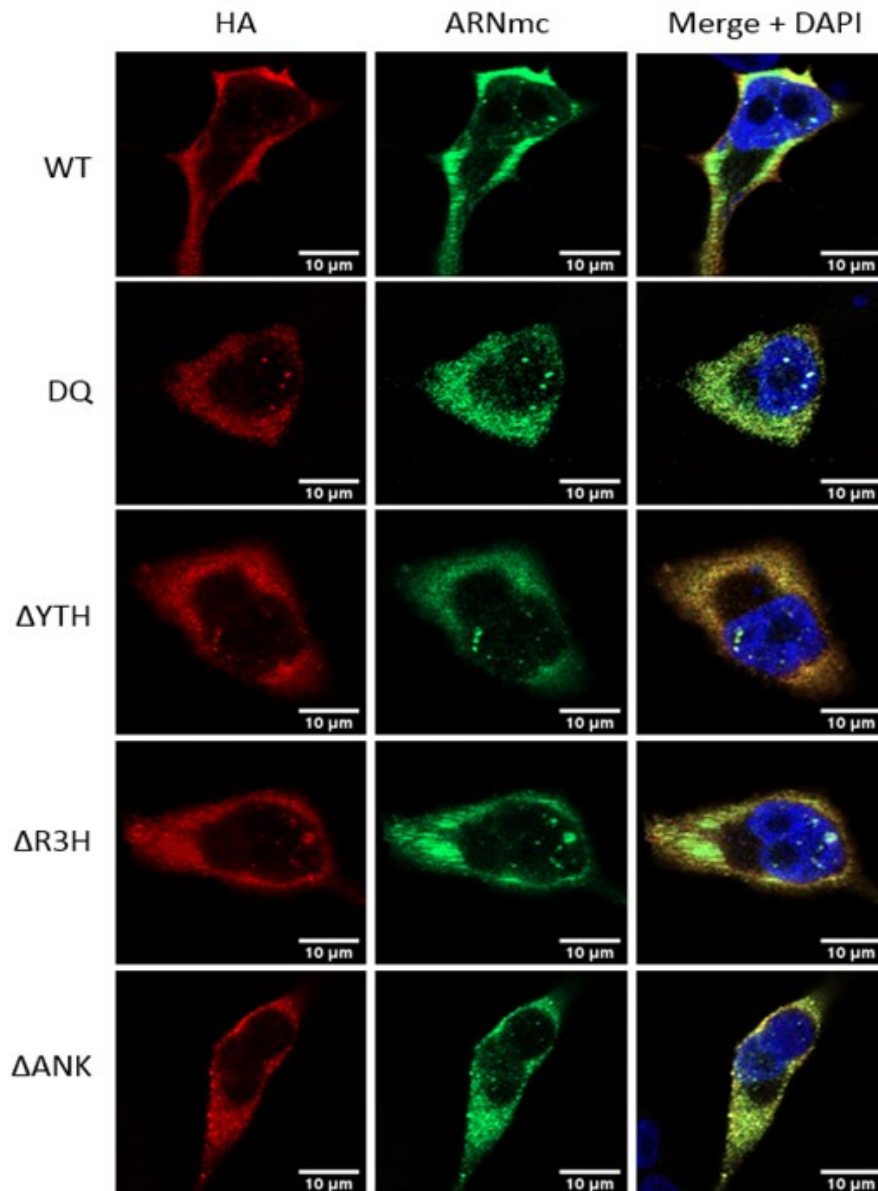


Figura 12: FISH-IFI del ARNmc de VIH-1 y mutantes de YTHDC2. Localización de YTHDC2 (silvestre y mutantes) y del ARN mensajero completo de VIH-1 en células HeLa. En color rojo se muestra la localización de la proteína YTHDC2-HA (silvestre o mutantes) y en color verde al ARNmc de VIH-1. Este experimento se repitió 2 veces.

Por otro lado, para llevar a cabo el ISH-PLA y conocer la cantidad de puntos de asociación entre el ARNmc de VIH-1 e YTHDC2 silvestre y mutantes, luego de la incubación con los anticuerpos primarios (contra digoxigenina y HA) se siguió con el protocolo de PLA, utilizando los anticuerpos y reactivos contenidos en este kit. Este experimento se repitió 2 veces y se determinó la cantidad de puntos presentes en cada célula, de un total de 30 células por condición. Los resultados de este ensayo, que se muestran en la Figura 13A y B indican que hay una cantidad promedio de 42 puntos de asociación entre el ARNmc de VIH-1 e YTHDC2 silvestre (WT), y que esta cantidad de puntos se ve disminuida significativamente cuando se expresan las mutantes de actividad Helicasa (D/Q), de unión a m⁶A (Δ YTH), Δ R3H y Δ ANK. Este resultado sugiere que todos los dominios estudiados son capaces de contribuir significativamente a la asociación de YTHDC2 con el ARN mensajero completo de VIH-1, comparado con la asociación que existe entre YTHDC2 silvestre (WT) y el ARNmc de VIH-1. Todas las mutantes estudiadas presentan menos asociación con el ARNmc de VIH-1 cuando se compara con la versión silvestre de YTHDC2, esta observación no era la esperada, ya que, si el dominio YTH de YTHDC2 le otorga la especificidad y direccionalidad de actuar sobre transcritos m⁶A metilados, esperaríamos que fuera el que más contribuyera a la asociación con el ARNmc de VIH-1.

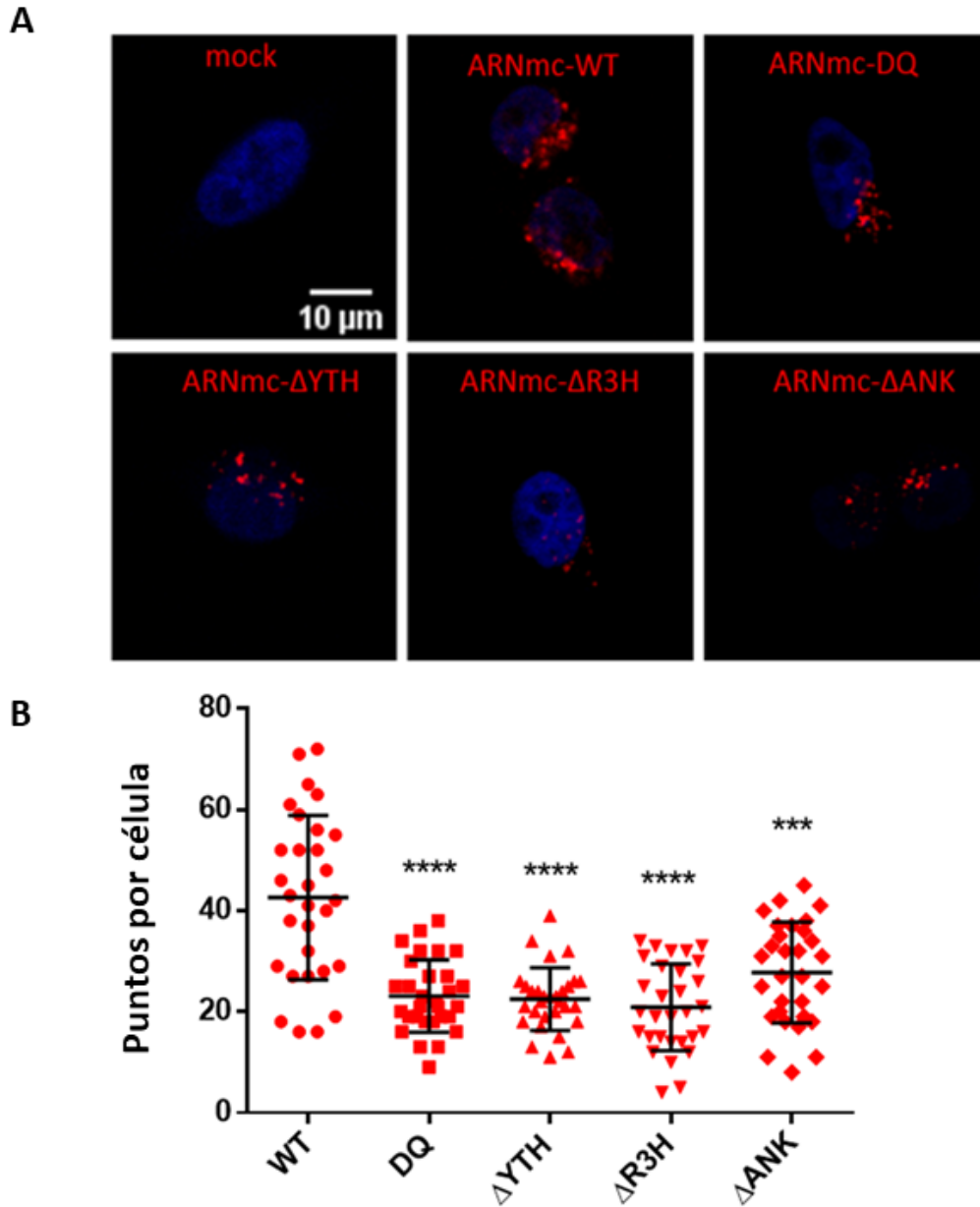


Figura 13: ISH-PLA del ARNm de VIH-1 con las mutantes de YTHDC2. Análisis de la asociación entre YTHDC2 mutantes y el ARN mensajero completo de VIH-1 mediante ISH-PLA en células HeLa. Los puntos de asociación se representan en color rojo y en color azul se muestra el núcleo de las células. Un gráfico de distribución muestra el número de puntos obtenido de cada célula, por cada condición se contaron los puntos contenidos en 30 células, en el gráfico se muestra el promedio \pm la desviación estándar. Se utilizó una prueba t de Student comparando cada mutante con la proteína WT (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

6. La sobre-expresión de mutantes de YTHDC2 modula la abundancia del ARNmc de VIH-1

Es conocido que YTHDC2 puede promover la traducción global y de ciertos transcritos específicos (Mao et al., 2019; Tanabe et al., 2016). De los resultados anteriores se conoce que YTHDC2 promueve la síntesis de Gag cerca de dos veces con respecto al control d2EGFP y que esta proteína es capaz de asociarse con el ARNmc de VIH-1; ergo si el efecto de YTHDC2 es a nivel de aumento de la eficiencia de traducción del ARNmc de VIH-1 deberíamos esperar la misma abundancia de ARNmc de VIH-1 en células control y en células que sobre-expresan a YTHDC2 (si hay igual abundancia de ARNmc pero mayor abundancia de proteína, se infiere que la traducción es más eficiente). Así, como una manera de conocer si YTHDC2 y sus mutantes influyen en el proceso de traducción del ARN mensajero completo de VIH-1 se cuantificó la abundancia del ARNmc de VIH-1 relativo a la abundancia del ARNm de GAPDH cuando se expresan las diferentes versiones de YTHDC2 comparado con la condición control d2EGFP. Para esto células HeLa fueron co-trasfectadas con pNL4.3 y el vector que expresa YTHDC2 silvestre y mutantes o d2EGFP como control. A las 24 hpt las células se trataron con TRIzol y se extrajo el ARN total y se realizó un RT-qPCR para determinar la abundancia relativa del ARNmc con respecto al ARNm de GAPDH. Los resultados que se presentan en la Figura 14 muestran que YTHDC2 WT y las mutantes RH3 y ANK inducen un aumento en los niveles del ARNmc de VIH-1, lo que se correlaciona con la abundancia de proteína Gag observada en las Figuras 6, 10 y 11. Resulta interesante notar que la sobre-expresión de las mutantes Helicasa (D/Q) y Δ YTH no promueven un incremento en los niveles del ARNmc de VIH-1 lo que se correlaciona con la incapacidad de estimular la síntesis de Gag-RLuc y Gag que se observa en los experimentos de *Western blot* (Figuras 10 y 11). Estos resultados sugieren que YTHDC2 no promueve la eficiencia de la traducción del ARNmc de VIH-1, pero si induce un aumento en los niveles de ARNmc y que tanto su actividad Helicasa como su dominio YTH son importantes en esta función.

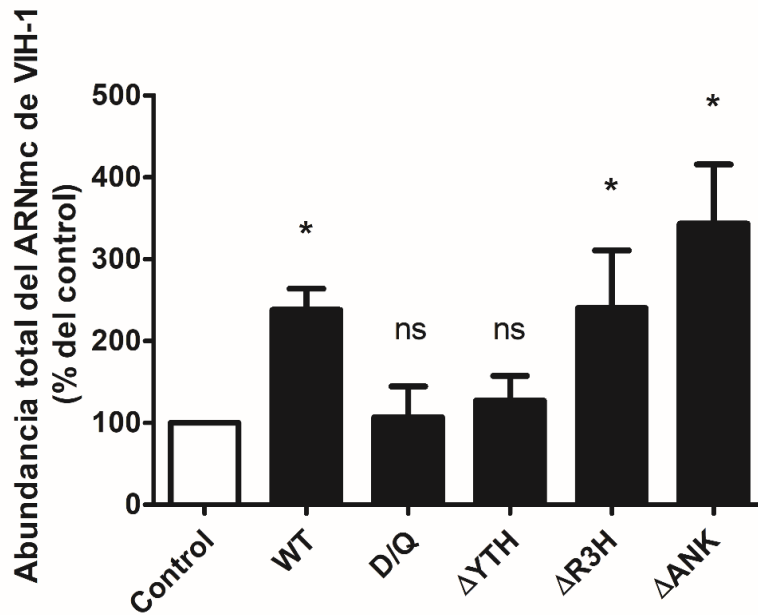


Figura 14. Abundancia total del ARNm de VIH-1 cuando se sobre-expresa a YTHDC2 y sus mutantes. Abundancia del ARN mensajero completo de VIH-1 relativa a la abundancia del ARN mensajero de GAPDH, en la presencia de las diferentes variantes de YTHDC2 determinada mediante extracción de ARN total y RT-qPCR. La condición control (d2EGFP) fue tomada como el 100%. El gráfico muestra el promedio de 3 repeticiones independientes \pm la desviación estándar (* $p < 0.05$ y ns: no significativo, según una prueba t de Student).

Discusión

La m⁶A es la modificación interna más abundante en los ARNm y el estudio de su rol en los transcritos ha tomado relevancia durante la última década debido al desarrollo de metodologías para detectar y estudiar esta y otras modificaciones químicas que ocurren sobre los ARNm, lo que ha dado cuenta de la importancia de ella en la regulación de la expresión génica. Interesantemente, el número de residuos m⁶A es más alto en ARNm virales que en ARNm celulares, lo que sugiere que la incorporación de m⁶A en ARNm virales debe ser un determinante para la replicación viral. Estudios previos incluyendo los de nuestro laboratorio han demostrado que el ARNm de VIH-1 es bastante eficiente en el reclutamiento de ribosomas y trabajos recientes sugieren que también ha tomado ventaja de la m⁶A, modificando extensivamente su genoma para favorecer los procesos virales como la exportación nuclear y la síntesis de proteínas.

Estudios previos demostraron que las lectoras de m⁶A citoplasmáticas YTHDF1, 2 y 3, juegan un rol positivo y redundante en la expresión génica del ARNm de VIH-1. Consistente con este hallazgo, estudios de CLIP-seq demostraron que todas ellas son capaces de unirse al ARNm de VIH-1 en los mismos sitios. Sin embargo, los roles de la lectora nuclear YTHDC1 y de la Helicasa de ARN y lectora de m⁶A YTHDC2 se mantienen desconocidos. El estudio del rol de YTHDC2 en el ciclo replicativo de VIH-1 había permanecido dormido desde el año 2008, cuando el grupo de Brass y colaboradores sugirieron, a través de un *screening* de ARN de interferencia, que esta proteína podría ser requerida para la síntesis de la poliproteína viral Gag, junto con otros cientos de proteínas hospederas que se identificaron como potenciales factores celulares provirales (Brass et al., 2008). En este trabajo nos enfocamos en estudiar el rol de YTHDC2 en la regulación post-transcripcional de la expresión del ARNm de VIH-1. Dado que conocíamos que el VIH-1 usa m⁶A a su favor (Kennedy et al., 2016; Lichinchi et al., 2016; Tirumuru et al., 2016) y también que el VIH-1 utiliza múltiples Helicasas de ARN celulares para su replicación (Jeang & Yedavalli, 2006; Lorgeoux et al., 2012), esperábamos que VIH-1 usase a YTHDC2 para favorecer la replicación viral.

En este trabajo se propuso en un inicio que YTHDC2 promovía la traducción del ARNmc de VIH-1 en un mecanismo dependiente de su dominio YTH (por ende, dependiente de m⁶A), y aunque la evidencia plantea que YTHDC2 facilita la traducción de ciertos ARNm celulares (Mao et al., 2019, Tanabe et al., 2016), nuestros resultados sugieren que esto no ocurre con el ARNmc de VIH-1. Si bien logramos establecer que un aumento en los niveles intracelulares de YTHDC2 genera un aumento en la abundancia de Gag de VIH-1 (Figura 6), este efecto se debe principalmente a un aumento en los niveles intracelulares de ARNmc (Figura 14). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes vías que siguen los ARNm celulares con respecto al ARNmc de VIH-1. En este sentido, mientras los ARNm celulares sufren corte y emplame y son exportados a través de la vía Tap/NXF1, el ARNm completo de VIH-1 no sufre corte y empalme y es exportado por medio de la proteína viral Rev y la carioferina celular CRM1 (Taniguchi et al., 2014). De esta forma, las diferencias en el metabolismo de los ARNm y el ARNmc podrían determinar el impacto de YTHDC2 en su regulación post-transcripcional. De todos modos, nuestros resultados de ISH-PLA sugieren que YTHDC2 se asocia con el ARNmc de VIH-1 en el citoplasma en una función que involucra los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de la proteína (Figuras 9 y 13). Pese a la necesidad de múltiples dominios para unirse al ARNmc, evidenciamos que la actividad Helicasa y el dominio YTH de YTHDC2 son importantes en su función sobre la síntesis de Gag (Figura 10, 11 y Anexo 2). En conjunto, nuestros resultados sugieren la importancia de esta proteína en estudio como un regulador de la expresión génica del ARNmc de VIH-1. Aunque no se puede descartar que la mutación o delección de alguno de estos dominios tenga un efecto en la estructura general de la proteína y por ello se hayan obtenido los fenotipos observados.

Una de las primeras observaciones que logramos es que si sobre-expresamos a YTHDC2 hay un aumento significativo en la síntesis de Gag de aproximadamente 2 veces con respecto al control (Figura 6), además que este aumento es dependiente de la concentración de vector de expresión (datos no mostrados). El aumento observado en los niveles de de la proteína viral Gag cuando se sobre-expresa a YTHDC2 se correlaciona con lo que se observa cuando se sobre-expresan las lectoras YTHDF1-3 en un trabajo previo (Kennedy et al., 2016) aunque el estímulo que se observó en este trabajo es menor a lo que se reportó con las lectoras

YTHDF1-3, lo que podría deberse a que YTHDC2 contiene dominios adicionales, en comparación con las YTHDF1-3 que solo contienen el dominio YTH hacia el extremo C-terminal y una región de baja complejidad, y por ende, estos otros dominios median funciones que no tienen que ver con la síntesis de Gag. Además, el modelo celular utilizado por Kennedy y colaboradores (células HEK293T) fue diferente al nuestro (HeLa) (Kennedy et al., 2016). En este sentido, sería de particular interés estudiar el efecto de YTHDC2 en linfocitos-T CD4+, macrófagos o microglías, las cuales son blancos naturales de la infección.

Cuando silenciamos parcialmente la expresión de YTHDC2 usando un ARN de interferencia pequeño, hay una disminución discreta cercana al 20% en la síntesis de Gag (observada mediante *Western blot*). Asimismo, observamos mediante inmunofluorescencia indirecta en células silenciadas para YTHDC2 que hay una menor intensidad de fluorescencia de la marca de la proteína viral Gag; aunque se necesitan más repeticiones de esta inmunofluorescencia para validar lo observado. Estos resultados son concordantes con la observación preliminar que realizó el grupo de Brass y colaboradores en el año 2008, y también se correlaciona con lo que se observa al silenciar a la lectora YTHDF2 en células infectadas con VIH-1 (Kennedy et al., 2016). Aun cuando el *Western blot* es una técnica semicuantitativa este hallazgo sugiere que YTHDC2 podría no ser esencial para que el VIH-1 exprese sus proteínas, al menos en células HeLa, que es el modelo celular utilizado en este estudio. Adicionalmente, existe la posibilidad que la carencia de YTHDC2 sea compensada por los miembros de la familia YTHDF y que la actividad de estas cuatro lectoras de m⁶A citoplásmicas sea redundante. De esta forma, VIH-1 podría explotar al máximo la actividad proviral de estas lectoras de m⁶A.

Sabiendo que YTHDC2 es importante para controlar la expresión génica del ARNm nos preguntamos cuál era la influencia de cada dominio de YTHDC2, con el propósito de dar luces acerca del mecanismo de acción y de la contribución de cada uno de ellos en la síntesis de Gag. Establecimos en este trabajo, por primera vez, a través de los ensayos de ISH-PLA la importancia de los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK de YTHDC2, en su asociación con el ARNm de VIH-1. Observamos que todos estos dominios contribuyen de manera similar

(R3H, Helicasa e YTH más que ANK) a la asociación con el ARNmc. Este resultado es llamativo pues se esperaba que algunos dominios contribuyeran más que otros, como por ejemplo el dominio YTH, pues pensábamos que si este dominio le otorga la especificidad de actuar sobre el ARNmc de VIH el cual es m⁶A modificado, este dominio contribuiría más a la asociación, pero no fue lo que se observó. Los dominios R3H, Helicasa e YTH son dominios de unión a ARN (Wojitas et al., 2017) por lo que es esperable que contribuyan a la asociación con el ARNmc de VIH-1; sin embargo, el dominio ANK es un dominio que media interacciones proteína-proteína, por lo que resulta interesante ver que puede contribuir a la asociación con el ARNmc de VIH-1. Probablemente la asociación que se observa con esta mutante sea debido a que está utilizando los demás dominios de unión a ARN disponibles (R3H, Helicasa e YTH), aunque por la resolución de esta técnica no podemos afirmar que esto ocurra así.

También, logramos determinar la importancia del dominio YTH y Helicasa de YTHDC2 en la síntesis de Gag mediante *Western blot* y ensayo de gen reportero, puesto que las mutantes Δ YTH y Helicasa (D/Q) no logran estimular la síntesis de Gag como lo hace la versión silvestre de YTHDC2. Importantemente, estos dos dominios también fueron requeridos para la asociación con el ARNmc, lo que sugiere que YTHDC2 actuaría reconociendo y uniendo a las modificaciones m⁶A sobre el ARNmc de VIH-1 a través de su dominio YTH y asimismo desenrollando las estructuras secundarias en el ARNmc o remodelando el complejo ribonucleoproteico a través de su actividad Helicasa.

Cuando observamos en los *Western blots* la expresión de las versiones mutantes de YTHDC2 y notamos que no se expresan en los mismos niveles, habiendo sido transfectados los vectores que las expresan a la misma concentración, nos preguntamos si el fenotipo observado es el correcto. Sabemos que la expresión de proteínas es un proceso dependiente de energía y cuando expresamos proteínas exógenas en células estamos añadiendo un gasto energético, que puede causar una disminución del metabolismo celular pues para producir esta proteína exógena se está usando la maquinaria celular y las proteínas exógenas que contienen mutaciones o deleciones pueden ser tóxicas o no

favorables para mantener la homeostasis celular por lo que bajo ciertas condiciones serán degradadas más rápidamente (Kafri et al., 2016). Sin embargo, en un trabajo de tesis reciente donde se estudia el rol de YTHDC2 en el reconocimiento de modificaciones m⁶A sobre ARNs y su asociación con el ribosoma (Kretschmer, 2017) se utilizan mutantes de YTHDC2 las cuales son expresadas en células utilizando un promotor inducible mediante antibiótico y aun así las mutantes no alcanzan el mismo nivel de expresión al ser evaluadas mediante *Western blot*. Pese a las diferencias en los niveles de expresión, nuestros resultados fueron reproducibles, alcanzando significancia estadística en los diferentes experimentos.

Si bien la mutante Δ YTH no puede unir a m⁶A, esta mantiene sus dominios RH3, ANK y su actividad Helicasa, aunque esta actividad por sí sola no fue suficiente para estimular la síntesis de Gag como lo hace el control d2EGFP o YTHDC2 silvestre. Es más, cuando realizamos un ensayo de silenciamiento de YTHDC2, más transfección viral y recuperación con YTHDC2 mutantes (Anexo 2) observamos que la síntesis de Gag y sus productos de procesamiento se reduce significativamente al utilizar la mutante Δ YTH de YTHDC2. La importancia del dominio YTH sugiere que el ARNm de VIH-1 utiliza sus modificaciones m⁶A para reclutar a la Helicasa y lectora de m⁶A YTHDC2 y así favorecer la síntesis de Gag, aunque harán falta ensayos utilizando inhibidores de la metilación m⁶A para validar esta hipótesis.

Los resultados de los experimentos utilizando mutantes de YTHDC2 en células que expresan a VIH-1 (Figura 10, 11, 13 y Anexo 2) también muestran que su actividad Helicasa es requerida para estimular la síntesis de Gag y para mediar la asociación con el ARNm. Esto es concordante con lo que evidencia la literatura donde se sitúa a las Helicasas de ARN como esenciales en el metabolismo de los ARNs ya que participan en procesos como transcripción, *splicing*, exportación nuclear, traducción y degradación de ARNm (Jeang & Yadevelli, 2006). Ellas se encuentran en todas las especies y para los virus son fundamentales, tanto así que algunos de ellos las han incorporado en sus genomas, u otros virus usan las de la célula para favorecer la expresión génica viral (Steimer & Klostermeier., 2012). Específicamente la mutante Helicasa (D/Q) no puede hidrolizar ATP y por ello no

podrá resolver estructuras de ARN de doble hebra o remodelar complejos ribonucleoproteicos, pero si puede ocupar su dominio YTH para unir m^6A , o también podrá ocupar el dominio Helicasa para unirse pero no desenrollar; ya que las Helicasas con caja DExH como YTHDC2 no requieren de ATP para unirse a los ARNm (solo hidroliza ATP para resolver el dúplex de ARN) (Sloan & Bohnsack, 2018). Por ello que exista una menor asociación de la mutante Helicasa con el ARNm de VIH-1 podría sugerir que para el virus está proteína ya no es tan atractiva al no tener su actividad desenrolladora, pues el VIH-1 recluta a Helicasas que favorecen la replicación viral. Además que el uso del dominio YTH por parte del ARNm por si solo no es suficiente para estimular la síntesis de Gag y por tanto la actividad Helicasa es esencial pero en conjunto con el reconocimiento de m^6A a través del uso del dominio YTH.

La deficiencia del dominio R3H en YTHDC2 no mostró cambios significativos en la síntesis de Gag con respecto al control d2EGFP o incluso cuando comparamos la mutante $\Delta R3H$ con la versión silvestre de YTHDC2 no parecen haber diferencias notorias en el efecto que logran. El dominio R3H es un motivo que une a ácidos nucleicos de hebra simple y que comúnmente se encuentra asociado a dominios Helicasa, contribuyendo probablemente al acomodamiento del ácido nucleico para mejorar la eficiencia del desenrollamiento por parte de la actividad Helicasa (Grishin, 1998). Conocemos que YTHDC2 interactúa con la subunidad pequeña del ribosoma a través de su dominio R3H (Kretschmer et al., 2018); sin embargo, nosotros no observamos un efecto de YTHDC2 en traducción.

Se conoció recientemente que YTHDC2 interactúa con la exoribonucleasa XRN1 a través de su dominio ANK (Kretschmer et al., 2018). XRN1 es una exoribonucleasa que media la degradación de los ARNm (Jones et al., 2012); sin embargo, no se conoce su rol en la degradación del ARNm de VIH-1. Si XRN1 degrada ARNm deberíamos esperar que al asociarse con YTHDC2 se favoreciera la degradación de los ARNm m^6A modificados o que al impedir esta asociación se observase una acumulación de estos ARNm. Cuando utilizamos la mutante ANK, que carece de este dominio, observamos una mayor abundancia del ARNm de VIH-1 (Figura 14) comparado con la versión silvestre de YTHDC2, lo que sugiere

que este dominio es importante para controlar la abundancia del ARNmc de VIH-1, aunque falta por conocer si esto es dependiente de la presencia de XRN1 o es mediada por otros factores que participan en la degradación de ARNm. Lo interesante es que esta mayor abundancia en el ARNmc no se correlaciona con la abundancia de Gag observada en *Western blot* y en el ensayo de gen reportero, por lo que sería interesante estudiar en mayor profundidad el efecto de la mutante ANK en la estabilidad del ARNmc y el potencial rol de la exoribonucleasa XRN1 en este proceso.

Recientemente un estudio sugirió que YTHDC2 prefiere unirse y aumentar la eficiencia de traducción de transcritos que albergan modificaciones m⁶A en su región CDS (Mao et al, 2019). Conocemos que las modificaciones m⁶A que se encuentran en el ARNmc de VIH-1 se localizan más hacia las regiones 3' y 5' UTR (Riquelme-Barrios et al., 2018), aunque hubo un grupo que reportó una modificación en el RRE (Lichinchi et al., 2016). Si YTHDC2 prefiere aumentar la eficiencia de traducción de transcritos que albergan m⁶A en su CDS entonces es entendible que no promueva la eficiencia de traducción del ARNmc de VIH-1, aunque no se puede descartar que participe en alguna etapa de la traducción, como el inicio, la elongación o el termino, ya que es sabido que YTHDC2 puede asociarse con la subunidad pequeña del ribosoma o incluso que medie su función en forma m⁶A independiente. Además, a pesar que logramos conocer que el ARNmc se asocia con YTHDC2 no conocemos a qué nivel ocurre esto ni a qué región del ARNmc se estaría uniendo, cuestión que sería interesante dilucidar si prefiere unirse a sitios m⁶A el ARNmc de VIH-1 y en qué región del ARNmc esto ocurre.

Una observación muy interesante que realizamos es que la mutante Helicasa de YTHDC2 forma estructuras de tipo gránulos en células HeLa (Anexo 3) y resultados preliminares indican que YTHDC2 colocaliza con G3BP1 (un componente de los gránulos de estrés). Los gránulos de ARN son estructuras no membranosas que se componen principalmente de ARNs y proteínas de unión a ARN que contienen dominios de baja complejidad, donde además se ha demostrado que los dominios de baja complejidad son esenciales para la formación de gránulos de ARN (Liu et al., 2019). Hay gránulos de varios tipos, como por

ejemplo gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento (*p-bodies*). Más recientemente un nuevo concepto que engloba la formación de estructuras tipo gránulos nos dice que esto es un proceso físico-químico de separación de fases líquido-líquido (LLPS) y lo más notable es que se ha encontrado que YTHDF1-3 median la separación de fases, en una forma dependiente de m⁶A y a través del dominio de baja complejidad que contienen estas lectoras (Ries et al., 2019). No se ha descrito que YTHDC2 medie la separación de fases, pero si conocemos que también contiene un dominio de baja complejidad que podría mediar la formación de estructuras de tipo gránulos. En un futuro se necesitarán de experimentos adicionales para conocer qué tipo de gránulos forma YTHDC2, si en estos gránulos se encuentra el ARNmc de VIH-1 u otros transcritos m⁶A modificados, y si hay un dominio de YTHDC2 que medie su destinación a gránulos.

En resumen, la abundancia de YTHDC2 aumenta la síntesis de la poliproteína viral Gag al aumentar el nivel total del ARNmc de VIH-1, efecto que probablemente ocurra a través de la unión de YTHDC2 a los sitios m⁶A presentes ARNmc, para resolver estructuras secundarias presentes en este ARN, facilitando así la asociación de este a los ribosomas, aunque harán falta nuevos estudios para comprender cómo YTHDC2 se direcciona hacia esos procesos. Los resultados que se muestran en este trabajo sugieren la importancia de la actividad Helicasa y del dominio de unión a m⁶A de YTHDC2 en la síntesis de Gag y en la abundancia del ARNmc de VIH-1, poniendo en evidencia las ventajas que puede tomar el VIH-1 de la maquinaria celular a través de las modificaciones químicas de su ARNmc con el objetivo de favorecer la síntesis viral, usando proteínas lectoras de m⁶A como YTHDC2 para regular su expresión.

Conclusiones

- La expresión ectópica de YTHDC2 aumenta la síntesis de Gag en la línea celular HeLa y los dominios necesarios para ello son el Helicasa e YTH de YTHDC2.
- El silenciamiento parcial de YTHDC2 disminuye la síntesis de Gag en la línea celular HeLa.
- YTHDC2 se asocia con el ARNmc de VIH-1 y los dominios Helicasa, YTH, R3H y ANK participarían en esta asociación.
- El aumento inducido en la síntesis de Gag por la sobre-expresión de YTHDC2 se debería al aumento en la abundancia del ARNmc de VIH-1 y no al aumento en la traducción.

Bibliografía

- Adachi, A., Gendelman, H., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., & Martin, M. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of virology*, 59(2), 284-291.
- Avendaño, L. (2011). Retrovirus. En L. F. Avendaño, M. Ferrés & E. Spencer, *Virología Clínica* (1a ed., pp 243-256). Santiago, Chile: editorial mediterraneo.
- Bailey, A., Batista, P., Gold, R., Chen, Y., de Rooij, D., Chang, H., & Fuller, M. (2017). The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. *Elife*, 6.
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A., & Delfraissy, J. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 877.
- Brass, A., Dykxhoorn, D., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., & Xavier, R. et al. (2008). Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. *Science*, 319(5865), 921-926.
- Dabis, F., & Bekker, L. (2017). We still need to beat HIV. *Science*, 357(6349), 335-335.
- Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 58-65.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., & Osenberg, S. et al. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206.

Fröhlich, A., Rojas-Araya, B., Pereira-Montecinos, C., Dellarossa, A., Toro-Ascuy, D., & Prades-Pérez, Y. 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. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(5), 719-730.

Gilbert, W., Bell, T., & Schaening, C. (2016). Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science*, 352(6292), 1408-1412.

Gordon, H., Ajamian, L., Valiente-Echeverría, F., Lévesque, K., Rigby, W., & Mouland, A. (2013). Depletion of hnRNP A2/B1 overrides the nuclear retention of the HIV-1 genomic RNA. *RNA biology*, 10(11), 1714-1725.

Grishin, N. (1998). The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids. *Trends in biochemical sciences*, 23(9), 329-330.

Hazra, D., Chapat, C., & Graille, M. (2019). m6A mRNA Destiny: Chained to the rYTHm by the YTH-Containing Proteins. *Genes*, 10(1), 49.

Hsu, P., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y. et al. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell research*, 27(9), 1115.

Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33, 245

Jeang, K., & Yedavalli, V. (2006). Role of RNA helicases in HIV-1 replication. *Nucleic acids research*, 34(15), 4198-4205.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y. et al. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology*, 7(12), 885.

Jones, C., Zabolotskaya, M., & Newbury, S. F. (2012). The 5'→ 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), 455-468.

Kafri, M., Metzl-Raz, E., Jona, G., & Barkai, N. (2016). The cost of protein production. *Cell reports*, 14(1), 22-31.

Kennedy, E., Bogerd, H., Kornepati, A., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J. et al. (2016). Posttranscriptional m6A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell host & microbe*, 19(5), 675-685.

Kennedy, E., Courtney, D., Tsai, K., & Cullen, B. (2017). Viral epitranscriptomics. *Journal of virology*, 91(9), e02263-16.

Kretschmer, J., Rao, H., Hackert, P., Sloan, K., Höbartner, C., & Bohnsack, M. (2018). The m6A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'–3' exoribonuclease XRN1. *Rna*, 24(10), 1339-1350.

Kretschmer, J. (2017). Interactions and functions of RNA-binding proteins (Tesis doctoral). Universidad de Gotinga, Alemania.

Lee, M., Kim, B., & Kim, V. N. (2014). Emerging roles of RNA modification: m6A and U-tail. *Cell*, 158(5), 980-987.

Li, X., Xiong, X., & Yi, C. (2017). Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nature methods*, 14(1), 23.

Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G., Bansal, V., Wang, Y. et al. (2016). Dynamics of the human and viral m6A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature microbiology*, 1(4), 16011.

Liu, S., Feng, Y., Wu, J., Zou, M., Sun, Z., Li, X., & Yuan, F. (2019). m6A facilitates YTHDF-independent phase separation. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 24(2), 2070-2072.

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lorgeoux, R., Guo, F., & Liang, C. (2012). From promoting to inhibiting: diverse roles of helicases in HIV-1 Replication. *Retrovirology*, 9(1), 79.
- Lu, W., Tirumuru, N., Koneru, P., Liu, C., Kvaratskhelia, M., He, C., & Wu, L. (2018). N6 methyladenosine Binding Proteins Negatively Regulate HIV-1 Infectivity and Viral Production. *bioRxiv*, 257410.
- Mao, Y., Dong, L., Liu, X., Guo, J., Ma, H., Shen, B., & Qian, S. (2019). m⁶A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. *Nature communications*, 10(1), 1-11.
- Meyer, K., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C., & Jaffrey, S. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149(7), 1635-1646.
- Meyer, K., & Jaffrey, S. (2017). Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers. *Annual review of cell and developmental biology*, 33, 319-342.
- Morohashi, K., Sahara, H., Watashi, K., Iwabata, K., Sunoki, T., Kuramochi, K. et al. (2011). Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS one*, 6(4), e18285.
- Nkeze, J., Li, L., Benko, Z., Li, G., & Zhao, R. (2015). Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell & bioscience*, 5(1), 47.
- O'Connor, C. & Adams, J. (2010). *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education.
- Ocwieja, K., Sherrill-Mix, S., Mukherjee, R., Custers-Allen, R., David, P., Brown, M. et al. (2012). Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic acids research*, 40(20), 10345-10355.

Pereira-Montecinos, C., Toro-Ascuy, D., Rojas-Fuentes, C., Riquelme-Barrios, S., Rojas-Araya, B., García-de-Gracia, F. et al. (2019). An epitranscriptomic switch at the 5'-UTR controls genome selection during HIV-1 genomic RNA packaging. *bioRxiv*, 676031.

Pereira-Montecinos, C., Valiente-Echeverria, F., & Soto-Rifo, R. (2017). Epitranscriptomic regulation of viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(4), 460-471.

Reed, S., Staley, E., Mayginnes, J., Pintel, D., & Tullis, G. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal Of Virological Methods*, 138(1-2), 85-98.

Ries, R., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., & Pickering, B. et al. (2019). m6A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 571(7765), 424-428.

Riquelme-Barrios, S., Pereira-Montecinos, C., Valiente-Echeverría, F., & Soto-Rifo, R. (2018). Emerging roles of N6-methyladenosine on HIV-1 RNA metabolism and viral replication. *Frontiers in Microbiology*, 9, 576.

Rohr, O., Marban, C., Aunis, D., & Schaeffer, E. (2003). Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *Journal of leukocyte biology*, 74(5), 736-749.

Rottman, F., Shatkin, A., & Perry, R. (1974). Sequences containing methylated nucleotides at the 5' termini of messenger RNAs: possible implications for processing. *Cell*, 3(3), 197-199.

Roundtree, I., Evans, M., Pan, T., & He, C. (2017). Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 169(7), 1187-1200.

Schmutz, J., Martin, J., Terry, A., Couronne, O., Grimwood, J., Lowry, S. et al. (2004). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature*, 431(7006), 268.

Sears, D. (2009). Structure of HIV [Figura estructura del VIH]. Recuperado de <https://biosci.mcdb.ucsb.edu/immunology/immunodeficiencies/HIV-structure.htm>

Sharp, P., & Hahn, B. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1552), 2487-2494.

Siomi, H., & Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Current opinion in genetics & development*, 7(3), 345-353.

Sloan, K., & Bohnsack, T. (2018). Unravelling the mechanisms of RNA helicase regulation. *Trends in biochemical sciences*, 43(4), 237-250.

Soto-Rifo, R., Rubilar, P., & 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.

Soto-Rifo, R., Rubilar, P., Limousin, T., de Breyne, S., Decimo, D. & Ohlmann, T. (2012) DEAD box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *The EMBO journal*, 31, 3745-3756.

Steimer, L., & Klostermeier, D. (2012). RNA helicases in infection and disease. *RNA biology*, 9(6), 751-771.

Svicher, V., Alteri, C., D'Arrigo, R., Laganà, A., Trignetti, M., Caputo, S. et al. (2009). Treatment with the fusion inhibitor enfuvirtide influences the appearance of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 regulatory protein rev. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(7), 2816-2823.

Tanabe, A., Tanikawa, K., Tsunetomi, M., Takai, K., Ikeda, H., Konno, J. et al. (2016). RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1 α mRNA is translated. *Cancer letters*, 376(1), 34-42.

- Taniguchi, I., Mabuchi, N., & Ohno, M. (2014). HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic acids research*, *42*(10), 6645-6658.
- Tirumuru, N., Zhao, B., Lu, W., Lu, Z., He, C., & Wu, L. (2016). N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *Elife*, *5*.
- Toro-Ascuy, D., Rojas-Araya, B., García-de-Gracia, F., Rojas-Fuentes, C., Pereira-Montecinos, C., Gaete-Argel, A. et al. (2018). A Rev–CBP80–eIF4A1 complex drives Gag synthesis from the HIV-1 unspliced mRNA. *Nucleic acids research*, *46*(21), 11539-11552.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D. et al. (2014). N 6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, *505*(7481), 117-120.
- Wang, X., Zhao, B., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H. et al. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, *161*(6), 1388-1399.
- Wang, P., Doxtader, K., & Nam, Y. (2016). Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Molecular cell*, *63*(2), 306-317.
- Wang, S., Sun, C., Li, J., Zhang, E., Ma, Z., Xu, W. et al. (2017). Roles of RNA methylation by means of N6-methyladenosine (m6A) in human cancers. *Cancer letters*, *408*, 112-120.
- Wilén, C., Tilton, J., & Doms, R. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(8), a006866.
- Wojtas, M., Pandey, R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., & Pillai, R. (2017). Regulation of m 6 A Transcripts by the 3'→ 5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline. *Molecular cell*, *68*(2), 374-387.
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F. et al. (2016). Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular cell*, *61*(4), 507-519.

Xu, C., Wang, X., Liu, K., Roundtree, I. A., Tempel, W., Li, Y. et al. (2014). Structural basis for selective binding of m⁶A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nature chemical biology*, 10(11), 927.

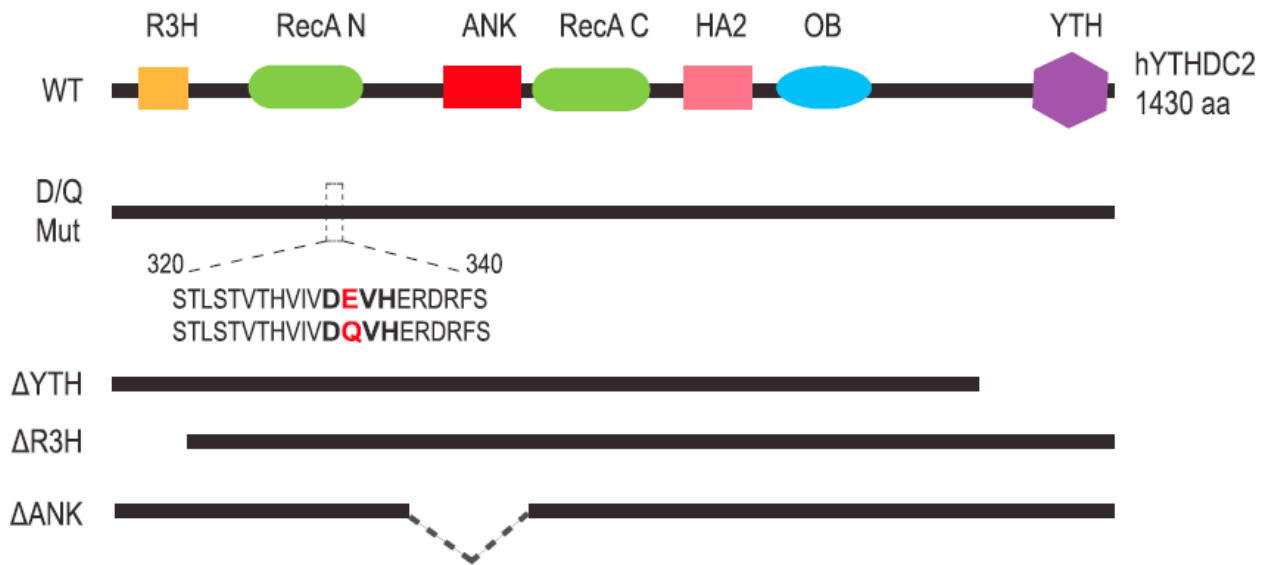
Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & development*, 29(13), 1343-1355.

Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K., Hiller, M., de la Grange, P., Pudimat, R. et al. (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14701-14710.

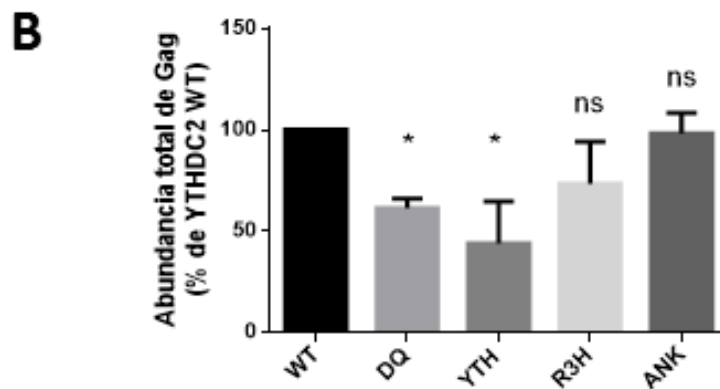
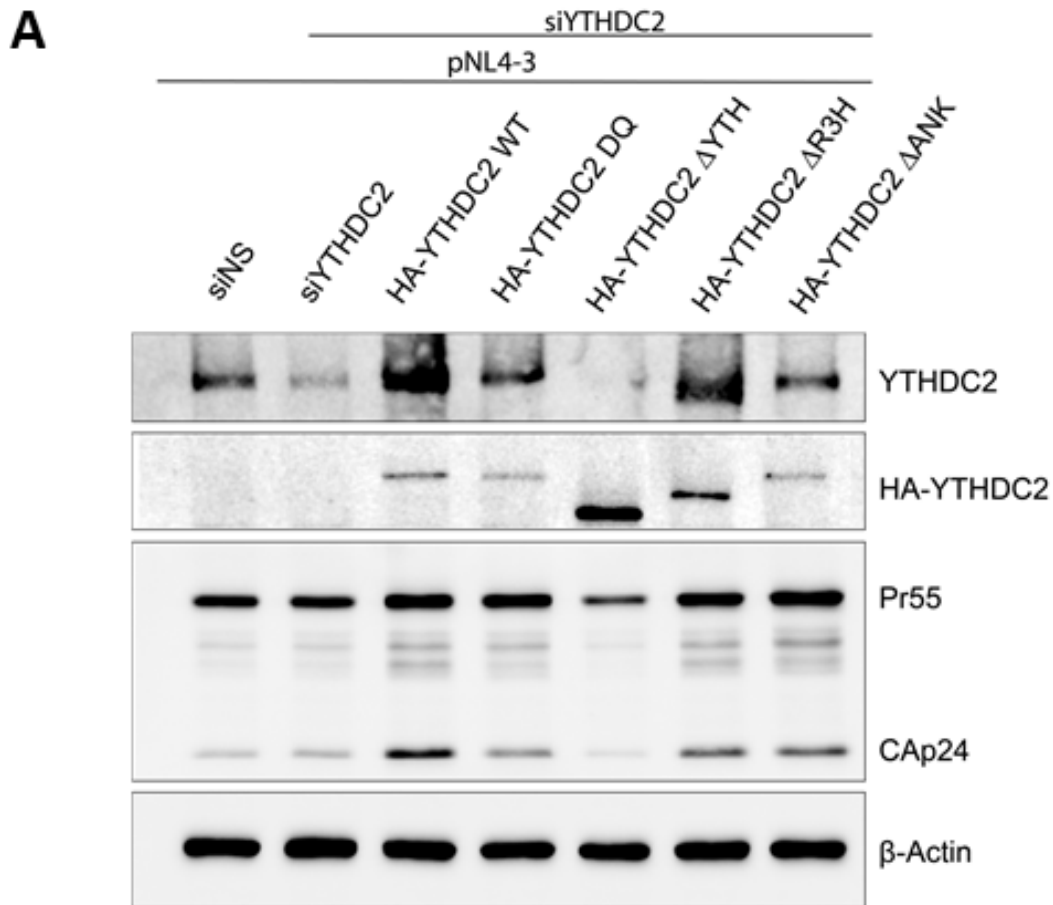
Zhao, B., Roundtree, I., & He, C. (2017). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 31.

Zheng, G., Dahl, J., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C., Li, C. et al. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell*, 49(1), 18-29.

ANEXOS



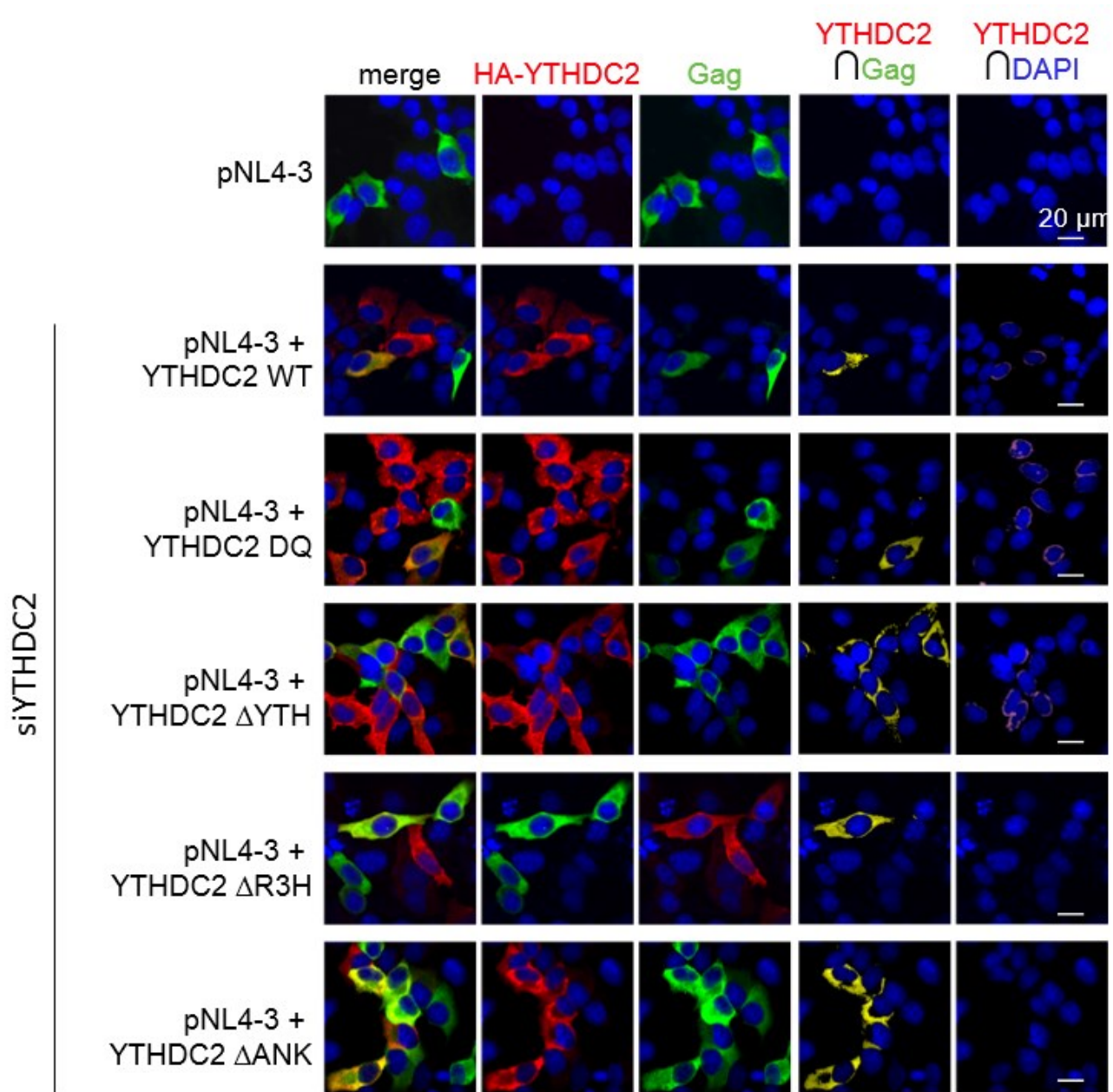
Anexo 1: Diferentes mutantes de YTHDC2 usadas en este trabajo. Esquema representativo de las secuencias primarias de YTHDC2 silvestre (WT) y mutantes Helicasa (D/Q), ΔYTH, ΔR3H y ΔANK. Obtenido de Wojtas, 2017. La versión WT, la mutante D/Q, que es una mutante con un cambio aminoacídico que elimina la actividad Helicasa de YTHDC2, la mutante ΔYTH, que es una mutante que carece de todo el dominio YTH, por lo tanto, no puede unir a m⁶A. La mutante ΔR3H, que carece de todo el dominio R3H, y la mutante ΔANK, que carece del dominio ANK y que contiene un *linker* que se posiciona dónde estaba este dominio.



Anexo 2: Western blot del ensayo de silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes de YTHDC2. Para conocer de una manera más elegante la contribución de los dominios de YTHDC2 a la síntesis de Gag se realizó un ensayo de silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes. Para esto, células HeLa se transfectaron con el siARN contra YTHDC2, 24 hpt se volvió a transfectar con el siARN y además con el vector proviral pNL4.3 más el vector que expresa a YTHDC2 WT o mutantes, y 24 h después las

células fueron colectadas y sometidas a electroforesis. Se realizó un *Western blot*, que se muestra en la figura A, y se evidencia que el dominio YTH de YTHDC2 es fundamental para estimular la expresión de Gag, en este ensayo de recuperación.

Se cuantificó la abundancia de Gag y β -Actina mediante análisis densitométrico, utilizando la herramienta ImageLab, se normalizó la abundancia de Gag por β -Actina y se tomó como 100% la recuperación lograda con YTHDC2 WT, la figura B, muestra que el dominio YTH de YTHDC2 es necesario para estimular la síntesis de Gag. Este experimento se repitió 3 veces y se aplicó un t-test para determinar diferencias significativas, ns: no significativo, * $p < 0.05$.



Anexo 3: Inmunofluorescencia del ensayo de silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes de YTHDC2

Utilizando el mismo procedimiento anterior (Anexo 2), esto es silenciamiento, transfección viral y recuperación con mutantes, con la diferencia de que las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para visualizar las mutantes de YTHDC2, utilizando un anticuerpo anti HA y la proteína viral Gag, utilizando un anticuerpo anti-p24. Este experimento se realizó una vez y se fotografiaron 5 a 10 campos por condición.