

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**IMPACTO DE LA METILACIÓN DE ADENOSINAS EN EL  
DESTINO CITOPLÁSMICO DEL ARN GENÓMICO DE VIH-1**

**CAMILA ANDREA PEREIRA MONTECINOS**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Director de Tesis: Dr. Ricardo Andrés Soto Rifo**

Octubre, 2020

Santiago, Chile

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por la candidata

**Camila Andrea Pereira Montecinos**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctora en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día

**Prof. Dr. Ricardo Soto Rifo**

**Director de Tesis**

**Dpto. de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Marcelo Lopez Lastra**

**Prof. Dra. Vivian Luchsinger**

**Prof. Dr. Assaf Katz**

**Prof. Dra. Lilian Jara**

**Presidenta Comisión de Examen**

***A mi familia***

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a mi familia, especialmente a mi esposo, padres y hermano por su apoyo y amor incondicional. Gracias por el cariño, paciencia, consejos, preocupación, amor, confianza y todo lo que me entregan día a día y en cada una de las etapas de mi vida. Los amo infinitamente.

A mis amigos, quienes me han ayudado con consejos, risas y paciencia durante este proceso. En especial a Alejandra por su incondicional apoyo, bondad, alegría e inmensa generosidad. A Daniela por su amistad, buenos consejos, paciencia y apoyo. A Paulina por su amistad, sinceridad, empatía y apoyo. A Katia, por brindarme una amistad que ha durado más de 20 años. A Alessandra por su amistad y apoyo incondicional. A Felipe Velásquez por tantos momentos de risa y amistad. A Felipe Barahona, por su amistad y alegría. A Francisco por su apoyo, consejos y amistad. A Bárbara por su sinceridad, amistad y apoyo. A Sebastián por su sinceridad y amistad.

También deseo agradecer a los integrantes del laboratorio por el apoyo en las prácticas, presentaciones y la buena disposición. En especial a Catarina, Cecilia, Aarón, Aracelly, Mónica Peña, Chantal, Vicente, Josefina, Josseline, Victoria, Dina y al Dr. Fernando Valiente por su sinceridad, consejos y apoyo.

A la comisión por sus conocimientos y buenos consejos a lo largo de este proceso, a Cecilia Carter por siempre resolver nuestros problemas y dudas. Al Dr. Julio Tapia por confiar en que yo tenía las aptitudes necesarias para realizar este doctorado.

Finalmente quiero agradecerle a mi tutor, el Dr. Ricardo Soto Rifo, por permitirme ser parte de su laboratorio hace más de 6 años. Por la paciencia que tuvo para enseñarme desde el principio, por los conocimientos entregados, por siempre confiar en que tenía las aptitudes necesarias para emprender este camino y por las distintas oportunidades que me dio a lo largo de este proceso.

## Índice de contenidos

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Índice de contenidos.....	5
Índice de tablas. ....	9
Índice de figuras.....	10
Lista de abreviaturas.....	12
Resumen.....	15
Abstract.....	17
Introducción.....	19
Virus de la inmunodeficiencia humana.....	19
1. Estructura de la partícula viral.....	20
2. Organización genómica y proteínas virales.....	21
3. Ciclo replicativo.....	22
Destino del ARNg en el citoplasma celular: Traducción y/o empaquetamiento.....	25
1. Región 5'-no traducida.....	26
2. Traducción del ARNg de VIH-1.....	27
3. Empaquetamiento del ARNg de VIH-1.....	30
4. Selección del ARNg para empaquetarse.....	35
Regulación del metabolismo de los ARNs celulares mediado por m <sup>6</sup> A.....	41
Regulación del metabolismo del ARNg de VIH-1 mediado por m <sup>6</sup> A.....	46
Hipótesis y objetivos.....	50

Hipótesis.....	50
Objetivo General.....	50
Objetivos Específicos.....	50
Materiales y métodos.....	51
Vectores de ADN.....	51
Cultivo celular y transfección de ADN.....	52
Concentración de partículas virales.....	53
Western Blot.....	53
ELISA.....	54
Extracción de ARN y RT-qPCR.....	55
Inmunoprecipitación de ARN metilado (MeRIP).....	56
Silenciamiento METTL3.....	57
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH), inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	59
Ensayo de ligación proximal ( <i>Proximity ligation assay</i> , PLA)....	60
Hibridación <i>in situ</i> acoplada a PLA (ISH-PLA)....	61
Identificación de residuos de m <sup>6</sup> A con resolución de nucleótido único usando entrecruzamiento e inmuprecipitación (miCLIP)....	62
Predicción de residuos metilados.....	63
Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizado por extension de partidores y perfil mutacional (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling, SHAPE-MaP)....	63
Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizado por extension de partidores (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension, SHAPE-CE)....	65

<b>Microscopía electrónica.....</b>	<b>66</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>68</b>
<b>La presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg interfiere en su incorporación en la partícula viral...68</b>	
1. La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 induce un aumento en los niveles de ARNg metilados .....	68
2. La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 interfiere en la incorporación del ARNg en la partícula viral.....	69
3. El silenciamiento de la expresión de METTL3 favorece la incorporación del ARNg en la partícula viral.....	73
4. La sobreexpresión de FTO favorece la incorporación del ARNg en la partícula viral.....	76
<b>La presencia de m<sup>6</sup>A afecta negativamente la interacción de Gag con el ARNg.....81</b>	
1. METTL3 interacciona con el ARNg en el núcleo celular.....	81
2. La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 disminuye la interacción Gag-ARNg.....	83
<b>La presencia de m<sup>6</sup>A induce cambios estructurales en la 5´-UTR del ARNg de VIH-1...86</b>	
<b>Gag interacciona con FTO y disminuye los niveles de metilación del ARNg.....89</b>	
1. Gag interacciona con FTO en el núcleo celular.....	89
2. Gag disminuye el estado de metilación del ARNg.....	91
<b>Las adenosinas 198 y 242 participan en la regulación del empaquetamiento del ARNg mediada por m<sup>6</sup>A.....93</b>	
1. Determinación experimental de los nucleótidos metilados en la 5´-UTR.....	93
2. La ausencia de la A <sub>198</sub> y A <sub>242</sub> (por separado) no revierten el impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 sobre el empaquetamiento del ARNg.....	94

3. La ausencia de ambas adenosinas interfiere la regulación del empaquetamiento del ARNg en la partícula viral.....	97
4. La ausencia de ambas adenosinas no altera la estructura secundaria del 5'-UTR del ARNg <i>in vitro</i> .....	101
Discusión.....	104
Conclusiones.....	114
Bibliografía.....	115



## Índice de tablas

<b>Tabla I: Secuencias de los partidores utilizados para la mutagénesis.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla II: Partidores usados para la reacción de qPCR.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla III: Secuencias utilizadas para silenciar la síntesis de METTL3 y el control utilizados.....</b>	<b>58</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Partícula de VIH-1.....	21
<b>Figura 2:</b> Ciclo replicativo de VIH-1.....	23
<b>Figura 3:</b> Genoma y transcritos de VIH-1.....	24
<b>Figura 4:</b> Arquitectura de la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.....	27
<b>Figura 5:</b> Modelos estructurales de la 5'-UTR propuestos para la regulación de la traducción y empaquetamiento del ARNg de VIH-1.....	38
<b>Figura 6:</b> Presencia de m <sup>6</sup> A en el ARNg intracelular y en partícula.....	49
<b>Figura 7:</b> Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en los niveles de ARNg metilado.....	69
<b>Figura 8:</b> Esquema del modelo experimental.....	70
<b>Figura 9:</b> Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.....	72
<b>Figura 10:</b> Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en el tamaño de las partículas virales.....	73
<b>Figura 11:</b> Impacto del silenciamiento de la expresión de METTL3 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.....	75
<b>Figura 12:</b> Impacto de la sobreexpresión de FTO en los niveles de ARNg metilados.....	77
<b>Figura 13:</b> Impacto de sobreexpresión de FTO en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.....	78

<b>Figura 14:</b> Impacto de sobreexpresión de ALKBH5 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.....	80
<b>Figura 15:</b> Interacción de METTL3 con el ARNg.....	82
<b>Figura 16:</b> Impacto de la sobreexpresión del complejo METTL3/14 en la interacción ARNg-Gag.....	84
<b>Figura 17:</b> Impacto de la sobreexpresión del complejo METTL3/14 en la estructura de la 5'-UTR del ARNg.....	88
<b>Figura 18:</b> Gag y FTO interaccionan principalmente en el núcleo celular.....	90
<b>Figura 19:</b> Impacto de Gag en el estado de metilación del ARNg.....	92
<b>Figura 20:</b> Análisis del miCLIP realizado en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.....	93
<b>Figura 21:</b> Predicción informática de los nucleótidos metilados en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.....	95
<b>Figura 22:</b> Impacto de la delección simple de A <sub>198</sub> y A <sub>242</sub> en el empaquetamiento del ARNg .....	96
<b>Figura 23:</b> Impacto de la doble delección de A <sub>198</sub> y A <sub>242</sub> en el empaquetamiento del ARNg mediado por m <sup>6</sup> A.....	98
<b>Figura 24:</b> Impacto de la doble delección de A <sub>198</sub> y A <sub>242</sub> en el empaquetamiento del ARNg.....	100
<b>Figura 25:</b> La doble delección de las adenosinas 198 y 242 no altera la estructura del 5'-UTR del ARNg.....	102
<b>Figura 26:</b> Modelo propuesto del impacto de m <sup>6</sup> A en el empaquetamiento del ARNg de VIH-1.....	112

## Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
ARNg: Ácido ribonucleico genómico  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
ARNmc: Ácido ribonucleico mensajero completo  
ARN pol II: ARN polimerasa II  
ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia  
ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal  
BMH: Estructura de tipo multi-horquilla ramificada  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CA: Cápside  
CCR5: Receptor C-C de quimioquinas tipo 5  
CD4: Cúmulo de diferenciación 4  
CXCR4: Receptor C-X-C de quimioquinas tipo 4  
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol  
DIS: Sitio de inicio de dimerización  
DTT: Ditioneitol  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
Env: Envoltura  
FISH: Hibridación *in situ* fluorescente  
FTO: Proteína asociada a obesidad  
Gag: Antígeno grupo específico  
GFP: Proteína fluorescente verde  
gp120: Glicoproteína 120  
gp41: Glicoproteína 41  
hpt: Horas post-transfección  
IN: Integrasa  
IRES: Sitio interno de entrada a ribosoma

ISH-PLA: Hibridación *in situ*-Ensayo de ligación proximal  
kb: Kilobases  
kDa: Kilo Dalton  
LDI: Estructura de interacción de larga distancia  
m<sup>6</sup>A: N<sup>6</sup>-metiladenosina  
MA: Matriz  
METTL3: Metiltransferasa tipo 3  
METTL14: Metiltransferasa tipo 14  
meRIP: Inmunoprecipitación de ARN metilado  
miCLIP: Mapeo de m<sup>6</sup>A con resolución de nucleótido único usando entrecruzamiento e inmunoprecipitación  
ml: Mililitros  
MLV: Virus de la leucemia murina  
NaCl: Cloruro de sodio  
NC: Nucleocápside  
Nef: Factor regulador negativo  
NIH: Instituto Nacional de la Salud (USA)  
nm: Nanómetros  
NP-40: Nonidet P-40  
ONU: Organización de las Naciones Unidas  
pb: Pares de bases  
PBS: Tampón fosfato salino  
PFA: Paraformaldehído  
PLA: Ensayo de ligación proximal  
Pol: Polimerasa  
PoliA: Poliadenilato  
PR: Proteasa  
pr55: Precursor de Gag  
Rev: Regulador del virión  
RRE: Elemento de respuesta a Rev  
RT-qPCR: Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SD: Sitio dador de corte y empalme  
SHAPE: Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizado por extension de partidores  
SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida  
TAR: Elemento de respuesta de trans-activación  
Tat: Trans-activador de la transcripción  
TR: Trancriptasa Reversa  
UTR: Región no traducida  
Vif: Factor de infectividad viral  
VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1  
VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 2  
Vpr: Proteína viral R  
Vpu: Proteína viral U  
VRC: Complejo de vanadyl ribonucleósido  
VSV: Virus de la estomatitis vesicular  
 $\mu\text{g}$ : Microgramos  
 $\mu\text{l}$ : Microlitros

## Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1) es el principal agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su genoma corresponde a una molécula de ARN de simple hebra con polaridad positiva (ARN genómico o ARNg), que se encuentra como un dímero en la partícula viral. Durante las etapas tardías del ciclo replicativo, el ARNg cumple dos funciones siendo utilizado como ARN mensajero para la síntesis de la proteína estructural Gag y Gag-Pol y como el genoma empaquetado en las nuevas partículas. Se ha determinado que el ARNg de VIH-1 existe como dos poblaciones que pueden cumplir una función a la vez. Análisis *in vitro* sugieren que cambios estructurales en la región 5'-no traducida (5'-UTR) del ARNg favorecen la traducción o el empaquetamiento, a pesar de que estudios estructurales realizados *ex vivo* e *in virio* no observan estas diferencias conformacionales ni un impacto de ellas en la traducción del ARNg. Adicionalmente, se reportó que la presencia de 1, 2 o 3 guanosinas en el extremo 5' del ARNg impactan su estructura y, en consecuencia, su función como mensajero o genoma. Estudios recientes han demostrado que la presencia de modificaciones químicas del tipo N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) en el ARNg favorecen la síntesis de proteínas virales. Análisis del laboratorio revelaron la presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR del ARNg que se encuentra en la célula, pero no en la 5'-UTR del ARNg presente en las partículas liberadas, sugiriendo un rol de m<sup>6</sup>A en el empaquetamiento de este. En el presente trabajo de tesis evaluamos el impacto que tiene la m<sup>6</sup>A en el empaquetamiento del ARNg. De los resultados obtenidos observamos que un aumento en los niveles de m<sup>6</sup>A, mediado por el complejo

metiltransferasa METTL3/14, induce un aumento de Gag intracelular, una disminución del empaquetamiento del ARNg, una disminución en la interacción Gag-ARNg y cambios estructurales en la 5'-UTR. La disminución en los niveles de m<sup>6</sup>A por el silenciamiento de METTL3 o la desmetilación mediada por FTO inducen un aumento del empaquetamiento del ARNg. Adicionalmente, observamos que Gag se asocia con FTO en el núcleo y disminuye los niveles de ARNg metilados. Finalmente, identificamos a las adenosinas 198 y 242 en la 5'-UTR como dos de los residuos que participarían en la regulación del empaquetamiento. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la ausencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR favorece el uso del ARNg como el genoma incorporado en las nuevas partículas virales, revelando un nuevo mecanismo molecular que regula el destino citoplásmico del ARN viral.



## Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the main etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The viral genome consists of a single stranded positive sense RNA (genomic RNA or gRNA), which is found as a dimer within the viral particle. During the late stages of viral replication, the gRNA plays two major roles by acting as the messenger RNA for the synthesis of the structural protein Gag and Gag-Pol, and as the genome packaged into newly produced viral particles. It has been shown that gRNA it exists as two populations able to play only one function at a time. *In vitro* analysis suggested that structural switches within the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the gRNA favors translation or packaging, despite the fact that structural analysis *ex vivo* and *in virio* do not support the existence of these conformational differences or an impact on gRNA translation. Additionally, it has been reported that the presence of 1, 2 or 3 guanosines at the 5' of the gRNA impact its structure, and, in consequence, its function as a mRNA or genome. It was recently reported that the presence of the post-transcriptional modification N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) on the HIV-1 gRNA promotes viral protein synthesis. Analysis of our laboratory revealed that the 5'-UTR of the gRNA contains m<sup>6</sup>A within the cell, but not in the viral particle, indicating that the absence of m<sup>6</sup>A within the 5'-UTR is probably necessary for the packaging of the gRNA. In the present thesis, we have evaluated the impact of m<sup>6</sup>A on the packaging of the HIV-1 gRNA. We observed that the increase on m<sup>6</sup>A levels, mediated by METTL3/14, induce an increase on intracellular Gag together with a strong decrease of the gRNA packaged into released viral particles, a decrease on Gag-gRNA

interaction and structural changes in the 5'-UTR. The decrease of m<sup>6</sup>A level (mediated by METTL3 knockdown or FTO overexpression) induced an increase in the packaged gRNA. Interestingly, HIV-1 Gag associates with FTO in the nucleus to decrease the levels of methylated gRNA. Finally, we identified adenosines 198 and 242 within the 5'-UTR as two key residues responsible for the regulation of gRNA packaging mediated by m<sup>6</sup>A. Together, the results obtained in this thesis suggest that the presence of m<sup>6</sup>A on the 5'-UTR determines the use of the gRNA as the packaged genome revealing a novel molecular mechanism regulating the cytoplasmic fate of this viral RNA.

## Introducción

### **Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

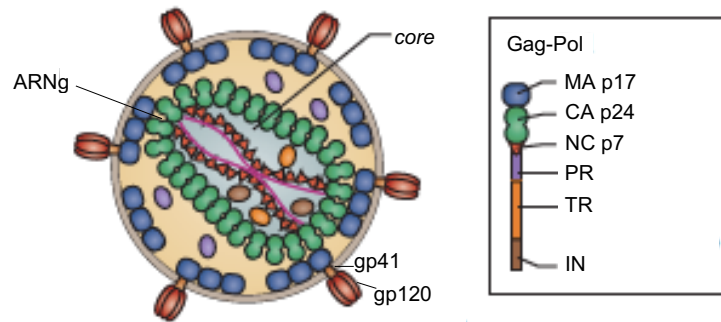
El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece al género Lentivirus de la familia *Retroviridae* (Chiu et al. 1985; Sonigo et al. 1985) y es el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Existen dos tipos de VIH, el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2), donde VIH-1 es el responsable de la pandemia. De acuerdo con las cifras del último reporte entregado por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA), en la actualidad existen 38 millones de personas que viven con VIH-1 en el mundo (Onusida, Hoja Informativa Mundial. 2019). A nivel nacional, se reportó un aumento del 34% de nuevos casos de infección en los últimos 8 años (UNAIDS 2019). A pesar del éxito de los tratamientos existentes, aún no es posible erradicar el virus del organismo y en consecuencia el SIDA es considerado una enfermedad crónica no curable que requiere tratamiento de por vida.

El aislamiento y descubrimiento del VIH-1 como el patógeno responsable del SIDA ocurre por primera vez en 1983, con el análisis de un ganglio linfático de un paciente con una linfadenopatía (Barré-Sinoussi et al. 1983). Sin embargo, se ha establecido que el origen de este virus ocurrió por la transmisión zoonótica del virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) desde primates no humanos (chimpancé y gorilas) a humanos (Hirsch et al. 1989; Peeters et al. 1989; Plantier et al. 2009). Basado en análisis filogenéticos de numerosos aislados virales, obtenidos de diversos

orígenes geográficos, se observó que el VIH-1 puede ser clasificado en 4 grupos: M, N, O y P, siendo el grupo M el responsable de la pandemia. Se ha reportado que los grupos M y N tienen su origen en SIV de chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*) y los grupos O y P en gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) (D'arc et al. 2017; Sharp and Hahn 2011). El grupo M, a su vez, se clasifica en los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K y L; y los virus recombinantes de diversos subtipos son denominados Formas Recombinantes Circulantes (CRF, por sus iniciales en inglés) (D'arc et al. 2017; Sharp and Hahn 2011; Yamaguchi et al. 2020).

### **1. Estructura de la partícula viral**

La partícula de VIH-1 tiene un tamaño que varía entre los 80 y 120 nanómetros (nm) de diámetro (Gentile et al. 1994). Su envoltura corresponde a una membrana lipídica de origen celular donde se encuentran insertas las glicoproteínas de superficie (gp120) y de transmembrana (gp41) (Turner and Summers 1999). Asociada a la parte interna de la membrana lipídica se encuentra la proteína Matriz (MA p17) y hacia el interior de la partícula se encuentra la cápside, compuesta por la proteína Cápside (CA p24), que contiene el genoma viral junto con las proteínas Nucleocápside (NC p7) y las enzimas virales Proteasa (PR), Transcriptasa reversa (TR) e Integrasa (IN). El genoma de VIH-1 consiste en una molécula de ARN hebra simple polaridad positiva, denominada ARN genómico (ARNg), la cual se encuentra como un dímero al interior de la partícula (J L Clever, Wong, and Parslow 1996; Moore and Hu 2009; Jean Christophe Paillart et al. 2004) (Figura 1).



**Figura 1: Partícula de VIH-1.** Modelo de la partícula de VIH-1 con las glicoproteínas de superficies y transmembrana (gp120 y gp41), los dominios de Gag-Pol (MA p17, CA p24, NC p7, PR, TR e IN) y el dímero de ARNg. Modificado de (Freed 2015).

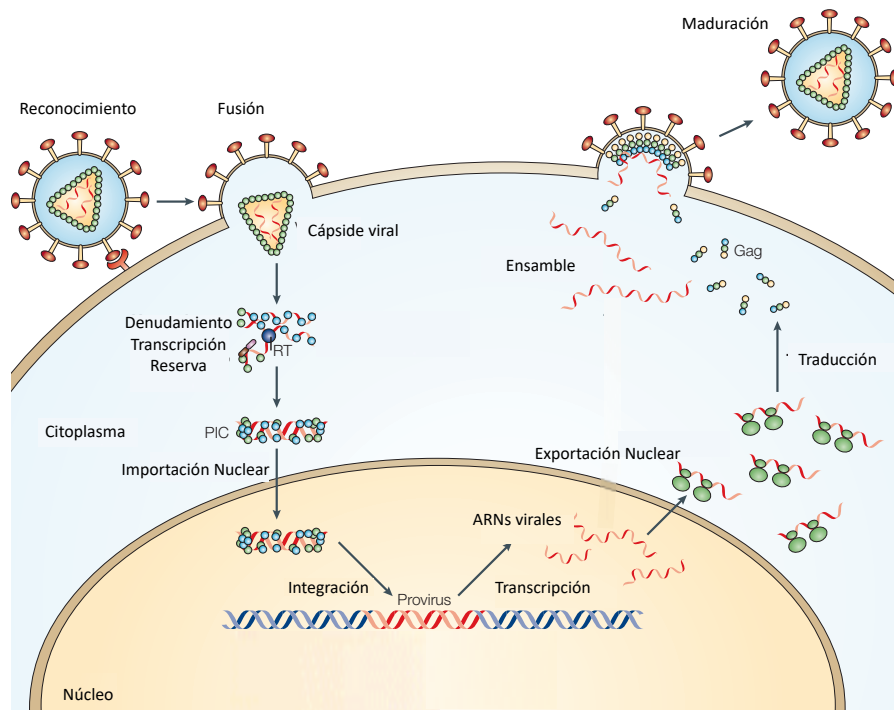
## 2. Organización genómica y proteínas virales

El genoma de VIH-1 posee un tamaño de 9-kb y codifica 9 genes que permiten la síntesis de 15 proteínas virales. La proteína estructural Gag de 55 kDa (Gag p55) es procesada en las proteínas Matriz (MA p17), Cápside (CA p24), Nucleocápside (NC p7) y p6 (Mailler et al. 2016a). La proteína Gag-Pol es procesada en las enzimas Proteasa (PR), Transcriptasa reversa (TR) e Integrasa (IN). Por otro lado, la proteína Env origina las glicoproteínas de superficie (gp120) y transmembrana (gp41). Adicionalmente, VIH-1 codifica las proteínas regulatorias Rev y Tat, donde Rev participa en la exportación nuclear de los transcritos virales, como se mencionará posteriormente (Malim et al. 1989) y Tat es una proteína esencial para la transcripción (Li et al. 2005; Q. Zhou and Sharp 1995). Por otro lado, VIH-1 codifica las proteínas accesorias Nef, Vif, Vpr y Vpu, las cuales participan en diferentes etapas del ciclo replicativo viral.

### **3. Ciclo replicativo**

El VIH-1 infecta principalmente células del sistema inmune como linfocitos-T, células dendríticas o macrófagos, las cuales expresan el receptor CD4 y uno de los co-receptores de quimioquinas, CCR5 o CXCR4, necesarios para la entrada del virus.

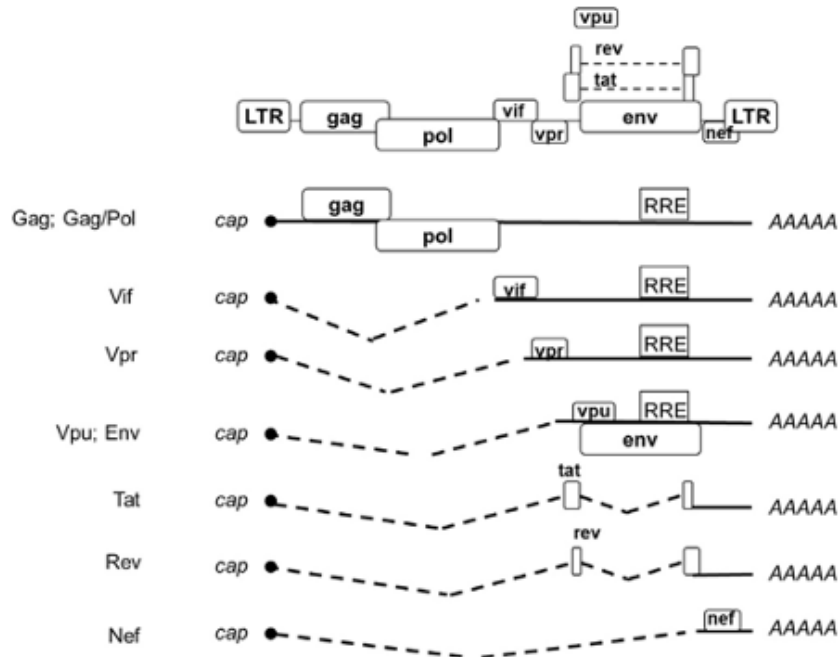
El ciclo replicativo viral comienza con la interacción de las glicoproteínas de superficie y transmembrana con los receptores y co-receptores de la célula hospedera para que ocurra la fusión de membranas (Grewe, Beck, and Gelderblom 1990). Posteriormente, la cápside viral ingresa al citoplasma celular, donde las moléculas de ARN<sub>v</sub> son retrotranscritas por la transcriptasa reversa viral en una molécula de ADN de doble hebra (Hu and Hughes 2012) que es importado al núcleo e integrado en un cromosoma celular por acción de la enzima integrasa, estableciendo el estado denominado provirus (Figura 2) (Frankel and Young 1998). Cabe destacar que una vez ocurrida la integración, el provirus puede permanecer latente o iniciar el programa de expresión génica viral (Siliciano and Greene 2011).



**Figura 2: Ciclo replicativo de VIH-1.** Resumen esquemático del ciclo replicativo de VIH-1. Modificado de (Nisole, Stoye, and Saïb 2005).

La transcripción del provirus, es regulada por la proteína viral Tat que interacciona con la región TAR (región de transactivación) presente en el ARNg para promover la transcripción de este (Karn and Stoltzfus 2012). Comandada por la ARN polimerasa II (ARN pol II), la transcripción del provirus da origen al ARNg (9-kb) o también denominado ARN mensajero completo (ARNmc), el cual posee una estructura 7-metilguanosa ( $m^7GpppN$ , donde N es cualquier nucleótido) o cap en su extremo 5' y una cola de poliadenilato (poliA) en su extremo 3'. El ARNg, mediante corte y empalme alternativo, permite la generación de los ARNs mensajeros (ARNm) parcialmente procesados de 4-kb que codifican las proteínas virales Env, Vpu, Vif y Vpr y los ARNm completamente procesados de 2-kb que codifican las proteínas Tat, Rev y Nef. El

ARNg o ARNmc de 9-kb, que no sufre corte y empalme, codifica para las proteínas Gag y Gag-Pol (Figura 3) (Karn and Stoltzfus 2012).



**Figura 3: Genoma y transcritos de VIH-1.** Genoma de VIH-1 (arriba) y representación de los diferentes tipos de transcritos virales. Modificado de (Kuzembayeva et al. 2014).

Los transcritos completamente procesados (2-kb) son exportados por la vía canónica de exportación nuclear de los ARNm celulares, la cual es mediada por el factor de exportación NXF1 (Cullen 2003; Sandri-Goldin 2004). Por otro lado, los ARNs mensajeros (ARNm) que contienen intrones (9-kb y 4-kb) son exportados desde el núcleo al citoplasma gracias al factor de exportación celular CRM1 y la proteína viral Rev, que interacciona con el elemento de respuesta a Rev (RRE) presente en la región del gen *env* en los ARNs virales (Cullen 2003; Sandri-Goldin 2004). Adicional al rol en exportación nuclear, se ha descrito que Rev promueve la asociación de los transcritos de 9-kb con los ribosomas (Arrigo and Chen 1991; Kimura et al. 1996; D. Toro-Ascuy



et al. 2018). Una vez en el citoplasma, los transcritos virales reclutan la maquinaria de traducción celular para ser traducidos y sintetizar las proteínas virales, necesarias para completar el ciclo replicativo viral. El ARNg también es usado como el genoma que se empaquetará como un dímero en la nueva partícula viral que será liberada (Kuzembayeva et al. 2014). Posterior a la liberación de la partícula viral, la proteasa viral (PR) procesa el precursor de Gag en los dominios MA p17, CA p24, NC p7 y p6. El procesamiento de Gag gatilla la transformación morfológica del virión, proceso conocido como maduración (Freed 2015).

### **Destino del ARNg en el citoplasma celular: Traducción y/o empaquetamiento**

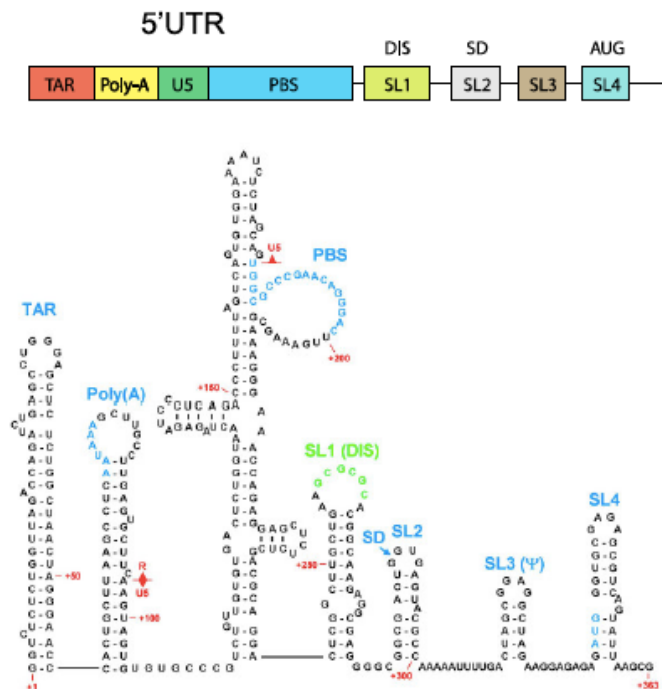
Cómo se puede apreciar, el ARNg de VIH-1 cumple tres funciones posteriores a la transcripción, claves para el éxito del ciclo replicativo viral. A nivel nuclear, el ARNg es usado como pre-ARN mensajero (pre-ARNm) originando, mediante corte y empalme alternativo, los transcritos de 4-kb y 2-kb. A nivel citoplásmico, el ARNg es usado, por un lado, como ARNm para la síntesis de las proteínas Gag y Gag-Pol y, por otro lado, como el genoma que se empaquetará en la nueva partícula viral. Por décadas ha sido de gran interés entender los mecanismos involucrados en la regulación de las funciones citoplásmicas del ARNg, fundamentales para el éxito del ciclo replicativo viral. El hecho de que la maquinaria de traducción y de ensamble de partículas puedan competir por la utilización del ARNg ha llevado a pensar que necesariamente debe existir una regulación entre estos dos procesos (Mailler et al. 2016b). Grandes esfuerzos se han realizado en el área, donde muchos grupos de investigación han propuesto modelos de regulación de la traducción y el empaquetamiento del ARNg de VIH-1 (Mailler et al. 2016b). Sin embargo, a pesar de lo mucho que se ha avanzado en

este conocimiento, aún existen una serie de interrogantes por contestar que permitan entender los mecanismos moleculares asociados a definir si el ARNg será preferencialmente traducido o empaquetado. Sin embargo, existe consenso en que la región 5'-no traducida (5'-UTR) es clave en la regulación de ambos procesos, donde el reconocimiento de esta región a través del dominio nucleocápside (NC p7) de Gag es fundamental para que el ARNg sea seleccionado para empaquetarse.

### **1. Región 5'-no traducida**

La 5'-UTR del ARNg de VIH-1 es una región altamente conservada entre las diferentes cepas y aislados virales. Esta región contiene 336 nucleótidos (nt) de largo (en los aislados NL4.3 y LAI) y se organiza en dominios estructurales y funcionales que regulan pasos claves en el ciclo replicativo viral como la transcripción reversa, transcripción, dimerización, inicio de la traducción y el empaquetamiento (B. Berkhout 1996; J. Paillart et al. 2004). Desde 5' a 3', la primera región estructural es la región de transactivación (TAR) la cual es reconocida por la proteína viral Tat y es esencial para la transcripción de los transcritos virales (Karn and Stoltzfus 2012). La horquilla de poliadenilación (poliA) contiene la señal de poliadenilación, presente en la 5'-UTR y en la 3'-UTR, pero utilizada sólo cuando está presente en la región 3'-UTR (Cochrane, McNally, and Mouland 2006). La región del sitio de unión al partidor (PBS) es una región importante en el reclutamiento del tRNA<sup>Lys3</sup>, el cuál es utilizado como partidor para iniciar el proceso de transcripción reversa del ARNg en la siguiente ronda de replicación (Arts and Grice 1997). Río abajo se encuentra el sitio de inicio de la dimerización en la horquilla SL1 (DIS o SL1), región fundamental para la dimerización del ARNg durante el empaquetamiento de este (Ohlmann, Mengardi, and López-Lastra

2014; J. Paillart et al. 2004). Por otro lado, el sitio dador de corte y empalme (SD o SL2) es usado durante el procesamiento del ARN viral por el splicesoma, la señal de empaquetamiento ( $\psi$  o SL3) es necesaria para la encapsidación del ARNg y el codón AUG necesario para el inicio de la traducción (SL4) (Figura 4) (D'Souza and Summers 2005; Mailler et al. 2016b).



**Figura 4: Arquitectura de la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.** Esquema del 5'-UTR del ARNg, donde se muestran la región de *trans*-activación (TAR), la señal de poliadenilación (poliA), la región PBS y las cuatro horquillas SL1, SL2, SL3 y SL4 con el sitio de inicio de la dimerización (DIS), la señal de empaquetamiento ( $\psi$ ) y el codón de inicio de la traducción AUG, respectivamente. Modificado de (Mailler et al. 2016a).

## 2. Traducción del ARNg de VIH-1

La traducción de los ARNm celulares es un proceso complejo en el cual participan una gran cantidad de proteínas celulares. Este proceso está compuesto principalmente por

tres pasos: inicio, elongación y terminación (Guerrero et al. 2015). Brevemente, el inicio de la traducción comienza con la unión de la subunidad ribosomal 40S al 5' cap del ARNm, para que luego ocurra la progresión del ribosoma en una dirección de 5' a 3' para reconocer el codón de inicio de la traducción (AUG) y el posicionamiento de la subunidad mayor del ribosoma al ARNm. Posteriormente, la elongación consiste en la formación del enlace peptídico entre los aminoacil-tRNA y el péptido nascente. Finalmente, el término de la traducción se da con el reconocimiento del codón de término por los factores de liberación, induciendo la liberación de las subunidades ribosomales y del péptido recién sintetizado (de Breyne and Ohlmann 2019; Ohlmann, Mengardi, and López-Lastra 2014).

La mayoría de los ARNm eucariontes inician la traducción por un mecanismo dependiente del 5' cap. El reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S a la estructura cap del ARNm ocurre como parte de un complejo de iniciación 43S, compuesto por la subunidad ribosomal unida al complejo eIF2-GTP/Met-ARNt (ARNt iniciador) junto a los factores de inicio de la traducción eIF1A, eIF1, eIF3 y eIF5. Para este reclutamiento es necesario el complejo eIF4F, compuesto por las proteínas eIF4E, eIF4A y eIF4G (Jackson, Hellen, and Pestova 2010; Sonenberg and Hinnebusch 2009). La estructura 5' cap del ARNm es reconocida por eIF4E; eIF4G participa como una proteína andamio que interacciona con eIF4E y eIF4A. La proteína eIF4A es una proteína helicasa de ARN de la familia DEAD-box y participa en la desestructuración del ARNm. Por otro lado, la interacción de eIF4G con la proteína de unión a poliA (PABP), que a su vez interacciona con la cola poliA permite la circularización del ARNm, conformación física favorable para que ocurra la iniciación y el reciclaje de ribosomas (de Breyne

and Ohlmann 2019; Kahvejian, Roy, and Sonenberg 2001; Ohlmann, Mengardi, and López-Lastra 2014). La interacción entre eIF4G con eIF3 permite reclutar el complejo 43S, el cual “recorre” la 5'-UTR del ARNm hasta reconocer el codón de inicio AUG mediante complementariedad con el anticodón del ARNt iniciador. Posterior al reconocimiento del codón AUG se gatilla la liberación de los factores de inicio de la traducción y la subunidad 60S se posiciona sobre el ARNm, formando el ribosoma 80S con el ARNt iniciador en el sitio P del ribosoma, terminando el paso de inicio de la traducción.

Un mecanismo alternativo es el inicio de la traducción independiente del 5' cap, mediante el uso de sitios internos de entrada a ribosomas (IRES), el cual fue descrito primeramente en ARNm virales de la familia *Picornaviridae* (Jang et al. 1988; Pelletier and Sonenberg 1988). Los IRES corresponden a elementos de ARN capaces de reclutar la maquinaria de traducción de manera independiente del 5' cap (Ohlmann, Mengardi, and López-Lastra 2014). Este mecanismo de inicio de la traducción requiere, además, la interacción del IRES con proteínas no relacionadas con los componentes canónicos de la traducción, proteínas denominadas como factores transactivadores de IRES (ITAFs) (López-Lastra, Rivas, and Barriá 2005).

El ARNg de VIH-1 puede iniciar la traducción para sintetizar las proteínas Gag y Gag-Pol por un mecanismo dependiente del 5' cap o mediada por IRES (Barrera et al. 2020; Ben Berkhout, Arts, and Abbink 2011; Brasey et al. 2003; Monette et al. 2013; Plank, Whitehurst, and Kieft 2013; Ricci et al. 2008). Se ha reportado que en las primeras 24-48 horas post-infección, la síntesis de las proteínas virales de VIH-1 dependen de una

traducción dependiente del 5' cap, mientras que en etapas posteriores el inicio de la traducción es mediada por IRES (Amorim et al. 2014; Guerrero et al. 2015). El inicio de la traducción dependiente del 5' cap ha sido observado *in vitro* (Ricci et al. 2008) y *ex vivo* (Ben Berkhout, Arts, and Abbink 2011; Miele et al. 1996; Soto-Rifo, Limousin, et al. 2012; Soto-Rifo, Rubilar, et al. 2012), mediante el cual se reconoce el ARN viral para promover el reclutamiento del complejo 43S.

Además de la estructura cap, el ARNg de VIH-1 presenta dos IRES: uno en la 5'-UTR y otro en la región codificante de Gag. El IRES de la región 5'-UTR ha sido ampliamente caracterizado en el clon proviral de VIH-1 (pNL4.3) (Brasey et al. 2003), en el aislado LAI (Gendron et al. 2011; Vallejos et al. 2012) y en ARN viral aislado de muestras clínicas (Vallejos et al. 2012). El IRES mínimo en la 5'-UTR abarca desde el nucleótido 104 al nucleótido 336, región que coincide con el PBS, DIS, SD y  $\psi$  (Brasey et al. 2003) y ha sido descrito que es estimulado por el ciclo celular y por ITAFs celulares (de Breyne and Ohlmann 2019; Vallejos et al. 2011).

### **3. Empaquetamiento del ARNg de VIH-1**

El proceso de empaquetamiento del ARNg es un proceso complejo, altamente regulado, que requiere una serie de pasos cuyos parámetros espaciales y temporales no son completamente conocidos (Mailler et al. 2016b). Este proceso involucra la incorporación del ARN viral, ARNs celulares, proteínas celulares y proteínas virales en la nueva partícula viral que se está formando (Kuzembayeva et al. 2014).

Para generar partículas infecciosas, durante la formación de las nuevas partículas virales se deben seleccionar dos copias de ARNg (Chen et al. 2009; Mailler et al. 2016b; Jean Christophe Paillart et al. 2004), que interaccionan entre sí de manera no covalente por un proceso denominado dimerización (Jean Christophe Paillart et al. 2004). La interacción entre las dos moléculas de ARNg inicia en la región DIS (SL1), región con una secuencia palindrómica de 6 nt (Abbink and Berkhout 2003; Van Bel et al. 2014; Jean Christophe Paillart et al. 1994, 1996; Skripkin et al. 1994). Se ha descrito que la dimerización del ARNg es un paso crítico para el empaquetamiento selectivo del ARNg (B Berkhout and van Wamel 1996; Houzet et al. 2007; J C Paillart et al. 1996). Mas aún, se ha reportado que si dos señales de dimerización (DIS) están presentes en la misma molécula de ARN viral, esta puede formar un dímero intramolecular y empaquetarse como un monómero, sugiriendo que el dímero de ARNg es la unidad de reconocimiento para el empaquetamiento en la nueva partícula (O. A. Nikolaitchik et al. 2013). Es importante mencionar, que ha surgido evidencia que indica que pueden existir otros sitios de dimerización adicionales, pero estos aún no han sido caracterizados en profundidad (Hill et al. 2003; Sakuragi and Panganiban 1997). Adicional a su rol en empaquetamiento, se ha observado que la dimerización del ARNg podría tener un impacto en otras etapas del ciclo replicativo viral como la transcripción reversa y traducción (Boeras et al. 2017; Sergei Kharytonchyk and Pedersen 2010; Mikkelsen and Pedersen 2000).

Para que el ARNg sea seleccionado para empaquetarse es clave también la interacción entre el dominio NC de Gag y secuencias presentes en la 5'-UTR del ARNg (Larson et al. 2003; Mattei et al. 2015), donde se ha demostrado que esta interacción

favorece la selección del ARNg sobre otras especies de ARN, favoreciendo la especificidad de encapsidación (Kuzembayeva et al. 2014; Mailler et al. 2016). El dominio NC contiene dos dominios de dedos de zinc (*zinc finger*) que son fundamentales en la interacción con el ARNg (Stephen Campbell and Rein 1999; Cimarelli et al. 2000; Muriaux et al. 2001). Sin embargo, análisis *in vitro* demuestran que Gag tiene mayor afinidad por el ARNg que el dominio NC aislado, sugiriendo que otros dominios contribuyen a la interacción Gag-ARNg (Berkowitz, Luban, and Goff 1993; Cruceanu et al. 2006; Damgaard, Dyhr-Mikkelsen, and Kjems 1998; El-Wahab et al. 2014; Rein et al. 2011). Mediante ensayos de inmunoprecipitación y qRT-PCR se ha propuesto que la interacción inicial entre Gag y el ARNg ocurriría en el citoplasma (Kutluay and Bieniasz 2010).

Posterior a la interacción entre el ARNg y NC se produce la interacción entre moléculas de Gag, proceso denominado como multimerización, el cual está mediado por el dominio CA de Gag. Mediante microscopía confocal se ha visto que este proceso ocurre extensivamente en la membrana plasmática (S Campbell and Vogt 1995; Hendrix et al. 2015; Rein et al. 2011).

El ensamblaje de la partícula ocurre en la membrana celular, particularmente en dominios discretos de la membrana conocidas como balsas lipídicas (*lipids rafts*) (Jouvenet et al. 2006). Se ha observado que el dominio MA participa en la interacción del complejo Gag-ARN con la membrana celular, mediante interacciones hidrofóbicas con lípidos en la membrana (Mailler et al. 2016b) y promueve la incorporación de la glicoproteína Env en el virión que se está formando. Muchas proteínas celulares como



ABCE1 (Lingappa et al. 2006; Robinson et al. 2014), Staufen1 (Mouland et al. 2000) y DDX6 (Reed et al. 2012) participan en el transporte del complejo Gag-ARNg a la membrana. Finalmente, p6 participa en la liberación de la partícula ensamblada desde la célula hospedera a través del reclutamiento del complejo ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), el cual cataliza la fisión de la membrana para completar el proceso de gemación de la partícula viral (Demirov, Orenstein, and Freed 2002).

La incorporación selectiva del ARNg por sobre los ARNs celulares y los otros ARNs virales es esencial para la replicación viral (Sun, Rao, and Rossmann 2010). A pesar de que el ARNg representa menos del 1% de todos los ARNs que se encuentran en el citoplasma (incluyendo ARNs virales y celulares), este se encuentra en más del 90% de las nuevas partículas formadas (Chen et al. 2009), indicando la selectividad de encapsidación del ARNg.

Como se mencionó anteriormente, el empaquetamiento selectivo del ARNg es un proceso mediado por interacciones específicas entre regiones del ARN con el dominio NC de Gag. Mediante deleciones en la 5'-UTR del ARNg se ha buscado identificar aquellos dominios que son importantes para el empaquetamiento de este, algunos estudios han identificado al dominio  $\psi$  (SL3) como la mayor señal de empaquetamiento en VIH-1 (Aldovini and Young 1990; Clavel and Orenstein 1990; A Lever et al. 1989), donde recientemente se reportó que la secuencia GGAG en  $\psi$  es crítica para la unión de NC y el posterior empaquetamiento del ARNg (Pengfei Ding et al. 2020). Por otro

lado, mediante estudios de *footprinting*, mutagénesis y análisis de mapeo de interferencia mutacional (MIME), se definió que la región que va desde el nucleótido 227 al 337 (en VIH-1 NL4.3) es crítica para la unión a Gag con el ARNg *in vitro* y se demostró que la horquilla SL1 (donde se encuentra DIS) sería más importante que SL3 para la unión del ARN viral con Gag (Smyth et al. 2015). Estos datos coinciden con los sitios de unión a NC identificados en la 5'-UTR del ARNg mediante ensayos de entrecruzamiento e inmunoprecipitación acoplado a secuenciación masiva paralela (CLIP-seq) en células (Kutluay et al. 2014).

Dado que en SL1 se encuentra la señal de dimerización y una de las señales de empaquetamiento es que se ha postulado que Gag reconoce al dímero de ARNg por sobre los monómeros de ARNg, donde ambos procesos están fuertemente relacionados (B Berkhout and van Wamel 1996; Houzet et al. 2007; Laughrea et al. 1997; Mailler et al. 2016b). Es importante destacar que la conformación estructural de estas regiones es fundamental en la interacción del ARNg con Gag y el posterior empaquetamiento del ARN viral. De esta forma, mientras deleciones en SL3 que preservan la estructura sólo afectan el empaquetamiento del ARNg moderadamente (Clavel and Orenstein 1990; Harrison et al. 1998), deleciones que destruyen la estructura decrecen el empaquetamiento en más de mil veces, indicando la relevancia de la estructura en la selección y empaquetamiento del ARNg (Aldovini and Young 1990).

Adicionalmente, mediante ensayos de deleciones se ha reportado que las regiones TAR (Helga-Maria, Hammarskjöld, and Rekosh 1999), poliA (Russell et al. 2002), PBS

(Jared L. Clever, Miranda, and Parslow 2002) y los primeros nucleótidos de la región codificante para Gag (Luban and Goff 1994; O. Nikolaitchik et al. 2006) también contribuyen al empaquetamiento del ARNg.

#### **4. Selección del ARNg para empaquetarse**

Como se ha reiterado, el ARNg cumple dos funciones citoplásmicas en el ciclo replicativo viral siendo el ARNm del cual se sintetiza Gag y Gag-Pol, y por otro lado siendo el genoma que se empaquetará en la nueva partícula viral. Adicional a comprender como ocurre la incorporación selectiva del ARNg por sobre otros ARNs (mediada por la dimerización de este y el reconocimiento específico de Gag por la 5'-UTR), muchos grupos han investigado cuales son los mecanismos moleculares que promueven que el ARNg se empaquete o que, por el contrario, interaccione con la maquinaria de traducción celular, siendo utilizado como ARN mensajero.

Una de las primeras interrogantes a dilucidar es si el ARNg existe como dos poblaciones de ARN definidas y destinadas a cumplir cada función o si existe como una sola población que puede cumplir ambas funciones. En el caso del virus de la leucemia murina (MLV), un retrovirus simple, se ha reportado mediante análisis con un inhibidor de la transcripción (actinomicina D) que su ARNg existe como dos poblaciones definidas, una población que actúa como mensajero y otra que actúa como genoma (Levin et al. 1974). Consistente con esta segregación, un estudio demostró que ambas poblaciones de ARNg de MLV se exportan desde el núcleo de manera diferente, donde el ARNg que se utiliza como ARNm es exportado a través de NXF1 mientras que el ARNg que será usado como genoma es exportado vía CRM1

(Mougel et al. 2020). Se ha sugerido que las vías de exportación nuclear tienen una influencia en eventos citoplásmicos posteriores, como el ensamble de la partícula viral (Mailler et al. 2016b; Pocock et al. 2016).

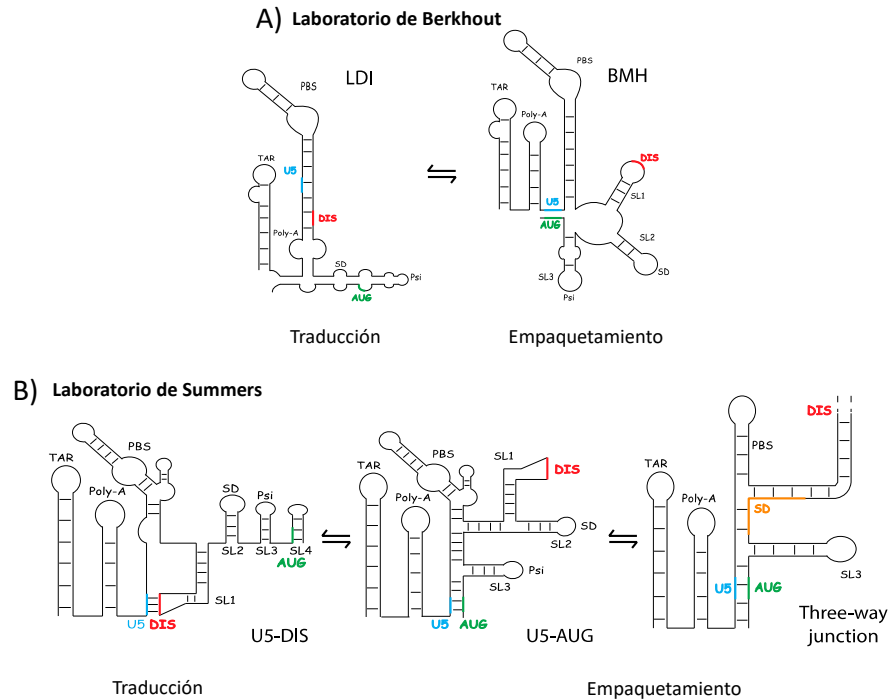
Contrario a MLV, mediante análisis con inhibidores de la transcripción e inhibidores de la exportación nuclear, se ha propuesto que el ARNg de VIH-1 puede ser usado indistintamente como ARNm o como genoma y pese a que no se descarta que sea posible que existan al menos dos poblaciones de ARNg, no se pudo determinar una separación funcional de estos (Dorman and Lever 2000). Adicionalmente, mediante análisis con inhibidores de la traducción en células T infectadas con VIH-1, se ha propuesto que la traducción del ARNg no es un requisito para el empaquetamiento de este descartando el empaquetamiento co-traducciona como mecanismo para la selectividad del ARNg que será incorporado en las nuevas partículas (M Butsch and Boris-Lawrie 2000; Andrew Lever 2000; McBride, Schwartz, and Panganiban 1997).

Consistente con esta observación, recientemente se reportó que alrededor del 50% del ARNg citoplásmico se encuentra activamente traduciendo, proporción no alterada por la expresión de Gag (Chen et al. 2020). A pesar de que los autores encontraron que el ARNg que traduce y el que no traduce exhiben movimientos citoplásmicos que pueden llegar a la membrana plasmática, observaron que Gag selecciona específicamente a moléculas de ARNg que no se encuentran traduciendo para ser encapsidadas, sugiriendo que, aunque el ARNg puede cumplir la función de mensajero y genoma, sólo pueden llevar a cabo una función a la vez.

Si el ARNg de VIH-1 puede cumplir ambas funciones indistintamente, pero sólo puede cumplir una función a la vez, entonces cabe preguntarse ¿cómo se distinguen las moléculas de ARNg que se empaquetarán de aquellas que serán traducidas?

Diferentes grupos de investigación, realizando estudios estructurales *in vitro* del ARNg, han propuesto que la selección de este como ARNm o como genoma estaría regulada por un ribointerruptor en la 5'-UTR, donde cambios conformacionales en esta región favorecerían uno de los dos procesos (Figura 5). Si bien, los modelos propuestos presentan algunas diferencias, ambos se basan en que en una estructura donde exista una interacción de la región única 5' (U5) con el sitio de inicio de la dimerización (U5-DIS), la región DIS quedaría ocluida y el codón AUG de Gag expuesto para promover la traducción. Por el contrario, en una estructura donde ocurra la interacción U5-AUG, se expondría DIS (SL1), y esta conformación sería competente con la dimerización y el subsecuente empaquetamiento, por sobre la traducción. En el caso del modelo presentado por el grupo liderado por Berkhout, estas estructuras se denominan estructura con interacciones de larga distancia (LDI) y estructura del tipo multi-horquilla ramificada (BMH), respectivamente (Figura 5A) (Abbink and Berkhout 2003; Huthoff and Berkhout 2001). En el caso del modelo propuesto por el grupo liderado por Summers, mediante análisis estructurales de resonancia magnética nuclear (NMR), demostraron que adicionalmente existe una estructura donde la interacción U5-AUG se extiende hasta incluir residuos del sitio dador de corte y empalme (SD), mientras expone los residuos claves que favorecen la interacción con NC, esta estructura es una conformación del tipo *three-way junction* (Figura 5B) (Keane et al. 2015). Los

detalles de estas propuestas han ido avanzando con el tiempo, pero la idea básica sigue siendo ampliamente aceptada (Rein 2019).



**Figura 5: Modelos estructurales de la 5'-UTR propuestos para la regulación de la traducción y empaquetamiento del ARNg de VIH-1.** A) Modelo propuesto por el laboratorio de Berkhout, donde la estructura LDI promueve la traducción y la estructura BMH promueve el empaquetamiento. B) Modelo propuesto por el laboratorio de Summers, donde se propone que la región U5 esta envuelta en interacciones alternativas con DIS (promoviendo traducción) y con la región cerca al codón AUG (promoviendo el empaquetamiento). La estructura *three-way junction* promueve el empaquetamiento. Modificado de (Mailler et al. 2016a).

A diferencia de lo observado *in vitro*, mediante análisis estructurales del ARNg que se encuentra en la célula infectada y en la partícula viral, no se pudo detectar la conformación LDI (competente con la traducción), observándose principalmente la estructura del tipo BMH (competente con el empaquetamiento) (J. Paillart et al. 2004; Wilkinson et al. 2008a). Adicionalmente, se ha corroborado que la estabilización de la

interacción U5-AUG (competente con el empaquetamiento), efectivamente, estimula la dimerización del ARNg aislado desde células (Song, Kafaie, and Laughrea 2008) y que la disrupción de esta interacción tiene un impacto negativo en la unión de NC al ARNg (Keane et al. 2015). Incluso, se ha observado que mutaciones en las cercanías del codón AUG (SL4) inhiben el empaquetamiento del ARN viral (Keane et al. 2015; K. Lu et al. 2011; O. Nikolaitchik et al. 2006), demostrando la importancia de la interacción U5-AUG en el empaquetamiento del ARNg de VIH-1.

En cuanto al impacto de la regulación mediada por los cambios conformacionales en la 5'-UTR en traducción, recientemente se ha observado, mediante experimentos de cinética, ensayos de dimerización y cuantificación de ARNg presentes en polisomas, que mutaciones que favorecen la interacción U5-DIS (conformación de la 5'-UTR propensa a la traducción) y la exposición del codón AUG en un clon infeccioso de VIH-1, no son suficientes para incrementar las tasas de traducción del ARNg. Por el contrario, mutaciones que favorecen la interacción U5-AUG tampoco son suficientes para atenuar la traducción del ARNg. Esta evidencia demuestra que la traducción del ARNg se encuentra bajo selección positiva, donde estos cambios estructurales no definirían si el ARNg será o no traducido (Abbink et al. 2005; Boeras et al. 2017; Vallejos et al. 2011).

Consistente con el impacto en el empaquetamiento del ARNg de los modelos propuestos de cambios estructurales, tres trabajos han reportado que la heterogeneidad en el uso del sitio de inicio de la transcripción del ARNg de VIH-1 impacta en la estructura que adopta la 5'-UTR y, en consecuencia, en su función como

ARNm o como genoma (Brown et al. 2020; Siarhei Kharytonchyk et al. 2016; Masuda et al. 2015). Esta heterogeneidad en el uso del sitio de inicio de la transcripción está dada por la presencia de tres guanosinas en el promotor del provirus que pueden funcionar como sitio de inicio de la transcripción. Esto produce tres tipos de ARNs que, siguiente al 5'-cap, comienzan con una, dos o tres guanosinas (<sup>Cap1G</sup>, <sup>Cap2G</sup> o <sup>Cap3G</sup>, respectivamente). En un primer reporte se observó que a pesar de que las formas <sup>Cap2G</sup> y <sup>Cap3G</sup> son detectadas en las partículas virales, la forma <sup>Cap1G</sup> es la que predomina en los viriones que se están formando (Masuda et al. 2015). En los dos trabajos siguientes, se indica que el transcrito <sup>Cap1G</sup>, es seleccionado para empaquetarse ya que adopta una estructura dimérica que secuestra el cap e impide la interacción con factores de inicio de la traducción. Por otro lado, los transcritos <sup>Cap2G</sup> y <sup>Cap3G</sup> adoptan una estructura *in vitro* favorable para la traducción y son retenidos en la célula como ARNm para ser traducido (Kharytonchyk et al. 2016; Masuda et al. 2015). Estos resultados sugieren que la dimerización y las funciones del ARNg como mensajero o genoma estarían controladas a nivel transcripcional, en el núcleo celular (Brown et al. 2020; Siarhei Kharytonchyk et al. 2016; Masuda et al. 2015).

Todos estos estudios han sido aportes fundamentales que han permitido ir dilucidando como el ARNg coordina ser usado como mensajero o como genoma. A pesar de que no existe concordancia sobre el impacto de la regulación mediada por estos cambios conformacionales en la traducción de ARNg, es bastante aceptado que estos cambios estructurales participan en la regulación de la dimerización del ARNg y el posterior empaquetamiento de este, sin embargo, aún no ha sido posible determinar con exactitud los mecanismos moleculares asociados a esta regulación.



Recientemente, se reportó que el ARN genómico del virus de la hepatitis C (HCV) contiene modificaciones químicas del tipo N<sup>6</sup>-metiladenosinas (m<sup>6</sup>A) en su ARN y que la presencia de esta modificación impacta negativamente en el empaquetamiento del ARN viral en las nuevas partículas virales, donde aquellas moléculas de ARN que carecen de esta modificación son preferencialmente seleccionadas para encapsidarse en los nuevos viriones (Gokhale et al. 2016). Estos resultados indican la relevancia de la presencia de las modificaciones de ARN, en particular de m<sup>6</sup>A, en el destino de los ARNs virales surgiendo una nueva capa de regulación en la selección del ARN viral que se empaquetará. Los estudios estructurales y de mutaciones *in vitro* mencionados no consideran que los ARNs poseen modificaciones post-transcripcionales, resultando interesante analizar si estas modificaciones pudieran participar en la regulación del empaquetamiento del ARNg de VIH-1. Diferentes grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han reportado la presencia de la modificación m<sup>6</sup>A en los transcritos de VIH-1, cuyos resultados indican que esta modificación impacta en el metabolismo del ARNg durante el ciclo replicativo viral.

### **Regulación del metabolismo de los ARNs celulares mediado por m<sup>6</sup>A**

La m<sup>6</sup>A es la modificación interna más abundante en los ARNm de eucariontes y consiste en una metilación en el nitrógeno seis de las adenosinas. Su distribución en el ARNm no es al azar ya que se encuentra enriquecida en la secuencia consenso DRACH, siendo D una A, G o U; R una purina y H una A, C o U (Wu et al. 2016). Aproximadamente, la secuencia DRACH se encuentra en uno de cada 57 nucleótidos en los ARNm, existiendo muchos sitios potenciales de metilación a lo largo de los

ARNs (Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019). A pesar de esta abundancia, sólo algunas de estas secuencias se encuentran metiladas. Las bases de la metilación sitio específica aún son pobremente entendidas, sin embargo, se postula que al ocurrir la metilación de manera co-transcripcional, ciertos procesos que ocurren durante la transcripción podrían definir que sitios DRACH serán metilados (Salditt-Georgieff et al. 1976; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019).

Mediante el desarrollo de la técnica MeRIP-seq (o m<sup>6</sup>A-seq), la cual se basa en la inmunoprecipitación de ARNs metilados acoplado a secuenciación masiva paralela, se identificó a nivel de transcriptoma la topología de esta modificación en los ARN poliadenilados (ARNs mensajeros y ARN no codificantes largos, principalmente). Además, se determinó la distribución asimétrica de esta metilación en el transcriptoma, principalmente cerca de los codones de término, en las 3'UTR, exones internos largos y 5'-UTR (Dominissini, Moshitch-Moshkovitz, et al. 2012; Meyer et al. 2012).

La introducción de m<sup>6</sup>A, en la mayoría de los ARNm, es catalizada por un complejo “escritor” compuesto por la proteína Metiltransferasa tipo 3 (*Methyltransferase like 3* o METTL3) y su homólogo Metiltransferasa tipo 14 (*Methyltransferase like 14* o METTL14) (Liu et al. 2014a). *In vitro*, estas proteínas forman un heterodímero estable con una estequiometría de 1:1 y actúan sinérgicamente para promover la metilación del ARNm blanco. Adicionalmente, se reportó que METTL3 es el componente que posee la actividad catalítica mientras que METTL14 contribuye al reconocimiento del sustrato (Śledź and Jinek 2016; Xiang Wang et al. 2016). Un tercer componente crítico

es la proteína WTAP (Agarwala et al. 2012; Fray and Simpson 2000; Ping et al. 2014; Zhong et al. 2008), que se ha observado interacciona con el heterodímero METTL3/METTL14 localizando el complejo en estructuras denominadas “*speckles*” nucleares que corresponden a sitios donde se lleva a cabo el corte y empalme de los ARNm (Liu et al. 2014b; Wu et al. 2016). El complejo metiltransferasa es un complejo principalmente nuclear y la adición de m<sup>6</sup>A en el ARNm ocurre de manera co-transcripcional (Ke et al. 2017; Salditt-Georgieff et al. 1976; Williams, Gokhale, and Horner 2019; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019), aunque es importante mencionar que se ha detectado METTL3 en el citoplasma (Alarcón et al. 2015; Choe et al. 2018). De manera interesante, el silenciamiento de las proteínas “escritoras” induce una disminución en el contenido de m<sup>6</sup>A tanto en ARNm de células HEK293T como de células HeLa, mientras que su sobreexpresión resulta en el efecto contrario (Geula et al. 2015; Liu et al. 2014b). Adicional al complejo METTL3/METTL14, se han detectado otras metiltransferasas que metilan adenosinas en la posición 6: la metiltransferasa ZCCH4 que metila el ARN ribosomal (ARNr) 28S (Ma et al. 2019; Van Tran et al. 2019), el complejo METTL5/TRMT112, donde METTL5 cataliza la metilación del ARNr 18S (Van Tran et al. 2019) y METTL16 que media la presencia de m<sup>6</sup>A en algunos ARNs no codificantes y unos pocos ARNm (Warda et al. 2017).

Las proteínas encargadas de la remoción de esta metilación son denominadas “borradoras” de m<sup>6</sup>A. FTO fue identificada como la primera enzima capaz de remover el grupo metilo de las adenosinas en el ARN de manera específica (Jia et al. 2011). Así, su silenciamiento produce un incremento total en los niveles de ARNm con m<sup>6</sup>A y su sobreexpresión, un decrecimiento de estos (Jia et al. 2011). Posteriormente se

identificó la proteína ALKBH5 como otra desmetilasa de m<sup>6</sup>A (Zheng et al. 2013a). Recientemente, se ha reportado que FTO también media la desmetilación de la modificación N<sup>6</sup>,2'-O-dimetiladenosina (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>) presente en la posición +1 desde el 5' cap en los ARNm y la N<sup>1</sup>-metiladenosina (m<sup>1</sup>A) en los ARNs de transferencia (Linder et al. 2015; Mauer et al. 2017; Schibler and Perry 1977; Wei et al. 2018).

Finalmente, las proteínas “lectoras” de m<sup>6</sup>A son las encargadas de efectuar las funciones relacionadas a esta metilación (Dominissini, Moshitch-moshkovitz, et al. 2012; Xiao Wang et al. 2014; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019). Estas corresponden principalmente a miembros de la familia de proteínas con dominio YTH: YTHDC1 en el núcleo junto a YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 en el citoplasma. Se ha reportado que el impacto en el metabolismo de los ARNs metilados está comandado principalmente por el reconocimiento de las proteínas lectoras, donde se ha observado que dependiendo de cuál sea la proteína que lo reconozca se promueve el corte y empalme, la exportación nuclear, la traducción, la localización o la degradación del ARNm (Du et al. 2016a; Xiao Wang et al. 2014, 2015a). Estudios recientes han demostrado que las proteínas YTHDFs tienen diferentes efectos en el ARNm metilado, donde se ha visto que YTHDF1 promueve la traducción de los ARNm (Xiao Wang et al. 2015b), YTHDF2 promueve la degradación (Du et al. 2016b), e YTHDF3 junto con YTHDC2 pueden regular ambos procesos (Hsu et al. 2017; Shi et al. 2017). La lectora nuclear YTHDC1 regula el corte y empalme y la exportación nuclear de ciertos transcritos (Kasowitz et al. 2018; Xiao et al. 2016).

Numerosos estudios han indicado que la presencia de m<sup>6</sup>A induce una regulación positiva de la traducción del ARNm metilado mediante tres mecanismos diferentes. Un primer mecanismo involucra que la proteína lectora YTHDF1 une al factor de inicio de la traducción eIF3 en la región 3'-UTR para promover la traducción dependiente del 5', por un mecanismo desconocido (Xiao Wang et al. 2015b). Un segundo mecanismo propuesto, es que una interacción directa entre la 5'-UTR metilada y la proteína eIF3 promueve un mecanismo de inicio de la traducción independiente del 5' cap (Meyer et al. 2015; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019). El tercer mecanismo indica que el inicio de la traducción sería promovido por la interacción directa de METTL3, donde se ha propuesto que METTL3 metila al ARNm en el núcleo, pero esta se mantendría unida al transcrito cuando es exportado al citoplasma, donde la metiltransferasa une a eIF3 para promover el inicio de la traducción (Choe et al. 2018; Lin et al. 2016).

Otro aspecto importante de la regulación mediada por m<sup>6</sup>A es que su presencia puede alterar las estructuras secundarias en el ARNm, afectando la interacción de diversas proteínas de unión a ARN (Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, and Soto-Rifo 2017a; Xiao Wang et al. 2014) o repeler la unión de proteínas incapaces de reconocer adenosinas metiladas, conocidas como proteínas anti-lectoras (Edupuganti et al. 2017; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019).

Dada su homología con la epigenética, el estudio de la regulación asociada a estas modificaciones en los ARNm es conocido como "epitranscriptómica".

## **Regulación del metabolismo del ARNg de VIH-1 mediado por m<sup>6</sup>A**

m<sup>6</sup>A es definitivamente la modificación post-transcripcional más ampliamente descrita en ARNs virales (Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, and Soto-Rifo 2017b; Williams, Gokhale, and Horner 2019). Su presencia fue identificada en la mitad de los 70's en diversos virus que replican en el núcleo como el virus SV40, Adenovirus-2, virus herpes simplex (HSV-1), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la leucosis aviar (ALV), virus influenza A y virus respiratorio sincicial (RSV) (Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, y Soto-Rifo 2017b; Williams, Gokhale, and Horner 2019). Usando una combinación de estrategias de silenciamiento y sobreexpresión de la maquinaria de m<sup>6</sup>A y técnicas de secuenciación, se ha determinado que la presencia de m<sup>6</sup>A tiene un impacto positivo en el ciclo replicativo de algunos virus como enterovirus 71 (EV71), virus influenza A (IAV), metapneumovirus humano (HMPV), virus respiratorio sincicial (RSV) y SV40 (Pereira-Montecinos, Valiente-Echeverría, y Soto-Rifo 2017b; Gokhale et al. 2019). Por otro lado, como se mencionó previamente, se reportó que en el virus de la hepatitis C (HCV) la presencia de m<sup>6</sup>A inhibe el empaquetamiento del ARN viral, mediada por la interacción con las proteínas YTHDFs, impactando negativamente en la infección viral (Gokhale et al. 2016). Esta modificación también fue encontrada en otros miembros de la familia *Flaviviridae* tales como el virus Zika (ZIKV), virus dengue (DENV), virus Nilo Occidental (WNV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV) (Gokhale et al. 2016). En el caso de VIH-1, la presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg fue recientemente descrita y el impacto de esta modificación en el ciclo replicativo del virus es de gran relevancia en los estudios actuales que buscan comprender de manera precisa la regulación de la replicación viral (Kennedy et al. 2016; Lichinchi, Gao, et al. 2016; Riquelme-Barrios et al. 2018; Tirumuru et al. 2016).

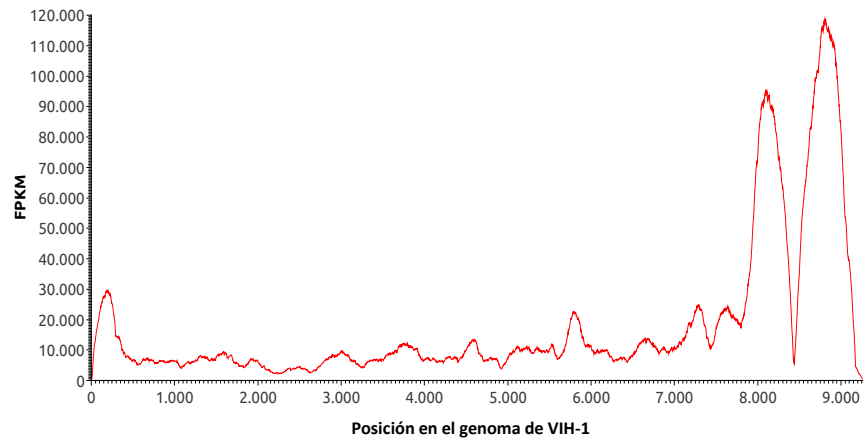
Tres grupos independientes reportaron la presencia de esta modificación a lo largo del ARNg viral, principalmente en la 5'-UTR, el elemento de respuesta a Rev (RRE) y la 3'-UTR mediante la técnica MeRIP-seq (Kennedy et al. 2016; Lichinchi, Gao, et al. 2016). Sin embargo, estos grupos reportaron mecanismos diferentes por el cual m<sup>6</sup>A regularía la replicación de VIH-1. El primer estudio que surgió, identificó que la presencia de m<sup>6</sup>A en la región que contiene el RRE favorece su reconocimiento por la proteína viral Rev y, en consecuencia, la exportación nuclear de los transcritos virales de 4-kb y 9-kb (Lichinchi, Gao, et al. 2016). Un segundo reporte, demostró que la metilación del ARNg en la 3'-UTR favorece la síntesis de las proteínas virales Gag, Tat, Rev y Nef (Kennedy et al. 2016). Este fenómeno fue explicado por un efecto redundante, aún desconocido, de las proteínas lectoras de m<sup>6</sup>A, YTHDF1-3, en la abundancia de los ARNm virales (Kennedy et al. 2016). Por otro lado, el tercer grupo de investigación encontró que la presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg viral tiene roles provirales y antivirales (Tirumuru et al. 2016). Específicamente, en células T CD4+ observaron que las proteínas YTHDFs se unen al ARNg que se encuentra ingresando a la célula evitando la transcripción reversa, impactando negativamente en el ciclo replicativo viral. Sin embargo, en etapas tardías del ciclo replicativo, la presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg promueve la expresión de Gag en células infectadas (Tirumuru et al. 2016). Interesantemente, se reportó que en células T infectadas, la proteína YTHDF3 puede inhibir la replicación viral, ya que se empaqueta en el virión de VIH-1 y reduce en un 30% la transcripción reversa (Jurczynszak et al. 2020). Mas interesante aún, los autores observaron que YTHDF3 puede ser eficientemente degradada por la proteasa viral. Adicionalmente, se ha reportado que las tres proteínas YTHDFs y Gag forman

un complejo con el ARN para inhibir la infección viral (W. Lu et al. 2018). En su conjunto, estos resultados indican que la modificación m<sup>6</sup>A junto a su maquinaria celular asociada, pueden tener diferentes roles en la regulación de la infección dependiendo de la etapa del ciclo replicativo y la posición de m<sup>6</sup>A a lo largo del ARNg.

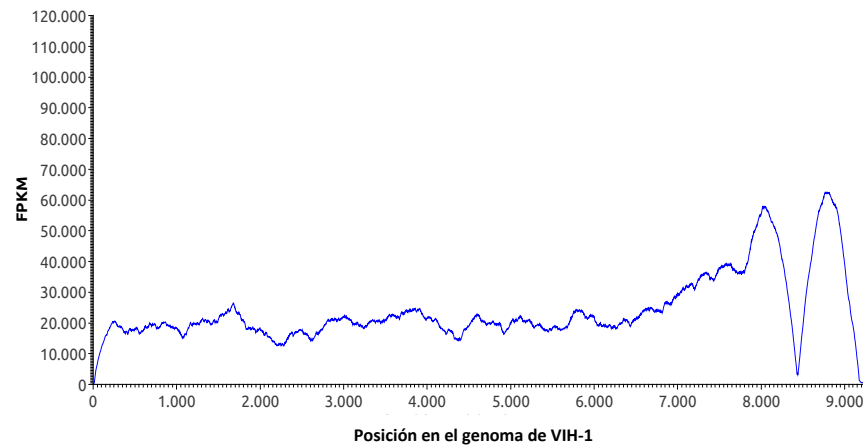
Resulta interesante destacar que si bien, la metilación del ARNg promueve la síntesis de proteínas virales en etapas tardías de la infección, esta modificación también induce la degradación del ARNg durante la entrada del virus a la célula, mediante el reconocimiento de m<sup>6</sup>A en el ARNg por las proteínas YTHDFs (Tirumuru et al. 2016). Estos datos controversiales sugieren fuertemente que las proteínas lectoras de m<sup>6</sup>A podrían ser capaces de distinguir al ARNg en sus dos funciones, lo que podría explicarse a través de una metilación diferencial del ARNg cuando este actúa como ARNm o como genoma. Es por esta razón que, en el laboratorio, empleamos la técnica de MeRIP-seq con el fin de identificar los patrones de m<sup>6</sup>A en el ARNg que se encuentra en la célula respecto del ARNg que se encuentra en la partícula viral. Sorprendentemente, encontramos diferencias en los patrones de metilación, específicamente en la 5'-UTR del ARNg, observándose la presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR del ARNg intracelular y la ausencia de esta metilación en el ARNg que se encuentra en la partícula (Figura 6), sugiriendo que el ARNg que carece de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR sería incorporado selectivamente en la partícula viral, similar a lo que sucede en el virus de la hepatitis C mencionado previamente.



A)



B)



**Figura 6: Presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg intracelular y en partícula.** A) Análisis de datos de m<sup>6</sup>A-seq obtenidos para el ARNg intracelular. B) Análisis de datos de m<sup>6</sup>A-seq obtenidos para el ARNg presente en la partícula viral. En el eje Y se observan los fragmentos por kilobase por millón de lecturas (FPKM) y en el eje X se observa la posición a lo largo del genoma de VIH-1.

Con estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis, analizamos si la presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1 inhibe el reclutamiento de Gag y por ende el empaquetamiento del ARNg en la nueva partícula viral.

## **Hipótesis y objetivos**

### **Hipótesis**

La presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR del ARN genómico de VIH-1 inhibe su interacción con Gag y su empaquetamiento en la partícula viral.

### **Objetivo general**

Determinar si la presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR del ARN genómico de VIH-1 inhibe su interacción con Gag y su empaquetamiento en la partícula viral.

### **Objetivos específicos**

1. Analizar el impacto de m<sup>6</sup>A en el empaquetamiento del ARNg de VIH-1
2. Analizar el impacto de m<sup>6</sup>A en la interacción de Gag con el ARNg.
3. Determinar experimentalmente los nucleótidos metilados en la 5'-UTR analizando su impacto en el empaquetamiento del ARNg de VIH-1.

## Materiales y métodos

### Vectores de ADN

Se utilizó el vector proviral pNL4.3- $\Delta$ Env (denominado de ahora en adelante pNL4.3) previamente descrito (Daniela Toro-Ascuy et al. 2018), el cual contiene la secuencia completa del provirus de VIH-1 con una inserción de 4-pb en el gen *env*, que impide la expresión de esta proteína, permitiendo su manipulación fuera de un laboratorio de contención nivel 3. Los vectores mutantes pNL4.3 $\Delta$ A<sub>198</sub>, pNL4.3 $\Delta$ A<sub>242</sub> y pNL4.3 $\Delta$ A<sub>198/242</sub> fueron obtenidos mediante una mutagénesis sitio dirigida usando el pNL4.3 como matriz y los partidores mostrados en la Tabla I; la mutagénesis se realizó mediante una reacción de amplificación usando los partidores mencionados y la posterior digestión con la enzima DPNI para eliminar los plásmidos originales (pNL4.3 que fue usado como matriz). El vector pCMV-VSVg fue donado gentilmente por el Dr. Philippe Mageot (ENS-Lyon, Lyon, Francia). Los vectores shMETTL3 y shCTR (control) fueron obtenidos mediante la inserción de las secuencias interferentes para METTL3 y el control (secuencia desordenada) en el vector pLKO.1. Los vectores de expresión pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14 fueron obtenidos de Addgene (Addgene #53739 y #53740, respectivamente) y fueron descritos previamente (Liu et al. 2014a). El vector pCDNA-d2EGFP fue previamente descrito (Daniela Toro-Ascuy et al. 2018). Los vectores pCDNA-3XFlag-FTO y pEGFP-ALKBH5 fueron donados gentilmente por el Dr. Yun-Gui Yang (Instituto de Genómica de Beijing, Academia China Ciencias) y fueron previamente descritos (Jia et al. 2011; Zheng et al. 2013b). El vector pCDNA-3XFlag-GFP fue obtenido reemplazando la secuencia codificante de

FTO desde el vector pCDNA-3XFlag-FTO por la secuencia codificante de d2EGFP. El vector pNL4.3-GagStop fue previamente descrito (Soto-Rifo, Rubilar, and Ohlmann 2013). El vector pCDNA-Gag fue previamente descrito (Schwartz, Felber, and Pavlakis 1992). El vector pBSK-GagPol, usado para la generación de las sondas con biotina en los ensayos de microscopía, fue descrito previamente (Soto-Rifo, Rubilar, and Ohlmann 2013).

**Tabla I: Secuencias de los partidores utilizados para la mutagénesis.**

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia (5`-3`)</b>
<b>VIH-1ΔA198</b>	<b>Fwd: TGGCGCCCGAACAGGGCTTGAAAGCGAAAGT</b>
	<b>Rev: ACTTTCGCTTTCAAGCCCTGTTCTGGGCGCCA</b>
<b>VIH-1ΔA242</b>	<b>Fwd: ATCTCTCGACGCAGGCTCGGCTTGCTGAAG</b>
	<b>Rev: CTTCAAGCAAGCCGAGCCTGCGTTCGAGAGAT</b>

### **Cultivo celular y transfección de ADN**

Las líneas celulares HEK293T y HeLa fueron mantenidas en DMEM (Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y antibióticos (Hyclone) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (2.5 x10<sup>5</sup> células/pocillo) y fueron transfectadas usando polietilenimina (PEI) lineal de 25.000 Da (Polysciences) utilizando una proporción de µg DNA/µl PEI de 1/15, como se describió previamente (D. Toro-Ascuy et al. 2018). La mezcla DNA/PEI fue incubada por 20 minutos a temperatura ambiente y luego fue agregada a las células. 24 horas post-transfección, las células fueron lavadas con PBS y recuperadas para realizar los experimentos que se explicaran posteriormente.

### **Concentración de partículas virales**

A las 24 horas post-transfección (hpt) se recuperó el sobrenadante, el cual se filtró (filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y luego se ultracentrifugó a 25.000 rpm por 2 horas a 4°C en un colchón de sacarosa al 20% (preparado previamente y guardado a 4°C). Las partículas virales concentradas fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{l}$  de PBS y guardadas en alícuotas a -80°C para luego analizar los niveles de CAp24 mediante un ELISA anti-CAp24 y los niveles de ARNg mediante un RT-qPCR. Cabe destacar que las células también fueron recuperadas en paralelo para realizar Western Blot (wb) y extracción de ARN, seguido de un RT-qPCR como se describirá posteriormente.

### **Western Blot**

Los extractos de proteínas desde células HEK293T fueron preparados resuspendiendo la fracción celular en buffer de lisis (150 mM NaCl, 1% NP-40 y 50 mM TrisHCl pH 8.0). 30  $\mu\text{g}$  de proteína total desde los lisados celulares en solución de carga (0,5M TrisHCl pH 6,8, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%, 2-mercaptoetanol), fueron incubados a 95°C por 5 minutos y luego fueron cargados en un gel al 10%, resuelto mediante SDS-PAGE y transferido a una membrana de PVDF *Amersham Hybond™-P* (GE Healthcare) por 2 horas a 400 mA a 4°C en una solución de transferencia (25 mM TrisHCl pH 8.0, glicina 192 mM, metanol 20% ). Las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (BioRad) por 1 hora a temperatura ambiente y fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente por toda la noche a 4°C: anticuerpo monoclonal de ratón anti-p24 VIH-1, diluido 1/1.000 (proporcionado por el NIH AIDS Reagents Program, número de catálogo

3537); anticuerpo de conejo anti-Flag, diluido 1/1.000 (Sigma-Aldrich, número de catálogo 637303) para evaluar la expresión de las proteínas; anticuerpo de ratón anti-GAPDH, diluido 1/5.000 (Santa Cruz Biotechnologies, número de catálogo sc-51905) o anticuerpo anti-METTL3 hecho en conejo (Cell Signaling Technology, número de catálogo 96391), para evaluar el silenciamiento de la expresión de METTL3. Luego de la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/5.000, las membranas fueron analizadas utilizando el sustrato *Pierce® ECL* o con el sustrato *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Scientific) y usando el escáner *HD9 Western Blot Imaging System* (Uvitec Cambridge).

## **ELISA**

El ELISA anti-CAP24 (R&D SYSTEMS, número de catálogo DHP240B) fue realizado como indica el fabricante. Brevemente, volúmenes equivalentes de las partículas virales concentradas en PBS fueron mezcladas con el reactivo *Calibrator Diluent RD5-26* (diluido 1/4). Luego, se agregó 100 µl del reactivo *Assay Diluent RD1-124* a los pocillos que vienen cubiertos con el anticuerpo monoclonal específico para Gag p24 de VIH-1 junto con 100 µl de PBS 1X (control) o las muestras (partículas virales) preparadas previamente. Posteriormente, la placa con los pocillos se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placa horizontal a 500 rpm, y luego se lavó tres veces con la solución de lavado *Wash* y se incubó con 200 µl del anticuerpo conjugado que reconoce Gag p24 de VIH-1 por 2 horas a temperatura ambiente en el agitador. Después de la incubación, los pocillos fueron lavados nuevamente e incubados con 200 µl de solución de sustrato por 30 minutos a temperatura ambiente,

protegido de la luz. La reacción fue detenida con la adición de 50  $\mu$ l de solución *Stop* y la densidad óptica fue medida a 450 nm y corregida a 540 nm en un lector multimodal Synergy HTX (BioTek).

### **Extracción de ARN y RT-qPCR**

La extracción de ARN y RT-qPCR fueron realizados como se describió previamente (Soto-Rifo, Rubilar y Ohlmann 2013). Brevemente, a las 24 hpt las células fueron lavadas y recuperadas con PBS-EDTA 10 mM y centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Los centrifugados celulares fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de PBS. La fracción celular o las partículas virales concentradas fueron usadas para realizar la extracción de ARN por la adición de 1 ml de *TRIzol® Reagent* (Thermo Fisher) y 200  $\mu$ l de cloroformo (Merck). La mezcla fue agitada en un vortex y centrifugada a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. La fase acuosa fue recuperada, incubada por 5 min con un volumen equivalente de 2-propanol (Merck) y centrifugada a 12.000 rpm por 20 min a 4°C. El ARN centrifugado fue lavado con etanol 70% (Merck) y resuspendido en agua ultrapura. El ARN obtenido fue tratado con el kit *TURBO DNA-free* (Thermo Fisher) por 30 minutos a 37°C como indica el fabricante. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa usando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Thermo Fisher) con partidores al azar (*random primers*) como indica el fabricante. En el caso del ARN intracelular, 300 ng de ARN fueron usados para realizar la transcripción reversa en todas las condiciones. Para el ARN obtenido desde partículas virales, la cantidad de ARN usado para la transcripción reversa fue normalizada por los niveles de CAp24 obtenidos en el ELISA anti-CAp24, usando 300 ng de ARN para la condición control.

Para el qPCR, se preparó una reacción de 25 µl final con 5 µl del ADNc templado (previamente diluido 1/10), 12,5 µl del *2X Brilliant II SYBR Green QPCR master Mix* (Agilent Technologies), 0,4 µl de los partidores sentido (Fw) y antisentido (Rev) (guardados en un mix a 10 mM) (Tabla II) y 7,1 µl de agua ultra pura. La reacción fue amplificada usando el equipo *AriaMx Real-Time PCR System* (Agilent Technologies). El gen GAPDH fue amplificado como control de referencia. El número de copias relativas del ARNg de VIH-1 fue comparado con GAPDH usando la fórmula  $X^{-\Delta Ct}$  (donde X corresponde a la eficiencia de amplificación de cada pareja de partidores obtenida experimentalmente).

**Tabla II: Partidores usados para la reacción de qPCR**

Partidor	Secuencia (5`-3`)
ARNg VIH-1	Fwd: GCAGTGGCGCCCGAACAGG
	Rev: TTTTGGCGTACTCACCAGTC
GAPDH	Fwd: AGCCACATCGCTCAGACAC
	Rev: GCCCAATACGACCAAATCC

### **Inmunoprecipitación de ARN metilado (MeRIP)**

La extracción de ARN fue realizada como se describió anteriormente. Para la MeRIP, 30 µg de ARN total fueron diluidos en 380 µl de agua, posteriormente desnaturalizado a 70°C por 5 minutos y puesto en hielo por 3 minutos. El ARN desnaturalizado fue mezclado con 1 µl de RNasin (Promega), 5 µl de Complejo ribonucleósido de vanadil (VRC; New England Biolabs), 100 µl de buffer IP 5X (50 mM TrisHCl pH 7.4, 750 mM



NaCl y 0.5% NP-40), y 2,5  $\mu$ l de anticuerpo policlonal anti-m<sup>6</sup>A hecho en conejo (1 mg/ml; Abcam #ab151230) e incubado por 2 horas a 4°C con rotación cabeza sobre cola. Al mismo tiempo, 600  $\mu$ g de perlas magnéticas Dynabeads Proteína A (20  $\mu$ l; Thermo Fisher) fueron lavadas en 1 ml de buffer IP 1X con 1  $\mu$ l de VRC y fueron incubadas con 500  $\mu$ l de buffer IP 1x con 0.5 mg/ml de BSA por 2 horas a 4°C con rotación cabeza sobre cola. Luego, las perlas magnéticas fueron lavadas con 500  $\mu$ l de buffer IP 1X y agregadas a la mezcla ARN-anti-m<sup>6</sup>A. La mezcla fue incubada por 2 horas a 4°C en rotación. Después, la mezcla de ARN-anti-m<sup>6</sup>A-perlas magnéticas fue lavada dos veces con 500  $\mu$ l de buffer IP 1X. El ARN unido a las perlas magnéticas fue eluido con 100  $\mu$ l de buffer de elución (5mM Tris-HCl, 1mM EDTA y 0,05% SDS) y 1  $\mu$ l de proteinasa K (New England BioLabs) e incubado por 1,5 horas a 50°C. El ARN fue extraído del sobrenadante usando TRIzol y recuperado mediante una precipitación con 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ l de glicógeno (Thermo Fisher) y 2,5 volúmenes de etanol 100% toda la noche a -20°C y luego lavado con etanol 70%. Cantidades equivalentes de ARN obtenidas desde la fracción input e inmunoprecipitado fueron usadas para el RT-qPCR. El ARN proveniente de la fracción inmunoprecipitada (fracción “m<sup>6</sup>A”) fue normalizada por el ARN obtenido desde el input (fracción “A”).

### **Silenciamiento de METTL3**

Las partículas lentivirales que contienen el ARN interferente anti-METTL3 se prepararon en células HEK293T mediante la transfección de los vector pLKO.1 (Stewart, S., et al., 2003) que contienen las secuencias de shRNA que reconocen el ARNm de METTL3 (Tabla III), el vector pCMV-VSVg y el vector psPAX2 (Addgene

#12260). Como control se generó partículas lentivirales que portan una secuencia desordenada de ARN interferente (shCTR). El sobrenadante de las células HEK293T se recolectó a las 48 horas post-transfección (hpt), se filtró (filtro de 0.22  $\mu$ m) y se utilizó para transducir células HEK293T. El medio que contiene las partículas lentivirales se reemplazó por medio DMEM fresco a las 24 horas. Posteriormente, las células se trataron con puromicina (10  $\mu$ g/ml) por 4 días. El silenciamiento de la expresión de METTL3 se evaluó mediante western blot, para lo que se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína METTL3 hecho en conejo (Cell Signaling Technology, número de catálogo 96391), siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

Para realizar los ensayos, las líneas celulares control y silenciadas para METTL3 fueron transfectadas con el vector pNL4.3 junto con pCMV-VSVg. 24 hpt se procedió a realizar los análisis de ARNg y Gag en partículas concentradas y en la fracción intracelular mencionados anteriormente.

**Tabla III: Secuencias utilizadas para silenciar la síntesis de METTL3 y el control utilizados.**

shRNA	Secuencia (5`-3`)
shMETTL3.1	CCGGGCAAGTATGTTCACTATGAAACTCGAGTTTCATAGTGAACATACTTGCTTTTTG
shMETTL3.2	CCGGGCCAAGGAACAATCCATTGTTCTCGAGAACAATGGATTGTTCCCTTGGCTTTTTG
shControl	CCGCTGATGTGAAAGTTCGGTCTGTTGGATCCCCAGACGGAACTTTCACATCTTTTTG

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

En primer lugar, para los ensayos de microscopía confocal se generaron sondas específicas que reconocen el ARNg de VIH-1 mediante transcripción *in vitro* usando el vector pBSK-GagPol, previamente linealizado con la enzima de restricción EcoRI, y 11-digoxigenina-UTP (Roche) como se describió previamente (D. Toro-Ascuy et al. 2018). El transcrito de 5-kb obtenido en la transcripción es complementario a la región Gag-Pol del ARNg y se fragmentó utilizando el *RNA fragmentation buffer* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, para obtener sondas de 100 a 200 nucleótidos de largo. Los fragmentos obtenidos fueron purificados usando las perlas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter).

Para los ensayos de ARN FISH, células HeLa fueron cultivadas en placas de 12 pocillos sobre un cubreobjeto y mantenidas como se describió anteriormente. Las células fueron transfectadas con 0,3 µg de pNL4.3, 0,3 µg de pCMV-VSVg y 1 µg del correspondiente vector de expresión como se indicó anteriormente. A las 24 hpt las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y fijadas por 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego, las células fueron permeabilizadas por 10 minutos a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0,2% e hibridadas toda la noche a 37°C en 200 µl de mezcla de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0,02% BSA libre de ARNasas, 50% formamida, 300 µg de ARNt y 120 ng de sondas con 11-digoxigenina-UTP) en una cámara húmeda. Posteriormente, las células fueron lavadas con 0,2X SSC/50% formamida durante 30

minutos a 50°C y luego tres veces con solución de dilución de anticuerpos (2X SSC, 8% formamida, 2 mM VRC y 0,02% BSA libre de ARNasas). Después, se agregaron los anticuerpos anti-digoxigenina hecho en ratón (Roche, número de catálogo 11333062910), anti-p24 de VIH-1 hecho en ratón (NIH AIDS Reagents Program, número de catálogo 3537) y anti-Flag hecho en conejo (Sigma\_Aldrich, número de catálogo F7425), diluidos 1/100 en solución de dilución de anticuerpos y las células fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con solución de dilución de anticuerpos, las células fueron incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti-ratón conjugado a Alexa 488, anti-ratón conjugado a Alexa 594 y anti-conejo conjugado a Alexa 647 (Molecular Probes), todos diluidos 1/500. Las células fueron lavadas tres veces en solución de lavado (2X SSC, 8% formamida, 2mM VRC), dos veces con PBS, e incubado con DAPI (0,3 µg/ml en PBS) (Life Technologies) por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó tres veces con PBS, tres veces con agua y se montaron con *Fluoromont* (Life Technologies). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesadas usando FIJI/ImageJ (NIH).

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

El ensayo de ligación proximal fue llevado a cabo usando el kit *DUOLINK II In Situ* (Sigma-Aldrich) y los *PLA probe anti-mouse minus* y *PLA probe anti-rabbit plus* (Sigma Aldrich), como se mencionó previamente (D. Toro-Ascuy et al. 2018). Brevemente, las células HeLa fueron transfectadas como se mencionó previamente. A las 24 hpt, las células fueron fijadas con PFA y permeabilizadas con Triton-X100 y pre-incubadas con

solución de bloqueo (Sigma Aldrich) por 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1/100 (anticuerpo anti-p24 de VIH-1 hecho en ratón) y 1/200 (anticuerpo anti-Flag hecho en conejo) en 40  $\mu$ l de solución de dilución de anticuerpos *DUOLINK* e incubados a 37°C por 1 hora. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X (5 minutos cada vez) y los anticuerpos secundarios (*DUOLINK anti-rabbit PLA-plus probe* y *DUOLINK anti-mouse PLA-minus probes*) fueron agregados e incubados a 37°C por 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se realizó la reacción de ligación y amplificación por 100 minutos en una cámara húmeda. Finalmente, las muestras fueron incubadas con DAPI (0,3  $\mu$ g/ml en PBS) (Life Technologies) por 1 minuto a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PBS, tres veces con agua libre de nucleasas y montadas con *Fluoromont* (Sigma Aldrich). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesadas usando FIJI/Image (NIH).

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

El protocolo de ISH-PLA fue desarrollado combinando el protocolo de ARN-FISH y PLA descritos anteriormente. Brevemente, las células HeLa fueron transfectadas como se mencionó anteriormente. 24 hpt, las células fueron fijadas con PFA y permeabilizadas por 10 minutos a temperatura ambiente con Tritón X-100 e hibridadas toda la noche a 37°C en 200  $\mu$ l de solución de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM VRC, 0.02% de BSA libre de ARNasas, 50% formamida, 300  $\mu$ g de ARNt y 120 ng de sonda 11-digoxigenin-UTR) en una cámara húmeda. Las células fueron lavadas con 0,2X SSC/50% formamida durante 30 minutos a 50°C e incubadas con solución

de bloqueo por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron incubadas 3 veces con solución de dilución de anticuerpos (2X SSC (Sigma-Aldrich #SRE0068), 8% formamida, 2mM VRC y 0.02% de BSA libre de ARNasas). Los anticuerpos primarios de ratón anti-digoxigenina y de conejo anti-Flag, diluidos 1/100 en solución de dilución de anticuerpos, fueron agregados a las células y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Después, se lavaron tres veces con la solución de dilución de anticuerpos y dos veces con PBS (5 minutos cada vez). Los anticuerpos secundarios (*DUOLINK anti-rabbit PLA-plus probe* y *DUOLINK anti-mouse PLA minus probe*) fueron agregados e incubados a 37°C por 1 hora. La reacción de ligación y amplificación fue desarrollada siguiendo el protocolo de PLA descrito previamente. Luego, las células fueron incubadas con solución DAPI (0.3 µg/ml en PBS) (Life Technologies) por 1 minuto a temperatura ambiente, lavado tres veces con PBS, tres veces con agua libre de nucleasas y montadas con *Fluoromont* (Sigma Aldrich). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss) y procesadas usando el programa FIJI/ImageJ (NIH).

### **Identificación de residuo de m<sup>6</sup>A con resolución de nucleótido único usando entrecruzamiento e inmunoprecipitación (miCLIP)**

La extracción de ARN fue realizada como se describió anteriormente. Para el miCLIP, 20 µg de ARN poliA fueron incubados con 10 µl de anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A (1µg/1µl) (Abcam #ab151230) por 1,5 horas a 4°C. Posteriormente, la muestra ARN-anticuerpo fue entrecruzada dos veces en un Stratallinker 2400 usando 254 nm de luz y 150 mJ/cm<sup>2</sup>. Posterior al entrecruzamiento, la muestra fue incubada con proteinasa K por

media hora a 37°C. El ARN fue extraído usando TRIzol y recuperado mediante una precipitación con 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µl de glicógeno (Thermo Fisher) y 2,5 volúmenes de etanol 100% toda la noche a -20°C y luego lavado con etanol 70%. El ARN obtenido fue utilizado para realizar una transcripción reversa como se mencionó anteriormente, pero con partidores específicos para la región 5'-UTR (5'-CCTTTTAGTCAGTGTGGA AA-3' y 5'-GAGGCGAGGGGCGGCGACTG-3'). El ADN fue enviado a secuenciación masiva paralela a la unidad de secuenciación del Centro de Genómica y Bioinformática, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor.

### **Predicción de residuos metilados**

La predicción de los residuos metilados en la 5'-UTR del pNL4.3 fue realizado usando el software SRAMP disponible en [www.cuilab.cn/sramp](http://www.cuilab.cn/sramp) considerando la estructura secundaria del ARN, la cual es predicha automáticamente por el software mediante la herramienta RNAfold del *ViennaRNA Package*, como se ha descrito (Y. Zhou et al. 2016b).

### **Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizado por extension de partidores y perfil mutacional (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling, SHAPE-MaP)**

El experimento de SHAPE-MaP fue realizado según el protocolo de Smola et al., 2015 (Smola et al. 2015) con modificaciones menores. Brevemente, células HEK293T fueron transfectadas como se mencionó previamente con los vectores pNL4.3, pCMV-VSVg y los vectores de expresión de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 o el

control GFP. El ARN de estas células fue obtenido mediante la adición de TRIzol, como se mencionó previamente. Luego, 10 pmoles de ARN de cada condición fueron diluidos en 12  $\mu$ l de agua, desnaturalizado por 3 minutos a 95°C y puesto en hielo. El ARN desnaturalizado fue renaturalizado mediante la adición de solución de plegamiento (300 mM HEPES pH 8, 300 mM KOAc y 30 mM MgCl<sub>2</sub>) e incubado por 20 minutos a 37°C. Luego se realizó la modificación del ARN mediante la adición del ARN a 1  $\mu$ l del reactivo de SHAPE anhídrido 1-metil-7-nitrosatoico (1M7) (AEchem Scientific Corporation) a 100 mM en DMSO (denominada reacción modificada) o 1  $\mu$ l de DMSO (reacción control) y se incubó por 6 minutos a 37°C y luego las reacciones fueron puestas en hielo. Adicionalmente, 5 pmoles de ARN de cada condición fueron diluidos en 3  $\mu$ l de agua con 1  $\mu$ l de solución desnaturalizante (500 mM HEPES pH 8, 40 mM EDTA y 50% de formamida), y fue incubado por 1 minuto a 95°C (denominada reacción desnaturalizada). Esta reacción también fue modificada con 1  $\mu$ l de 1M7 e incubada a 95°C. La transcripción reversa fue realizada con partidores específicos para la 5'-UTR del ARNg (Watts et al. 2009). Todas las condiciones fueron incubadas por 3 minutos a 95°C, puestas en hielo, luego se agregó 2  $\mu$ l de los partidores específicos (2  $\mu$ M) y se incubó por 5 minutos a 65°C. Posteriormente, se agregó 8  $\mu$ l de 2,5X *SHAPE-MaP Buffer* (500 mM Tris-HCl pH 8, 750 mM KCl, 100 mM de DTT, dNTPs y 30 mM de MnCl<sub>2</sub>), se incubó por 2 minutos a 50°C y posteriormente se agregó 1  $\mu$ l de la transcriptasa inversa SuperScriptIII (Invitrogen) y se incubó a 50°C por 3 horas. La transcriptasa reversa fue inactivada a 70°C por 15 minutos. El ADN obtenido fue utilizado para preparar genotecas con el kit *NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina®* (New England Biolabs) según las indicaciones del fabricante. La genoteca



fue verificada con el Agilent DNA 1000 Chip Bioanalyzer (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas en un sistema de secuenciación Illumina NextSeq 500. Los análisis de las secuencias obtenidas fueron realizadas utilizando el programa *ShapeMapper2* descrito previamente (Busan and Weeks 2018). La estructura fue modelada usando el programa IPANEMAP (Saaidi et al. 2020).

### **Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizado por extensión de partidores (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension, SHAPE-CE)**

La región 5'-UTR del ARNg silvestre y del ARNg mutante para las adenosinas 198 y 242 fueron transcritas *in vitro* a partir de los vectores pNL4.3 y pNL4.3 $\Delta$ A<sub>198/242</sub>, respectivamente. Para la transcripción *in vitro* se utilizó la ARN polimerasa T7 (de Bisschop et al. 2019). Los transcritos obtenidos fueron utilizados para realizar el experimento de SHAPE-CE, como se describe en (Wilkinson et al. 2008b) con modificaciones menores. Brevemente, 6 pmol de cada transcrito fueron diluidos en 24  $\mu$ l de agua, desnaturalizados a 80°C por 2 minutos y puestos en hielo. Posteriormente, el ARN es renaturalizado mediante la adición de 3  $\mu$ l de solución de plegamiento 10X (HEPES pH 7.5 400 nM, KCl 1M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 37°C. Luego, la solución de ARN fue agregada a 3  $\mu$ l de 20 mM de 1M7 (2 mM final) (denominada reacción modificada) (AEmchem Scientific Corporation) o 3  $\mu$ l de DMSO (reacción control) e incubadas por 6 minutos a 37°C. Los transcritos modificados y control fueron precipitados en presencia de 1  $\mu$ l glicógeno 20 mg/ml, 3  $\mu$ l de 5M de acetato de sodio, 100  $\mu$ l de etanol 100% por 1 hora

a -20°C y luego lavada con etanol 70% y resuspendidas en agua. Para la extensión de partidores, el ARN fue tratado con 1 µl de DMSO y desnaturalizado por 3 minutos a 95°C y enfriado a 4°C. Las muestras fueron mezcladas con 3 µl de 2 µM del partidore fluorescente (D4-5'-TTTCTTTCCCCCTGGCCTT para la reacción modificada/control y D2-5'-TTTCTTTCCCCCTGGCCTT para la reacción de secuenciación, Sigma Aldrich) e incubadas por 5 minutos a 65°C, 10 minutos a 35°C y luego 1 minuto en hielo. 5 µl de la mezcla de transcripción reversa (10 µl de 10 mM dNTPs y 40 µl de 5X MMLV RT Buffer Promega), 1 µl de *MMLV Reverse Transcriptase RNase H minus* (Promega) y 1 µl de 10 mM ddTTP para la reacción de secuenciación, fueron finalmente agregados a la reacción de transcripción reversa que fue realizada a 35°C por 2 minutos, 42°C por 30 minutos y 55°C por 5 minutos. Las muestras fueron precipitadas con etanol 100% por 2 horas. Los centrifugados fueron resuspendidos en 40 µl de solución *Sample Loading Solution* (Beckman Coulter). Los productos de transcripción reversa fueron resueltos en un secuenciador CEQ-8000 (Beckman Coulter). Los análisis fueron realizados usando el programa QuSHAPE (Karabiber et al. 2013). Los experimentos fueron realizados tres veces. La estructura secundaria fue dibujada usando el programa VarNA (Darty, Denise, and Ponty 2009).

### **Microscopía electrónica**

Las células HEK293T, transfectadas como se ha descrito anteriormente, fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% en 0,1 M de buffer cacodilato, pH 7,2, por 6 horas a temperatura ambiente y lavadas con 0,1 M de buffer sodio cacodilato a pH 7,2 por 18 horas a 4°C. Luego, las muestras fueron fijadas con tetróxido de osmio acuoso al 1%

por 90 minutos, lavadas con agua destilada y luego fueron teñidas con acetato de uranilo acuoso al 1% por 60 minutos. Las muestras fueron deshidratadas en acetona con concentraciones crecientes 50%, 70%, 95% (dos veces) y 100% (tres veces), por 20 minutos cada vez. Las muestras fueron incubadas en epon resina-acetona en una razón 1:1, toda la noche y luego incubadas en epon resina pura que fue polimerizada a 60°C por 24 horas. Finos cortes (60 a 70 nm) fueron obtenidos en un ultramicrotomo Sorval MT-5000, con rejillas de cobre, y teñidas con acetato de uranilo al 4% en metanol por 2 minutos y citrato de plomo por 5 minutos. Las muestras fueron observadas en un microscopio Philips Tecnai 12 a 80 kV.

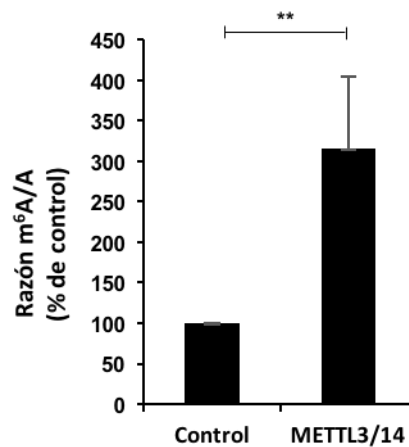
## Resultados

### **La presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg interfiere en su incorporación en la partícula viral**

#### **La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 induce un aumento en los niveles de ARNg metilados**

El silenciamiento o sobreexpresión de METTL3 o 14 han sido utilizados ampliamente para estudiar las funciones dependientes de m<sup>6</sup>A. Se ha observado que el silenciamiento de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 (METTL3/14) induce una disminución en el contenido de m<sup>6</sup>A tanto en ARNm de células HEK293T como de células HeLa mientras que la sobreexpresión de estas resulta en el efecto contrario (Liu et al. 2014b; Zaccara, Ries, and Jaffrey 2019). Considerando que el ARNg de VIH-1 posee m<sup>6</sup>A, lo primero que hicimos fue corroborar si la sobreexpresión de las metiltransferasas induce un aumento en el contenido de m<sup>6</sup>A en el transcrito viral. Para evaluarlo, células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 junto con los vectores de expresión de METTL3, METTL14 y el vector de expresión de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSVg), que permite la formación de partículas virales pseudotipadas. El vector de expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) fue utilizado como control. A las 24 horas post-transfección (hpt) se realizó una inmunoprecipitación de ARNs metilados (MeRIP) utilizando el anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A, como se describió en la sección materiales y métodos. La razón m<sup>6</sup>A/A fue evaluada mediante el análisis de los niveles de ARNg mediante un RT-qPCR con partidores

específicos para el ARNg de la fracción inmunoprecipitada (fracción “m<sup>6</sup>A”) respecto de la fracción input (fracción “A”). En la figura 7 se observa que el ARNg de VIH-1 presenta un incremento de tres veces en la razón m<sup>6</sup>A/A en aquellas células que sobreexpresan METTL3/14 comparado con el control. Estos resultados indican que, hay más ARNg metilado al sobreexpresar las metiltransferasas. Cabe destacar, que con esta técnica no es posible determinar si hay más residuos de adenosina metilados o más moléculas de ARNg metiladas en una misma posición o ambas.

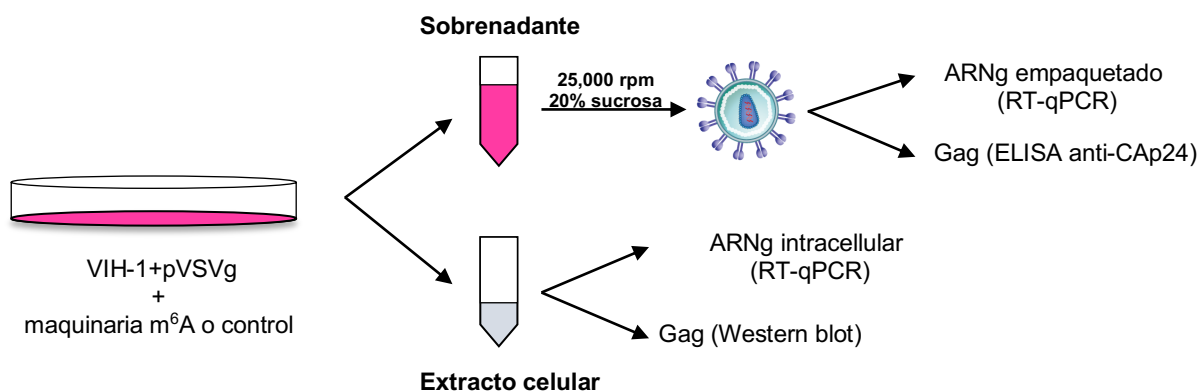


**Figura 7: Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en los niveles de ARNg metilado.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3, pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. Como control se utilizó el vector pCDNA-d2EGFP. 24 hpt se analizó la razón m<sup>6</sup>A/A mediante una MeRIP en ambas condiciones. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*\*p<0,01.

### **La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 interfiere en la incorporación del ARNg en la partícula viral**

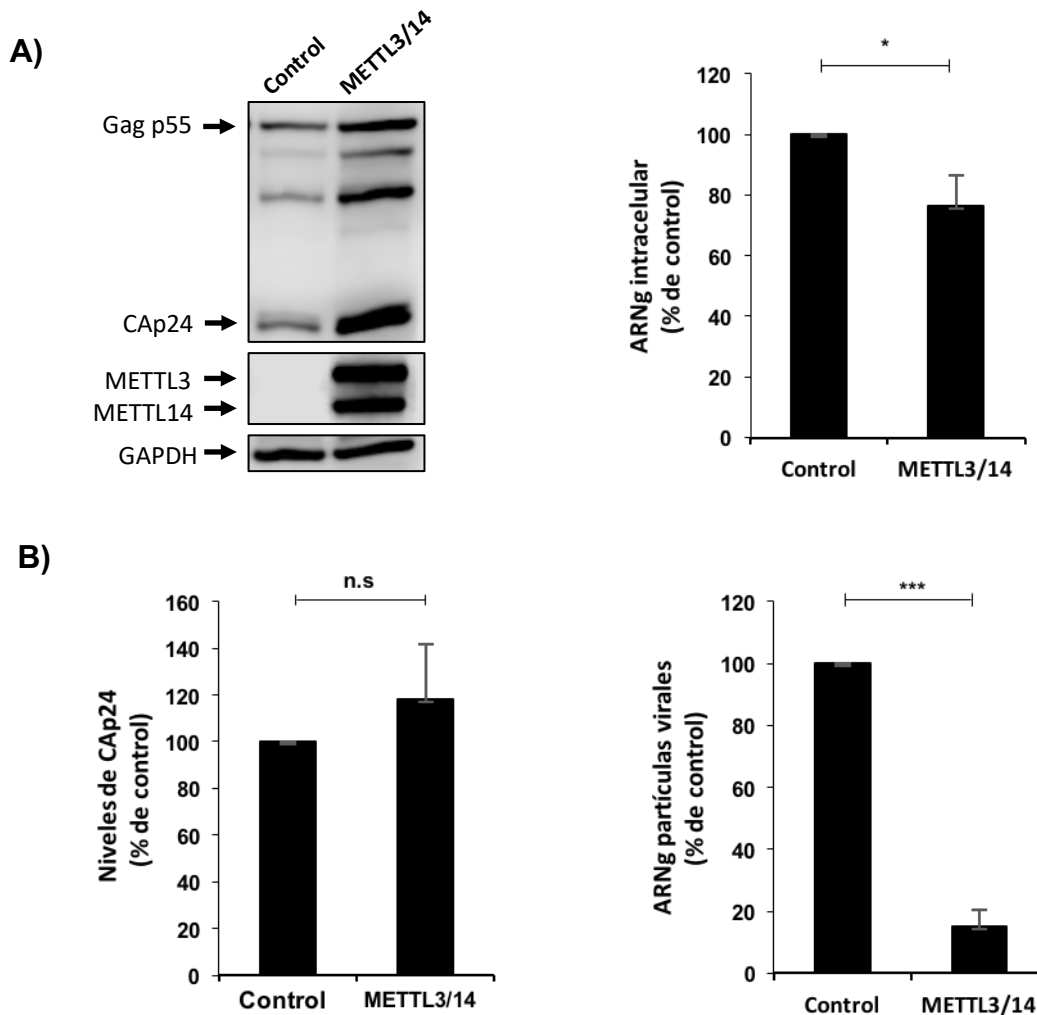
Una vez corroborado que la sobreexpresión de las metiltransferasas induce un aumento en los niveles de ARNg metilado, se procedió a analizar el impacto del aumento de m<sup>6</sup>A en la incorporación del ARNg en la nueva partícula viral. Para esto,

se evaluó el efecto de la sobreexpresión de METTL3 y METTL14 (mismos vectores de expresión del experimento anterior) en los niveles de ARNg y Gag intracelular, así como en los niveles de CAp24 y ARNg obtenidos de partículas virales concentradas, según se describió en la sección materiales y métodos (Figura 8). Es importante destacar que, en el caso del ARN extraído desde partículas virales, se midieron los niveles de ARNg desde cantidades equivalentes de CAp24 presente en las partículas concentradas. Es necesario mencionar que no es suficiente ver cambios en los niveles de ARNg en las partículas para concluir que el efecto observado esté dado por la selección del ARNg para ser incorporado en la partícula viral. Por esta razón es necesario evaluar los niveles de ARNg en partículas respecto del nivel de partículas liberadas y adicionalmente, los niveles de ARNg y Gag intracelular.



**Figura 8: Esquema del modelo experimental.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3, pCMV-VSVg y los vectores de expresión de la maquinaria de m<sup>6</sup>A con sus respectivos controles. 24 hpt se separa y filtra la fracción celular del sobrenadante. Las partículas virales son concentradas a partir de una ultracentrifugación del sobrenadante. Los niveles de Gag intracelular son analizados mediante un western blot. Los niveles de CAp24 liberados mediante un ELISA anti-CAp24. Los niveles de ARNg intracelular y en partícula mediante un RT-qPCR con partidores específicos para el ARNg.

En este experimento se observó que la sobreexpresión de las metiltransferasas induce un aumento en los niveles de Gag intracelular y sus productos de procesamiento con una disminución de aproximadamente el 20% en los niveles intracelulares de ARNg (Figura 9A). Al analizar las partículas virales purificadas, no se observan cambios significativos en los niveles de CA p24 liberados, sin embargo, al cuantificar los niveles de ARNg asociados a las partículas virales se observó que hubo una disminución de más de cuatro veces en los niveles de este, indicando que la mayoría de las partículas virales liberadas bajo estas condiciones carecen de ARNg (Figura 9B). Estos resultados permiten concluir que un aumento en los niveles de m<sup>6</sup>A en el ARNg, mediado por el complejo METTL3/14, interfiere en su empaquetamiento sin afectar la liberación de partículas virales.

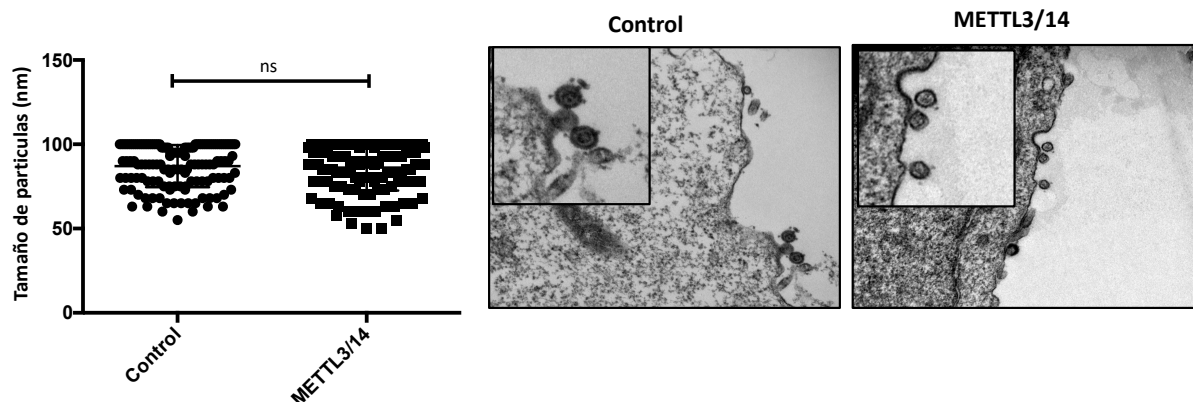


**Figura 9: Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. Como control se utilizó el vector pCDNA-d2EGFP. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento) y de ARNg intracelular mediante un WB y un RT-qPCR, respectivamente. B) Los niveles de CAp24 y ARNg en las partículas liberadas mediante un ELISA anti-CAp24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , n.s: no significativo.

Análisis de microscopía electrónica de las partículas liberadas en condiciones control y de sobreexpresión de METTL3/14 indican que ambas partículas poseen tamaños similares indicando que las diferencias observadas en los niveles de ARNg



empaquetados no se explican por diferencias en la cantidad de Gag incorporada en las partículas virales liberadas (Figura 10).

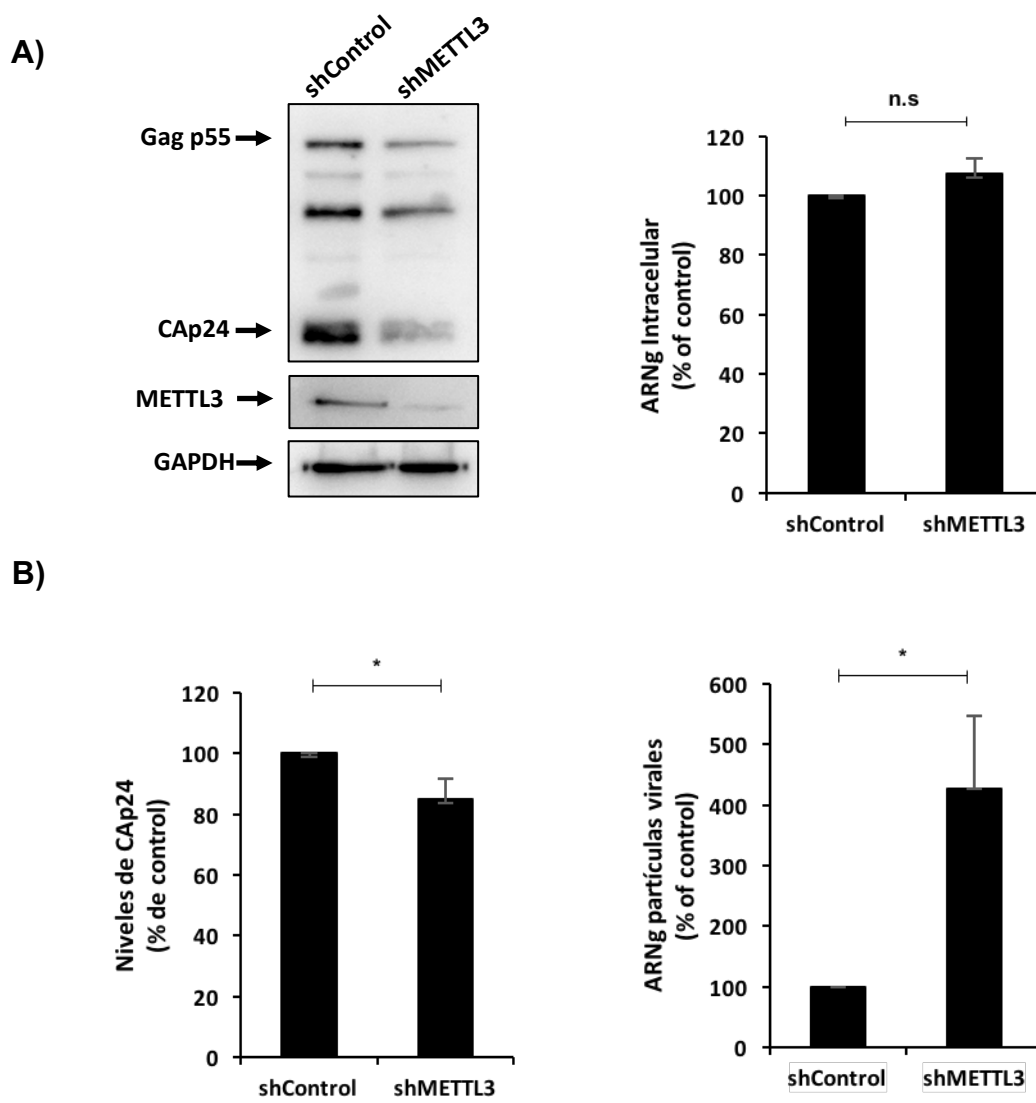


**Figura 10: Impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 en el tamaño de las partículas virales.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3, pCMV-VSVg, pCDNA-FlagMETTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. Como control se utilizó el vector pCDNA-d2EGFP. 24 hpt se observó las células mediante microscopía electrónica y se analizó el tamaño de las partículas producidas bajo ambas condiciones.

### **El silenciamiento de la expresión de METTL3 favorece la incorporación del ARNg en la partícula viral**

Para comprobar el efecto observado anteriormente, se realizó el mismo análisis, pero en líneas de células HEK293T que tienen silenciada la síntesis de METTL3 por la expresión estable de un shRNA. Estas líneas estables fueron producidas mediante la transducción de partículas lentivirales que contienen un shRNA para silenciar la expresión de METTL3 (shMETTL3) o un shControl, como se describió en la sección materiales y métodos. Estas células silenciadas fueron co-transfectadas con el vector proviral pNL4.3 y el vector pCMV-VSVg. A las 24 hpt se midieron los niveles de ARNg y Gag intracelular, y los niveles de ARNg y CAp24 en las partículas virales, como se describió previamente. De los resultados obtenidos se puede observar que el

silenciamiento de la expresión de METTL3 induce una disminución en los niveles de Gag intracelular sin cambios en los niveles de ARNg (Figura 11A), sugiriendo nuevamente un efecto positivo de m<sup>6</sup>A en la síntesis de Gag sin afectar mayormente los niveles intracelulares de ARNg. Al analizar que sucede en las partículas virales, se puede apreciar que a pesar de que existe una pequeña disminución en los niveles de CAp24 liberados hay un aumento de, aproximadamente, cuatro veces en los niveles de ARNg asociados a las partículas virales (Figura 11B). Estos resultados coinciden con lo esperado, observándose el efecto opuesto al obtenido al sobreexpresar las metiltransferasas.

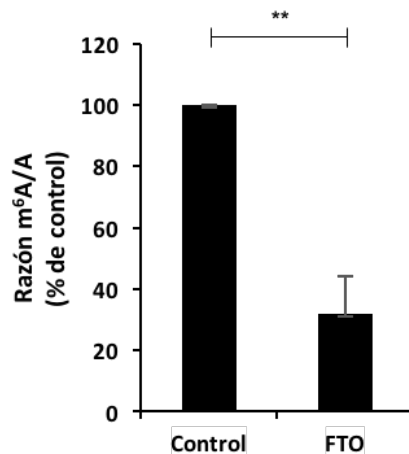


**Figura 11: Impacto del silenciamiento de la expresión de METTL3 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.** Líneas estables de células HEK293T silenciadas para la expresión de METTL3 fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 y pCMV-VSVg. Como control se utilizó líneas estables con un shControl. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento) y de ARNg intracelular mediante un WB y un RT-qPCR, respectivamente. B) Los niveles de CAp24 y ARNg en las partículas liberadas mediante un ELISA anti-CAp24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \* $p < 0,05$ , n.s: no significativo.

Los resultados obtenidos de la sobreexpresión y silenciamiento mencionados sugieren que la metilación del ARN genómico de VIH-1, mediada por las metiltransferasas METTL3 y METTL14, induce un aumento en los niveles de Gag intracelular y sus productos de procesamiento e interfiere con su incorporación en la nueva partícula viral.

### **La sobreexpresión de FTO favorece la incorporación del ARNg en la partícula viral**

Habiendo demostrado que la metilación del ARNg de VIH-1 juega un rol importante en su utilización citoplásmica, quisimos investigar el impacto de la desmetilación del ARNg en el empaquetamiento de este en la nueva partícula viral con el fin de evaluar si este proceso podía ser dinámico. Para esto, se realizaron los mismos experimentos mencionados para la sobreexpresión de las metiltransferasas, pero desde células que sobreexpresan las desmetilasas de m<sup>6</sup>A FTO y ALKBH5. Para llevar a cabo este objetivo se evaluaron los cambios en los niveles de ARNg metilados bajo la sobreexpresión de la desmetilasa FTO mediante una MeRIP, como se describió en la sección materiales y métodos. Para esto se transfectó células HEK293T con el vector pNL4.3 junto con el vector de expresión de FTO y pCMV-VSVg. El vector de expresión de GFP fue utilizado como control. Contrario a lo observado cuando se sobreexpresaron las metiltransferasas, la sobreexpresión de FTO resultó en una disminución de la razón m<sup>6</sup>A/A respecto del control, indicando que el ARNg de VIH-1 es un sustrato para FTO (Figura 12).

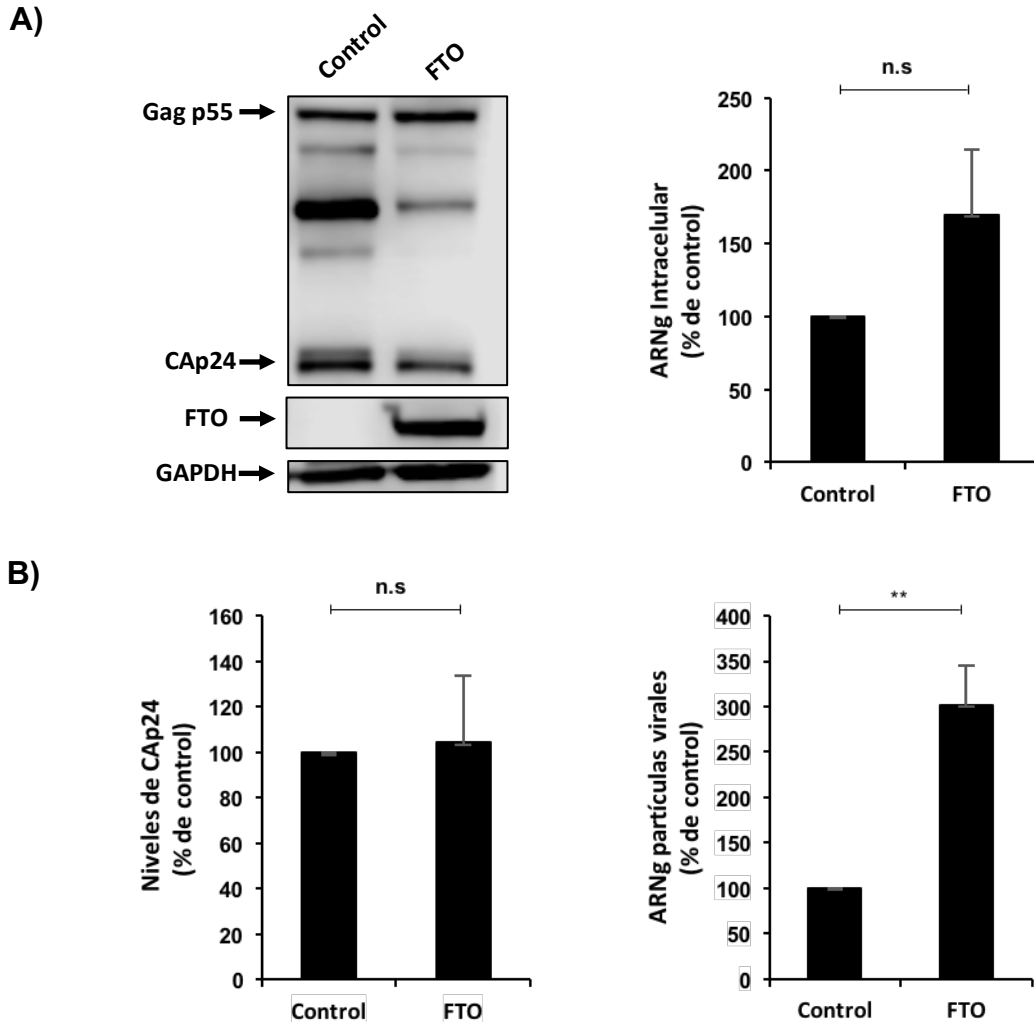


**Figura 12: Impacto de la sobreexpresión de FTO en los niveles de ARNg metilado.**

Células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3, pCMV-VSVg y pCDNA-3XFlag-FTO. Como control se utilizó el vector pCDNA-3XFlag-GFP. 24 hpt se analizó la razón m<sup>6</sup>A/A mediante una MeRIP en ambas condiciones. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*\*p<0,01.

Una vez corroborado que el ARNg es sustrato de FTO y, en consecuencia, puede ser desmetilado por esta, se procedió a analizar los niveles de Gag y ARNg intracelular, y los niveles de CAp24 y ARNg obtenidos de partículas virales purificadas. Para ello, células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3 junto con el vector pCMV-VSVg y el vector de expresión de FTO o el vector de expresión de GFP, como control. 24 hpt se analizaron los niveles de Gag y ARNg intracelular, y los niveles de CAp24 y ARNg desde las partículas virales purificadas como se describió en la sección materiales y métodos. En este experimento se pudo observar que los niveles de Gag y sus productos de procesamiento disminuyen, sin cambios significativos en los niveles de ARNg intracelular (Figura 13A). Adicionalmente, a pesar de no observar cambios en los niveles de CAp24 desde las partículas virales purificadas, hubo un aumento de tres veces en los niveles de ARNg empaquetados respecto del control (Figura 13B).

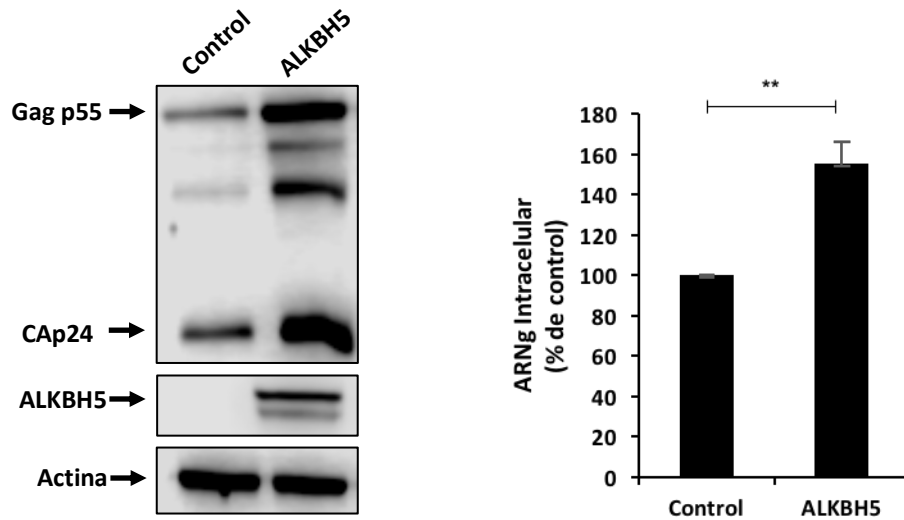
Estos resultados sugieren que la selección del ARNg para ser empaquetado es un proceso dinámico regulado por la metilación/desmetilación del ARN.



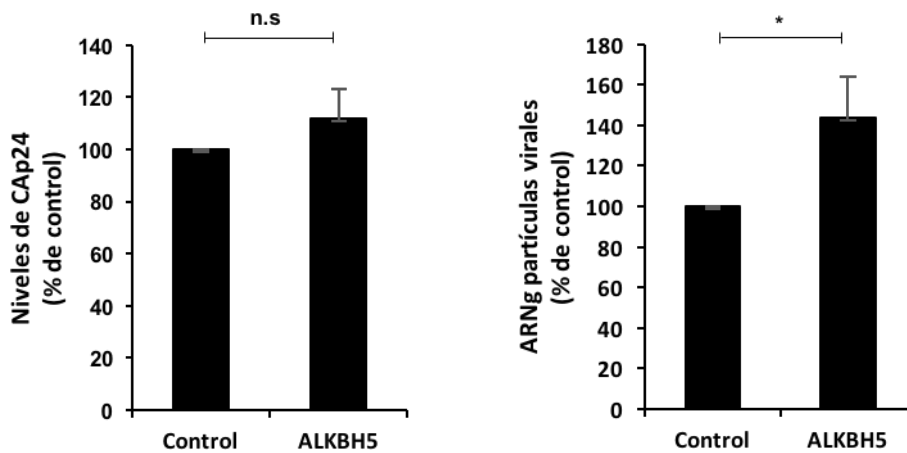
**Figura 13: Impacto de sobreexpresión de FTO en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg y pCDNA-3XFlag-FTO. Como control se utilizó el vector pCDNA-3XFlag-GFP. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento) y de ARNg intracelular mediante un WB y un RT-qPCR, respectivamente. B) Los niveles de CAP24 y ARNg en las partículas liberadas mediante un ELISA anti-CAP24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*\* $p < 0,01$ , n.s: no significativo.

Adicionalmente se realizaron los mismos experimentos mencionados, pero sobreexpresando la desmetilasa de m<sup>6</sup>A ALKBH5 (Figura 14). En estos experimentos se observaron efectos menores en el empaquetamiento del ARNg, a los resultados obtenidos en la sobreexpresión de FTO, sugiriendo que la desmetilación por FTO tiene un mayor impacto para la regulación del empaquetamiento del ARNg de VIH-1. Al observar los niveles de Gag intracelular y sus productos de procesamiento, se observó un aumento de estos, contrario a lo observado al sobreexpresar FTO. Sería interesante poder analizar si FTO y ALKBH5 tienen diferente especificidad de desmetilación, ya sea sitio específico o en distintas moléculas, para poder entender las diferencias observadas a nivel de Gag intracelular. Hubiese sido interesante evaluar, si al igual que FTO, ALKBH5 induce una disminución en los niveles de ARNg metilados.

A)



B)



**Figura 14: Impacto de sobreexpresión de ALKBH5 en los niveles de ARNg y Gag intracelular y en partículas liberadas.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg y pEGFP-ALKBH5. Como control se utilizó el vector pEGFP. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento) y de ARNg intracelular mediante un WB y un RT-qPCR, respectivamente. B) Los niveles de CAP24 y ARNg en las partículas liberadas mediante un ELISA anti-CAP24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,1$ , n.s: no significativo.



En su conjunto, estos resultados confirman que la presencia de m<sup>6</sup>A en el ARNg, mediada por METTL3/14, favorece la síntesis de Gag e interfiere en su empaquetamiento. Además, nuestros resultados sugieren que el uso del ARNg como genoma puede ser regulado de manera dinámica a través de la desmetilación mediada por FTO.

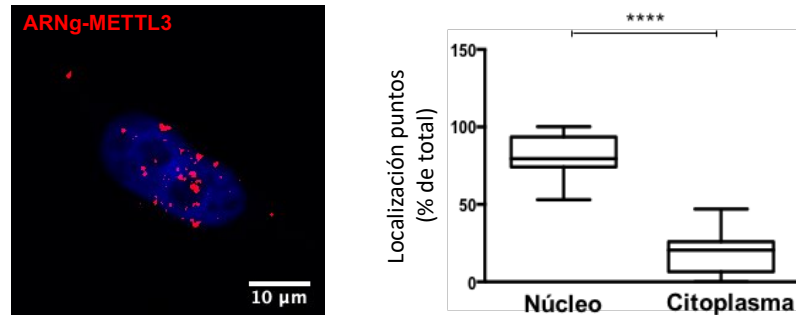
### **La presencia de m<sup>6</sup>A afecta negativamente la interacción de Gag con el ARNg**

#### **METTL3 interacciona con el ARNg en el núcleo celular**

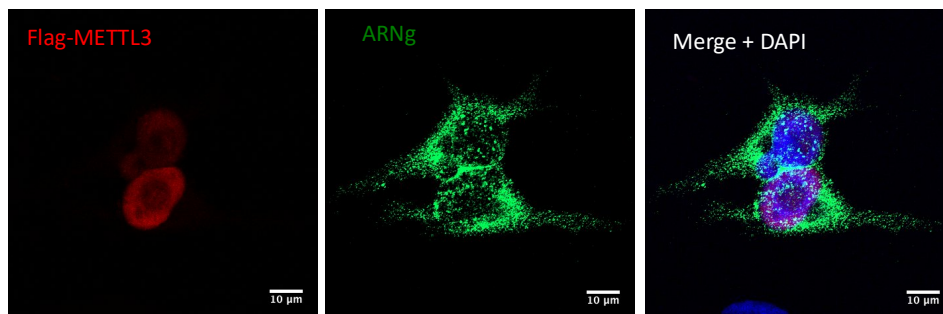
Dado que vemos un impacto negativo en el empaquetamiento del ARNg al sobreexpresar las metiltransferasas, lo siguiente que hicimos fue corroborar que la proteína METTL3 interacciona con el ARNg para luego poder analizar el posible impacto de la sobreexpresión de las metiltransferasas en la interacción de Gag con el ARNg. Para esto, células HeLa fueron transfectadas con los vectores de expresión de las metiltransferasas METTL3 y METTL14, el vector proviral de VIH-1 y pCMV-VSVg. 24 hpt se evaluó la interacción ARNg-METTL3 mediante la técnica ISH-PLA, como se describió en la sección materiales y métodos. Esta técnica mezcla la técnica de hibridación *in situ* de ARN (FISH) y el ensayo de ligación proximal (PLA) y permite, mediante microscopía confocal, visualizar la asociación ARN-proteína cuando están a una distancia menor a 40 nm. Para esta técnica se utilizan sondas marcadas con digoxigenina (UTP-digoxigenina) que reconocen la secuencia Gag-Pol del ARNg, la digoxigenina es reconocida por el anticuerpo primario, el cual, a su vez, es reconocido por el anticuerpo secundario de PLA. Si los elementos analizados están a una distancia menor de 40 nm se produce una señal que se observa como un punto de color rojo al interior de las células. En la figura 15A se puede observar que la metiltransferasa

METTL3 interacciona con el ARNg en el núcleo de la célula, según lo esperado. Como control se corroboró la expresión del ARNg y de METTL3 mediante un ensayo de FISH e inmunofluorescencia convencional, como se describe en la sección materiales y métodos (Figura 15B).

A)



B)

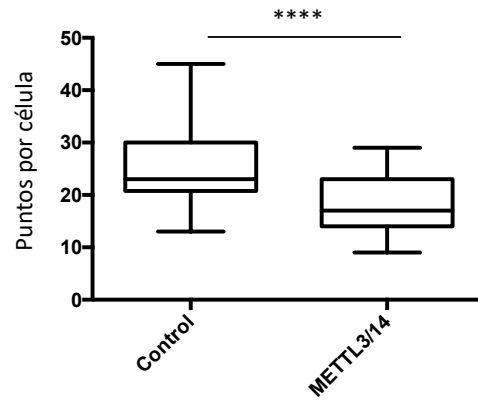
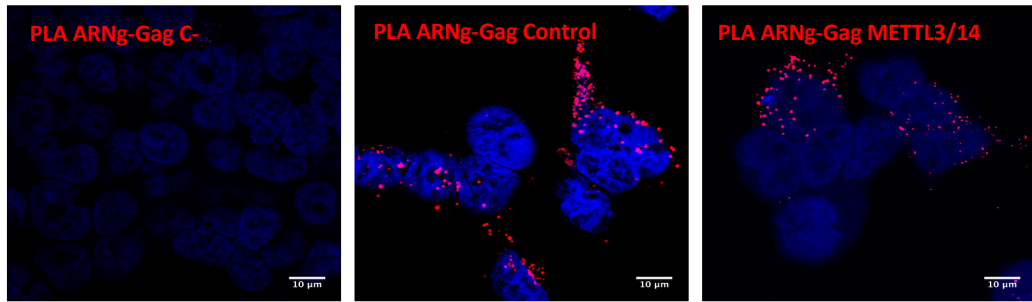


**Figura 15: Interacción de METTL3 con el ARNg.** Células HeLa fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg y pCDNA-Flag-METTL3. 24 hpt se analizaron: A) La interacción ARNg-METTL3 mediante un ISH-PLA. Los puntos rojos indican la interacción entre el ARNg y METTL3. Una cuantificación de la interacción en el núcleo y en el citoplasma, respecto del total de puntos, se presenta a la derecha. B) La expresión de METTL3 y el ARNg fueron evaluadas mediante un FISH realizado en paralelo. Se realizó una prueba T-test; \*\*\*\*p<0,0001.

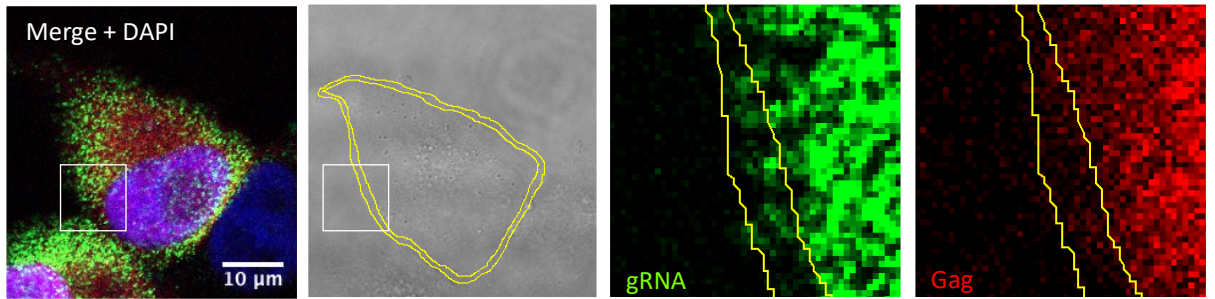
### **La sobreexpresión de METTL3 y METTL14 disminuye la interacción Gag-ARNg**

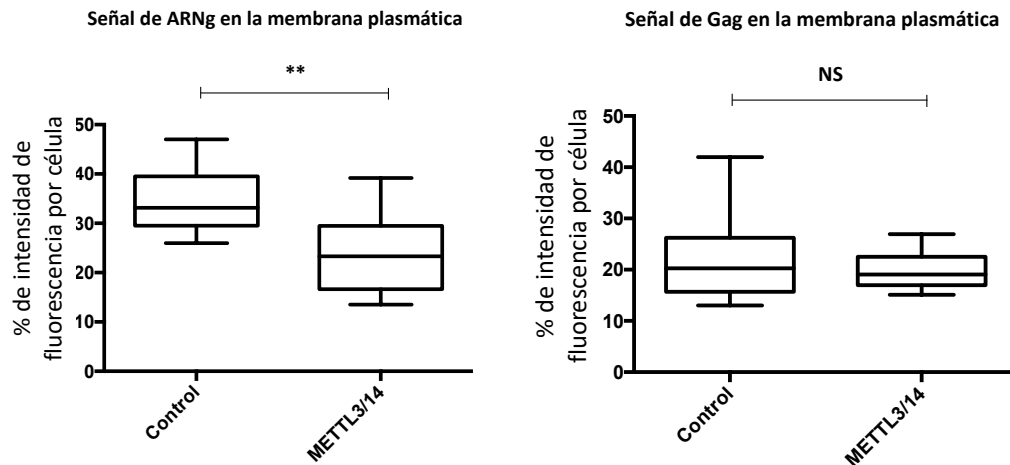
Dado que la interacción entre Gag y la 5'-UTR del ARNg es clave para la selección de este para empaquetarse, es que quisimos evaluar si la disminución en la incorporación del ARNg en la partícula viral, al sobreexpresar el complejo METTL3/14 (observada anteriormente), podría estar explicada por cambios en la interacción entre el ARNg y Gag. Para esto, se sobreexpresó el complejo METTL3/14 y se evaluó la interacción de Gag con el ARNg mediante un ISH-PLA, como se describió en la sección materiales y métodos. En los resultados se puede observar que la interacción ARNg-Gag ocurre en ambas condiciones, sin embargo, observamos que la sobreexpresión del complejo metiltransferasas induce una significativa disminución en la interacción de Gag con el ARNg (Figura 16A). Al analizar la señal de fluorescencia de Gag y del ARNg en la membrana plasmática observamos que al sobreexpresar el complejo METTL3/14 disminuyen los niveles de ARNg que se encuentran presentes en la membrana plasmática sin cambios en los niveles de Gag presentes en esta (Figura 16B). Estos resultados concuerdan con los resultados mencionados previamente donde se observó que al sobreexpresar las metiltransferasas, a pesar del pequeño aumento en los niveles de partículas liberadas, hay una disminución significativa en los niveles de ARNg que son empaquetados.

A)



B)





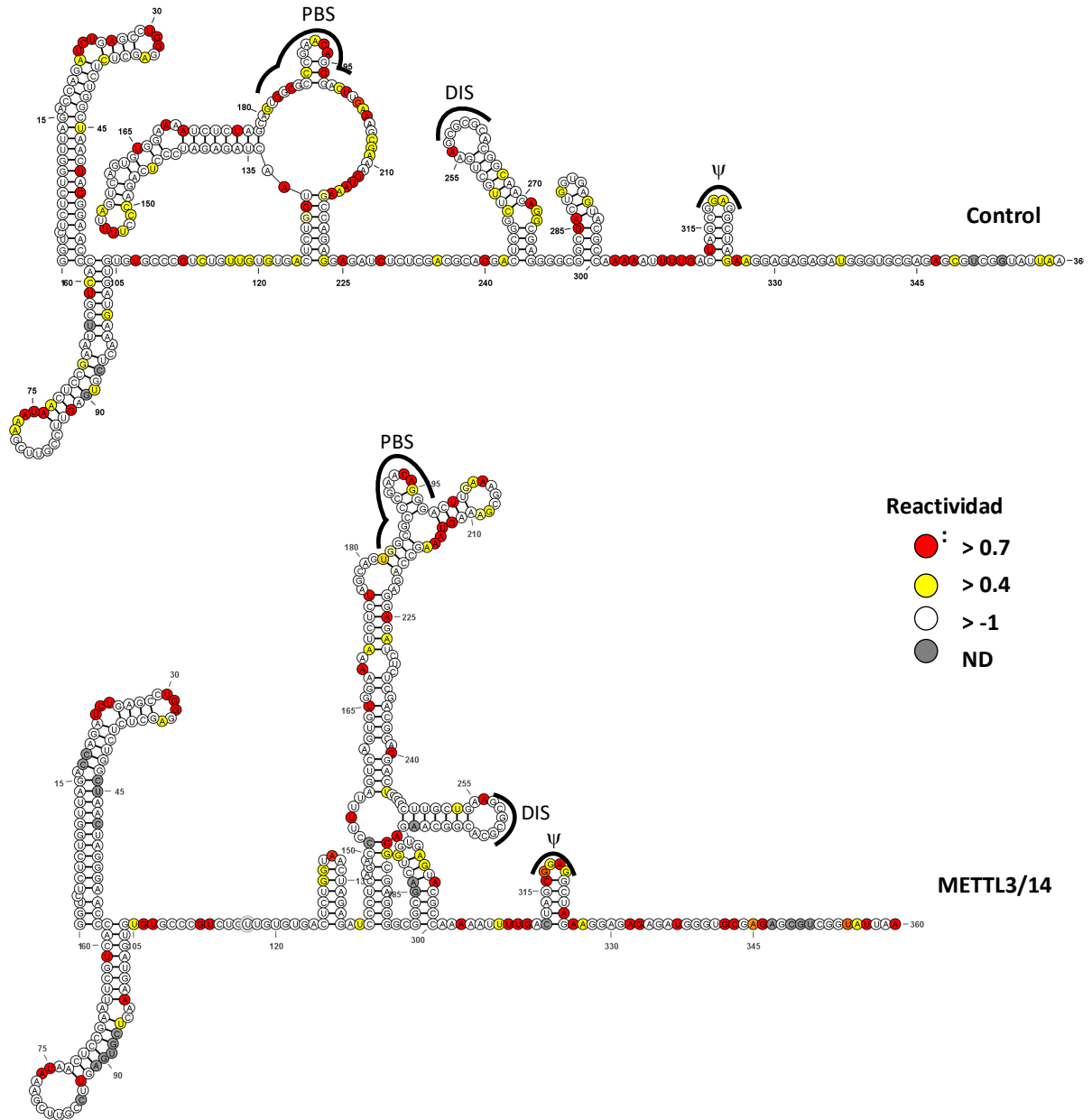
**Figura 16: Impacto de la sobreexpresión del complejo METTL3/14 en la interacción ARNg-Gag.** Células HeLa fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. Como control se utilizó la expresión de GFP. 24 hpt se analizaron: A) La interacción ARNg-Gag mediante un ISH-PLA en ambas condiciones. Los puntos rojos indican la interacción entre el ARNg y Gag. La cuantificación de la interacción en ambas condiciones se presenta abajo. B) La señal del ARNg y de Gag en la membrana plasmática en ambas condiciones fue evaluada midiendo los niveles de fluorescencia de ambos componentes en la membrana. Se observan las imágenes en condición control con el objetivo de evaluar cómo se realiza el análisis. Se realizó una prueba T-test; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , n.s; no significativo.

Estos resultados indican que la sobreexpresión del complejo METTL3/14 induce una disminución de la interacción del ARNg con Gag y una disminución de los niveles de ARNg en la membrana plasmática. Esto sugiere que la disminución que observamos en el empaquetamiento del ARNg al sobreexpresar el complejo metiltransferasa podría estar explicado, en parte, por una disminución en el reclutamiento de Gag por el ARNg dado por la presencia de  $m^6A$ .

## **La presencia de m<sup>6</sup>A induce cambios estructurales en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1**

Con el fin de ahondar en el mecanismo por el cual la metilación del ARNg interfiere con el reclutamiento de Gag y considerando la relevancia de la estructura de la 5'-UTR en el empaquetamiento, quisimos estudiar si la metilación de la 5'-UTR afecta su estructura. Para esto, realizamos la técnica SHAPE-MaP (Acilación selectiva de hidroxilo 2' analizada por extensión de oligonucleótidos y perfil mutacional) en colaboración con el Dr. Bruno Sargueil (Université de Paris Descartes, Francia) utilizando ARN poliA obtenido de células que expresan VIH-1 y d2EGFP (control) y células que expresan VIH-1 y METTL3/14. El experimento de SHAPE-MaP fue desarrollado como se describió en la sección materiales y métodos. Esta técnica se basa en que el ARN obtenido es modificado con un reactivo de SHAPE, en este caso 1M7, el cual reacciona con el 2' hidroxilo libre de los nucleótidos que se encuentran expuestos, es decir, que se encuentran en una región de hebra simple, formando aductos. Como control, una fracción equivalente de la muestra se trata con DMSO. Luego el ARN modificado y control es sometido a una transcripción reversa, en este caso, con partidores específicos para la región 5'-UTR, introduciéndose mutaciones cuando hay aductos presentes. Posteriormente, los ADNc obtenidos son utilizados para crear genotecas (kit NEBNext Ultra II Library Prep Kit for Illumina) y ser secuenciadas en un sistema de secuenciación Illumina NextSeq 500. Los análisis de las secuencias obtenidas fueron realizados por el Dr. Bruno Sargueil quien utilizó el programa *ShapeMapper2* y el programa IPANEMAP para predecir el modelo estructural de la 5'-UTR en ambas condiciones. Nucleótidos con reactividad SHAPE mayor a 0,7 fueron considerados altamente reactivos, mayor a 0,4 fueron considerados

moderadamente reactivos, mayor a -1 no reactivos y ND no determinados; siendo reactivos aquellos nucleótidos que fueron modificados con 1M7. De manera interesante, observamos que la metilación por el complejo METTL3/14 induce cambios estructurales en la 5'-UTR (Figura 17). Si observamos en detalle se puede ver que el cambio estructural comienza, aproximadamente, en el nucleótido 132 y continúa al nucleótido 278, con cambios en la región del PBS, pero sin afectar la región DIS en SL1 ni la señal de empaquetamiento ( $\psi$ ) en SL3. De manera interesante, esta región coincide con las regiones de interacción del 5'-UTR con Gag, reportadas mediante la técnica CLIP-seq (Kutluay et al, 2014) y la región de metilación que observamos en los resultados preliminares del m<sup>6</sup>A-seq (80-280 nt). Este cambio estructural inducido por el complejo metiltransferasa, podría explicar la disminución del reclutamiento de Gag observada previamente.



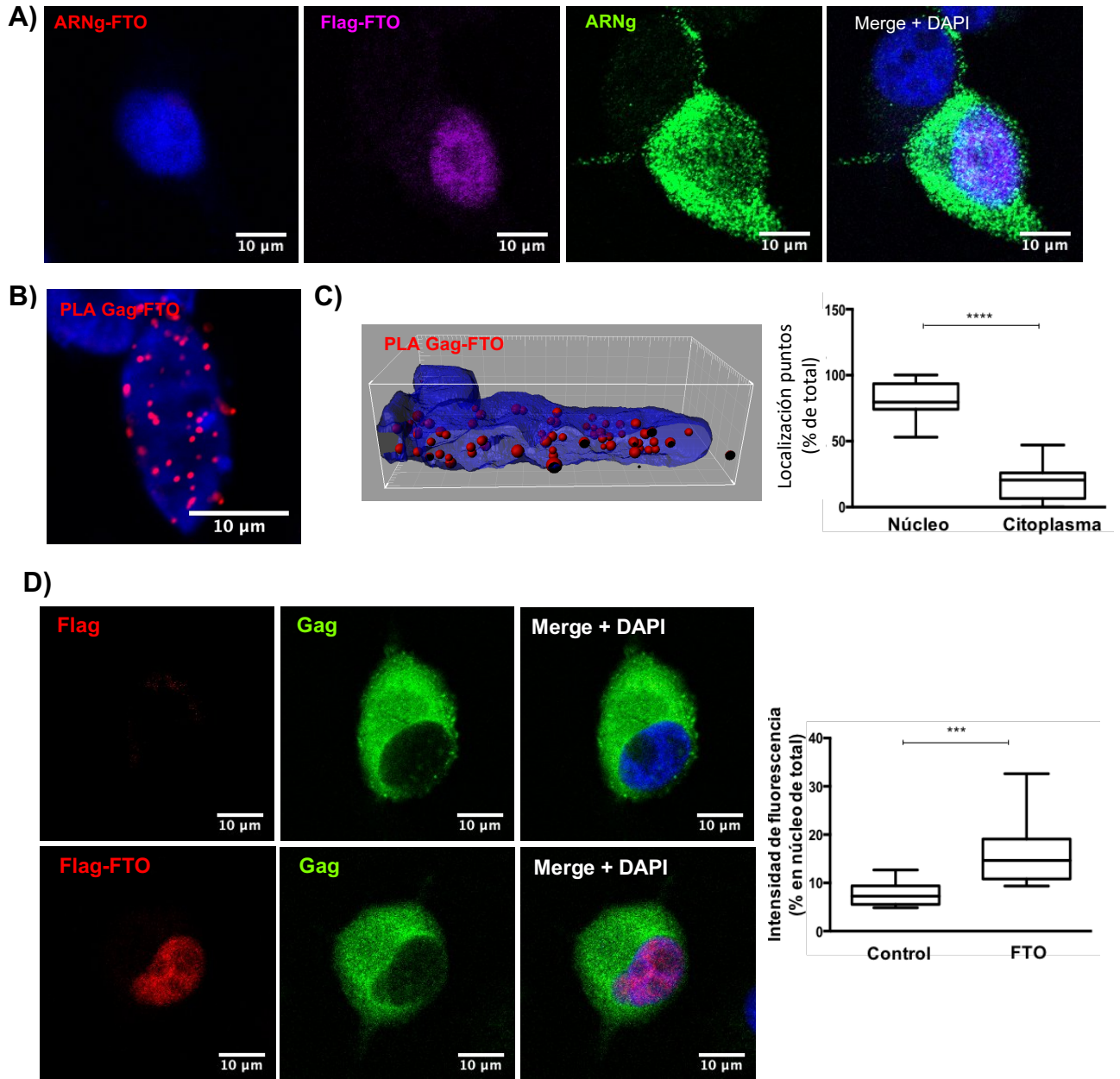
**Figura 17: Impacto de la sobreexpresión del complejo METTL3/14 en la estructura de la 5'-UTR del ARNg.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. Como control se utilizó la expresión de GFP. 24 hpt se analizó la estructura de la 5'-UTR del ARNg en ambas condiciones mediante un SHAPE-MaP según se señaló en la sección materiales y métodos. Arriba se observa la condición control y abajo la condición en sobreexpresión de METTL3/14. Los nucleótidos con reactividad SHAPE mayor a 0,7 y mayor a 0,4 son considerados alta y moderadamente reactivos, respectivamente. Mayor a -1 es considerado no reactivo y ND no determinados. Las estructuras fueron obtenidas mediante el software IPANEMAP.



## **Gag interacciona con FTO y disminuye los niveles de metilación del ARNg**

### **Gag interacciona con FTO en el núcleo celular**

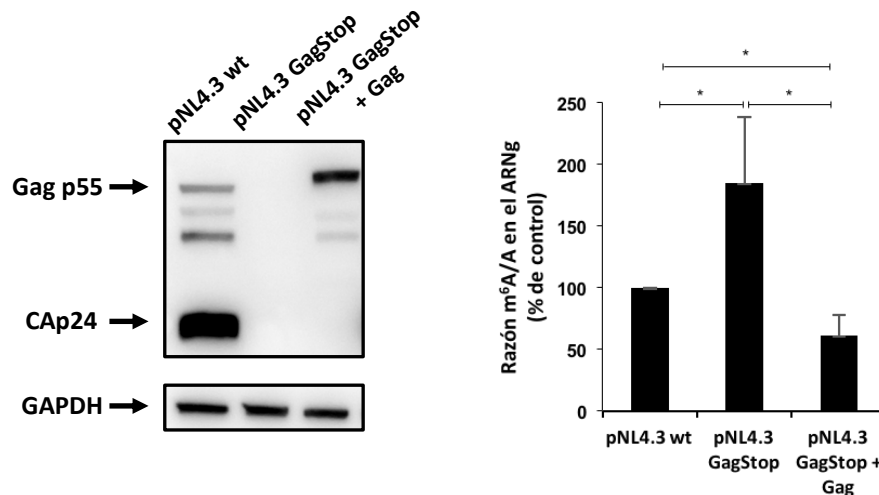
Al igual que con METTL3, quisimos evaluar la interacción de FTO con el ARNg mediante ISH-PLA. Lamentablemente, a pesar de los muchos intentos, no fue posible detectar esta interacción, aunque todos los componentes se expresaron en la célula como era esperado (Figura 18A). Esto se podría deber a que esta interacción puede ocurrir muy transitoriamente, en niveles que estén por debajo del límite de detección de la técnica o porque el/los sitio(s) de unión a FTO en el ARNg este(n) alejado(s) del sitio de unión de las sondas. Dado que los resultados obtenidos en los experimentos de sobreexpresión de FTO indican que esta participaría en la regulación del empaquetamiento del ARNg mediado por m<sup>6</sup>A, el no poder detectar la interacción de FTO con el ARNg nos llevó a investigar si Gag pudiese estar interaccionando con FTO para dirigir la desmetilación del ARN viral, actuando como un intermediario entre el ARNg y FTO. Esta interacción se evaluó mediante PLA (ensayo de ligación proximal), como se describió en la sección materiales y métodos, y se observó que efectivamente Gag y FTO forman un complejo en la célula (Figura 18B). Al cuantificar los puntos de interacción que localizan en el núcleo respecto del total de puntos por célula y la reconstitución 3D de las imágenes obtenidas se observa que Gag y FTO se asocian principalmente en el núcleo (Figura 18C), e incluso se puede observar que la sobreexpresión de FTO incrementa la localización nuclear de Gag (Figura 18D).



**Figura 18: Gag y FTO interactúan principalmente en el núcleo celular.** Células HeLa fueron transfectadas con el vector pNL4.3, pCMV-VSVg y pCDNA-3XFlag-FTO. A) 24 hpt se evaluó la interacción ARNg-FTO mediante un ISH-PLA y la expresión de FTO y el ARNg mediante un FISH de ARN. B) La interacción entre Gag y FTO fue evaluada mediante un PLA. Los puntos rojos indican la interacción Gag-FTO. C) Se muestra una reconstitución tridimensional del PLA mostrado en (B) y una cuantificación de los puntos rojos en el núcleo y en el citoplasma de cada célula. D) Se analizaron los cambios en la intensidad de fluorescencia de Gag en el núcleo respecto del total al sobreexpresar FTO. Se realizó una prueba T-test; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### **Gag disminuye el estado de metilación del ARNg**

Dado que se observó que Gag interacciona principalmente con el ARNg en el núcleo celular, nos preguntamos si Gag podría estar interaccionando con FTO para promover la desmetilación del ARNg. Para esto, se evaluó el estado de metilación del ARNg (razón  $m^6A/A$ ) mediante una MeRIP en presencia o ausencia de Gag, como se describió en la sección materiales y métodos. Para hacer este análisis, células HEK293T fueron transfectadas con el vector proviral pNL4.3 junto con el vector pCMV-VSVg para la condición silvestre, y con el vector proviral pNL4.3-GagStop junto con el vector pCMV-VSVg para la condición en donde no se expresa Gag. El vector pNL4.3-GagStop contiene una serie de dos codones de término prematuro que impiden la síntesis de Gag. En una tercera condición se restituyó la expresión de Gag en *trans* con un vector de expresión de Gag (pCMV-Gag). Al comparar las dos primeras condiciones, se puede observar que hay un aumento de la razón  $m^6A/A$  cuando Gag no está presente (mayor nivel de  $m^6A$  en el ARNg) y esta condición es revertida e incluso disminuida cuando la proteína Gag es expresada en *trans*, sugiriendo que Gag participaría en la desmetilación del ARNg (Figura 19).



**Figura 19: Impacto de Gag en el estado de metilación del ARNg.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pCMV-VSVg y pNL4.3 wt o pNL4.3-GagStop o pNL4.3-GagStop junto con el vector pCMV-Gag. 24 hpt el extracto celular fue usado para analizar Gag (y sus productos de procesamiento) y GAPDH mediante un western blot. En paralelo, los extractos celulares fueron utilizados para realizar una extracción de ARN y una MeRIP. El ARN input (fracción “A”) y el ARN inmunoprecipitado (fracción “m<sup>6</sup>A”) fueron cuantificados por un RT-qPCR. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

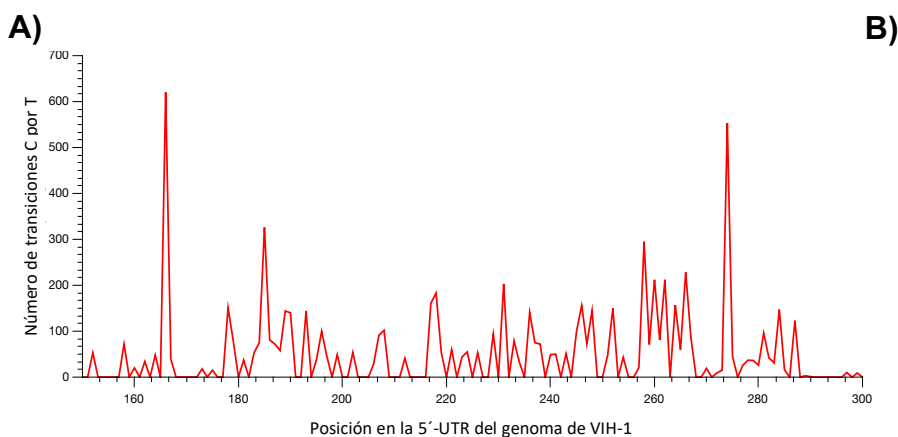
Estos resultados sugieren fuertemente que Gag podría favorecer la desmetilación, mediada por FTO, de aquellas moléculas de ARNg que serán empaquetadas en las nuevas partículas virales. Considerando los múltiples sitios de unión a Gag en la 5'-UTR del ARNg, sería interesante evaluar si ocurre una interacción directa entre el ARNg metilado y Gag para, posiblemente promover su desmetilación, o si son parte de un mismo complejo, pero no interaccionan directamente. Por otro lado, sería importante evaluar que dominio de Gag estaría participando en la interacción con FTO y la regulación de la desmetilación del ARNg, entendiendo que es el dominio NC p7 el que interacciona con el ARNg para encapsularlo. Esto con el objetivo de poder

diferenciar el efecto de Gag en el estado de metilación del ARNg y el efecto en la interacción con el ARNg para encapsarlo.

### **Las adenosinas 198 y 242 participan en la regulación del empaquetamiento del ARNg mediada por m<sup>6</sup>A**

#### **Determinación experimental de los nucleótidos metilados en la 5'-UTR**

Para determinar experimentalmente los nucleótidos metilados en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1 se propuso realizar una adaptación de la técnica miCLIP (Grozhik et al. 2017). Esta técnica se basa en el entrecruzamiento de un anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A que al formar un enlace covalente con el ARN induce un cambio de la citosina adyacente al residuo metilado por una timina (transición C por T) durante la generación del ADNc. Lamentablemente, las secuencias obtenidas en nuestro ensayo no permitieron dilucidar las adenosinas que se encuentran metiladas ya que se encontraron cambios nucleotídicos en diversas posiciones distintas a residuos de adenosina (Figura 20A) y el porcentaje de transición de citosinas por timinas fue de un 7% (Figura 20B).

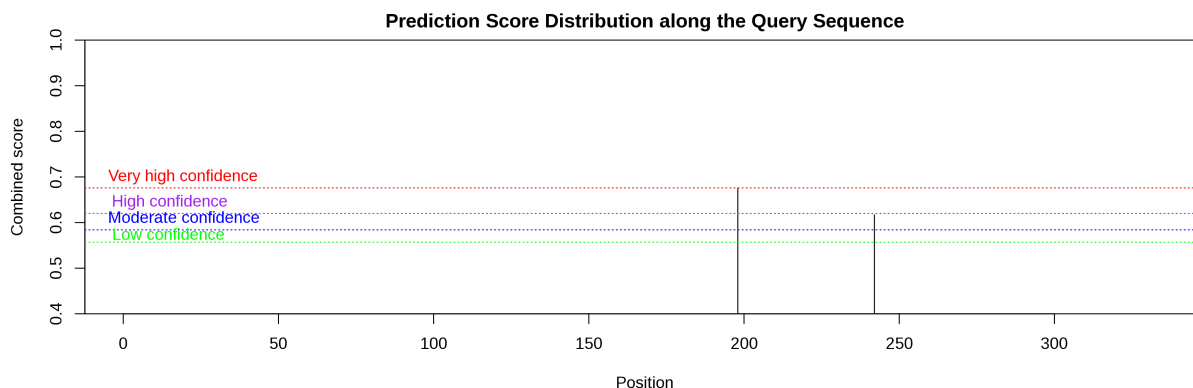


**Figura 20: Análisis del miCLIP realizado en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.** Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pCMV-VSVg y pNL4.3. 24 hpt se purificó el ARN poliA, el cual se incubó con el anticuerpo anti-m<sup>6</sup>A y entrecruzó con luz UV. Posteriormente se trató con proteinasa K, y se realizó un RT-PCR con partidores específicos que se encuentran dentro de la región 5'-UTR. El ADNc obtenido fue secuenciado y se analizó: A) El número de transiciones de una citosina por una timina a lo largo de la región secuenciada. En el eje Y se observa el número de transiciones C por T por cada nucleótido, en el eje X la posición a lo largo de la 5'-UTR. B) El porcentaje de transición de una citosina por una timina.

**La ausencia de la A<sub>198</sub> y la A<sub>242</sub> (por separado) no revierten el impacto de la sobreexpresión de METTL3/14 sobre el empaquetamiento del ARNg**

A pesar de que no se pudo determinar las adenosinas metiladas experimentalmente mediante miCLIP, se pudo identificar dos posibles adenosinas que podrían estar siendo metiladas en la 5'-UTR del ARNg analizando los datos del m<sup>6</sup>A-seq mostrados en la introducción y una predicción bioinformática realizada con la herramienta SRAMP (Y. Zhou et al. 2016a) descrita en la sección materiales y métodos. La predicción bioinformática reveló que la A<sub>198</sub> y la A<sub>242</sub> se encuentran en un contexto favorable de metilación (Figura 21). El análisis en detalle de nuestro resultado de SHAPE-MaP y de estudios estructurales previos (J. Paillart et al. 2004; Wilkinson et al. 2008b) indican que ambas adenosinas son altamente reactivas, es decir, se encuentran expuestas en regiones de hebra simple, siendo ambas posibles blancos de metilación. Consistente con los resultados de m<sup>6</sup>A-seq, ambas adenosinas se encuentran dentro de la región metilada (residuos 80-280) observada en el ARNg intracelular. Al mirar en detalle, encontramos que la A<sub>198</sub> se encuentra en una región de interacción con el tRNA<sup>Lys3</sup> (PBS) y que ambas adenosinas son parte de un sitio de unión específico al dominio NC de Gag observado mediante CLIP-seq (Kutluay et al. 2014), siendo esta última una

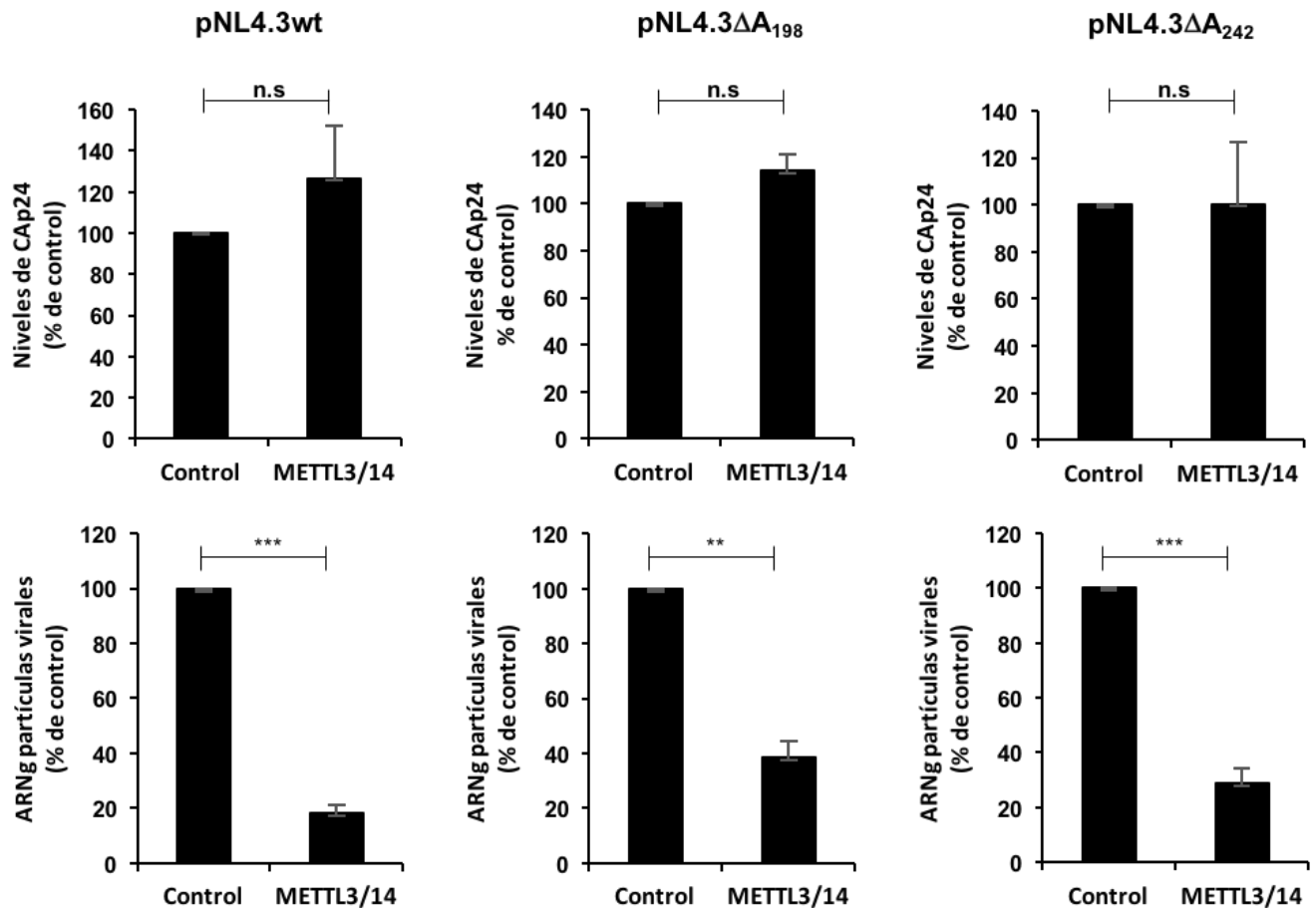
interacción fundamental para que el ARNg sea seleccionado para empaquetarse (Wilkinson et al. 2008b). Mas aún, un estudio del 2018 encontró que mutantes de estas adenosinas alteran la infección viral, indicando la relevancia de ambas adenosinas para el ciclo replicativo viral (W. Lu et al. 2018).



**Figura 21: Predicción informática de los nucleótidos metilados en la 5'-UTR del ARNg de VIH-1.** La predicción de los residuos metilados en la 5'-UTR del pNL4.3 fue analizada en el software SRAMP disponible en [www.cuilab.cn/sramp](http://www.cuilab.cn/sramp) considerando la estructura secundaria del ARN.

Para evaluar experimentalmente el rol de ambas adenosinas en la regulación del empaquetamiento del ARNg mediada por m<sup>6</sup>A es que se eliminó la A<sub>198</sub> o la A<sub>242</sub> en el provirus pNL4.3. En primer lugar, con el propósito de evaluar si la metilación de estas adenosinas, por separado, cumplen un rol en la regulación del empaquetamiento, sólo se analizó las partículas virales obtenidas de los provirus con deleciones simples. Para esto, se co-transfectó células HEK293T con el vector proviral correspondiente (pNL4.3 o pNL4.3ΔA<sub>198</sub> o pNL4.3ΔA<sub>242</sub>), el vector pCMV-VSVg y los vectores de expresión pCDNA-Flag-METTLL3 y pCDNA-Flag-METTLL14 o pCDNA-d2EGFP como control. A las 24 hpt se analizaron los niveles de CAp24 y ARNg obtenidos de partículas virales como se describió en la sección materiales y métodos. En estos experimentos se

observó que el ARNg producido a partir de los provirus que poseen las deleciones simples,  $\Delta A_{198}$  y  $\Delta A_{242}$ , siguen mostrando una disminución en el empaquetamiento, al sobreexpresar las metiltransferasas, pero a un nivel menor que el observado en la condición silvestre, como se puede apreciar en la figura 22.



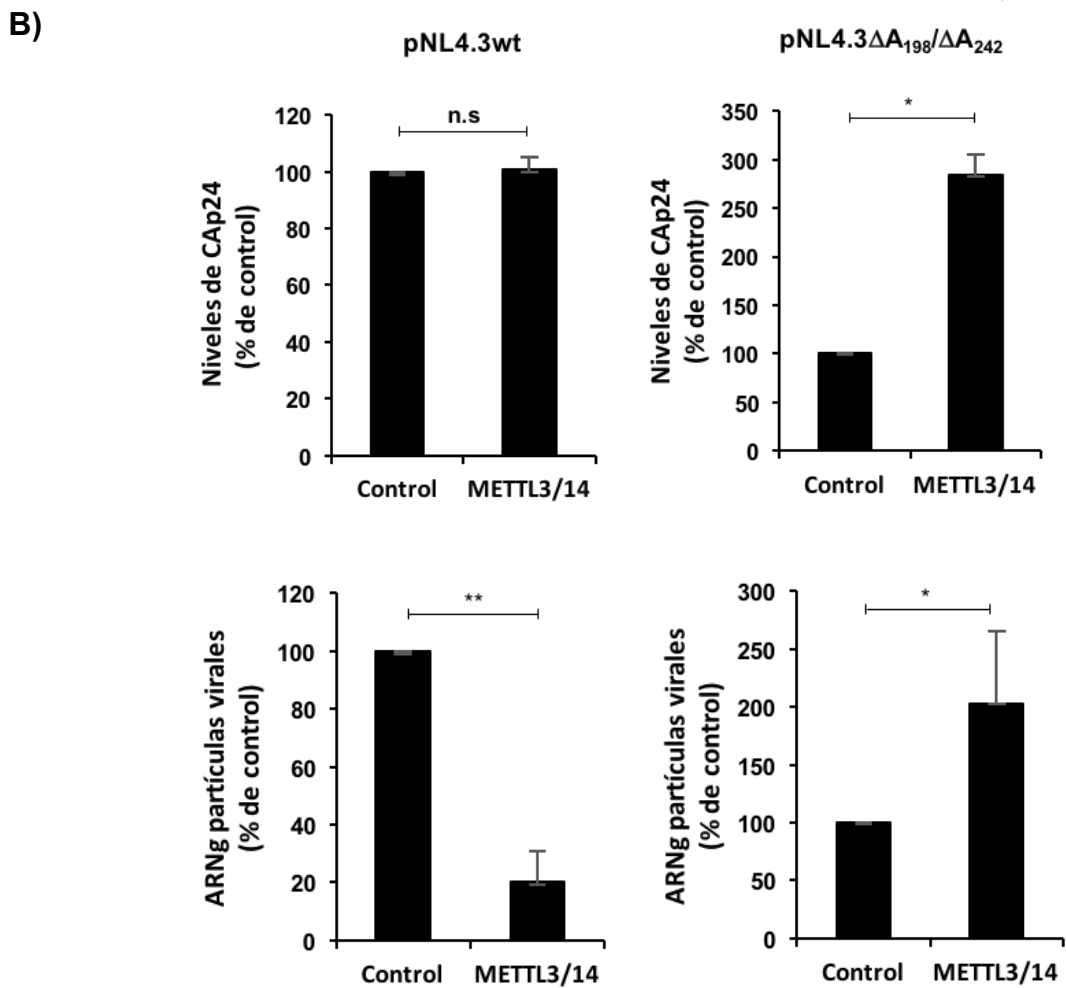
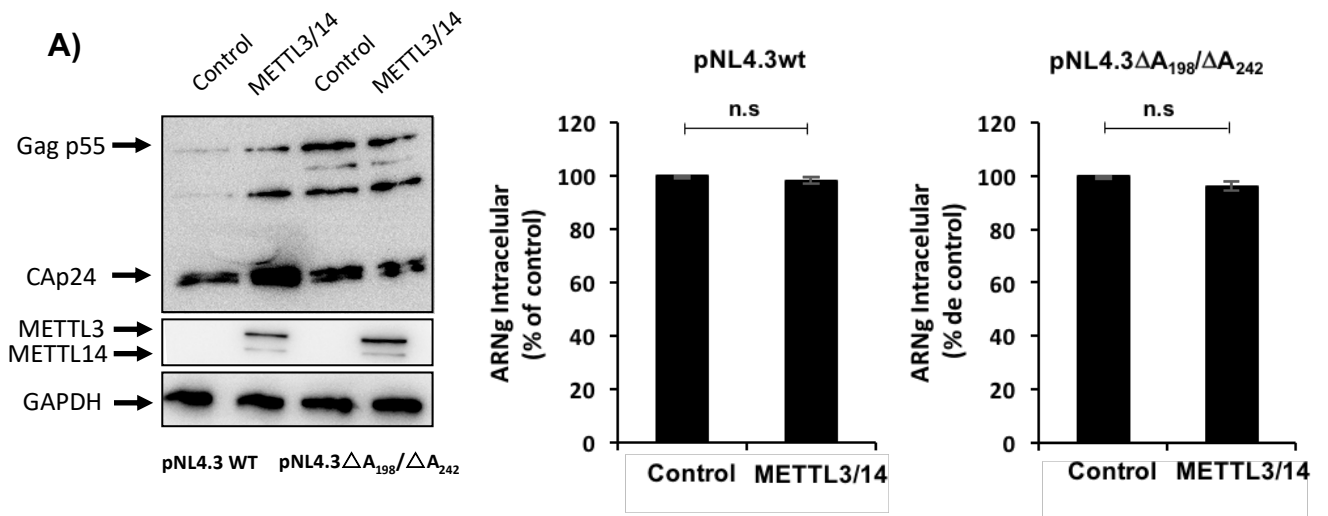
**Figura 22: Impacto de la deleción simple de  $A_{198}$  y  $A_{242}$  en el empaquetamiento del ARNg.**

Células HEK293T fueron transfectadas con el vector pNL4.3 (izquierda) o pNL4.3- $\Delta A_{198}$  (panel del medio) o pNL4.3- $\Delta A_{242}$  (derecha), pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTL3 y pCDNA-Flag-METTL14. El vector pCDNA-d2EGFP fue usado como control. 24 hpt el sobrenadante fue recuperado y las partículas virales fueron concentradas mediante una ultracentrifugación. Las partículas virales fueron analizadas mediante un ELISA anti-CAP24 (panel de arriba) y mediante un RT-qPCR (panel de abajo). Los niveles de ARNg empaquetados (por equivalentes de Gag) fueron normalizados respecto del control. Se muestra el resultado de tres experimentos independiente. Se realizó una prueba T-test; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , n.s; no significativo.



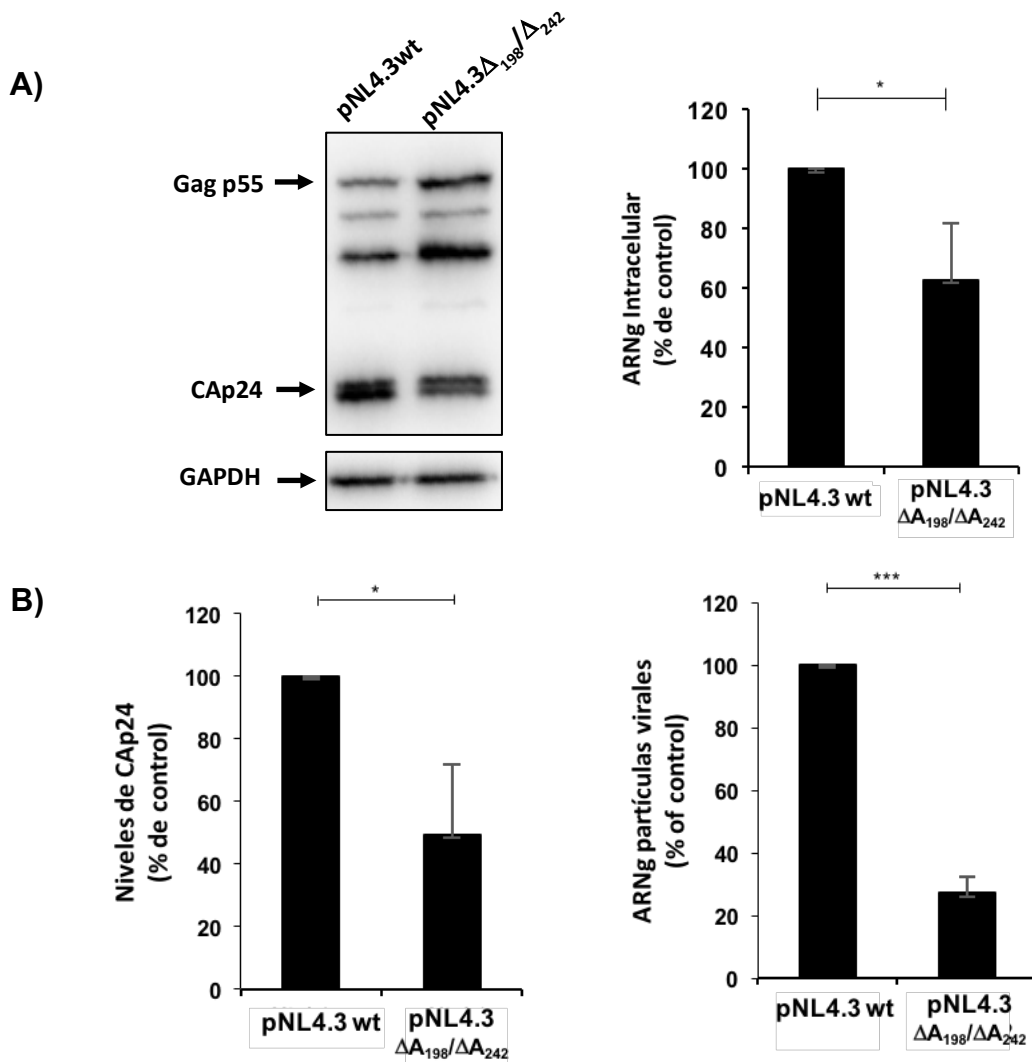
## **La ausencia de ambas adenosinas interfiere la regulación del empaquetamiento del ARNg en la partícula viral**

Dado que no observamos una reversión de la disminución del empaquetamiento observado al sobreexpresar las metiltransferasas, cuando ambas adenosinas están ausentes por separado, quisimos evaluar el impacto de la ausencia de ambas en la misma molécula de ARNg. Para esto se analizó el impacto de la sobreexpresión del complejo METTL3/14, en el provirus pNL4.3 silvestre y con la doble delección (pNL4.3  $\Delta A_{198}/\Delta A_{242}$ ), en los niveles de ARNg y Gag intracelular además del ARNg y Gag en partículas, como se describió en la sección materiales y métodos. De manera interesante, se pudo observar que el provirus con la doble delección pierde el efecto positivo en la síntesis de Gag observado en la condición silvestre y no presenta cambios en los niveles de ARNg intracelular al igual que el provirus sin las deleciones (Figura 23A). Adicionalmente, se puede ver que, en ausencia de ambas adenosinas, la sobreexpresión de METTL3/14 induce un aumento en los niveles de CAp24 liberados a diferencia de la condición silvestre e interesantemente conlleva un aumento en los niveles de ARNg empaquetados revirtiendo completamente el efecto negativo de las metiltransferasas observado cuando ambas adenosinas están presentes (Figura 23B). Estos resultados sugieren que las adenosinas  $A_{198}$  y  $A_{242}$  participan en la regulación mediada por  $m^6A$  observada previamente.



**Figura 23: Impacto de la doble delección de A<sub>198</sub> y A<sub>242</sub> en el empaquetamiento del ARNg mediado por m<sup>6</sup>A.** Células HEK293T fueron co-transfectadas con el vector proviral pNL4.3 o pNL4.3ΔA<sub>198</sub>/ΔA<sub>242</sub> junto con el vector pCMV-VSVg, pCDNA-Flag-METTTL3 y pCDNA-Flag-METTTL14. Como control se utilizó el vector pCDNA-d2EGFP. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento CAp24) mediante un WB y los niveles de ARNg intracelular mediante un RT-qPCR. B) Los niveles de CAp24 y ARNg en las partículas virales mediante un ELISA anti-p24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control, y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \*p<0,05; \*\*p<0,01; n.s; no significativo.

Luego, se investigó el rol de ambas adenosinas en el metabolismo del ARNg. Para esto, se determinaron y compararon la síntesis de Gag, los niveles de ARNg intracelulares, la producción de partículas y el empaquetamiento del ARNg entre el provirus silvestre y la doble delección, sin sobreexpresar las metiltransferasas. Estos resultados revelan que el provirus ΔA<sub>198/242</sub> produce más Gag que el provirus silvestre, pero posee menos ARNg intracelular (Figura 24A). Sin embargo, a pesar de que acumula más Gag intracelular libera significativamente menos partículas virales y disminuye considerablemente el empaquetamiento del ARNg (Figura 24B). Estos resultados confirman la relevancia de la A<sub>198</sub> y la A<sub>242</sub> en el empaquetamiento del ARNg en la partícula viral y se condicen con lo observado en la literatura donde se ha visto que la ausencia de ambas adenosinas disminuye la infectividad de las partículas virales de VIH-1 (Li Wu, 2018), confirmando la relevancia de ambas adenosinas en la infección viral.

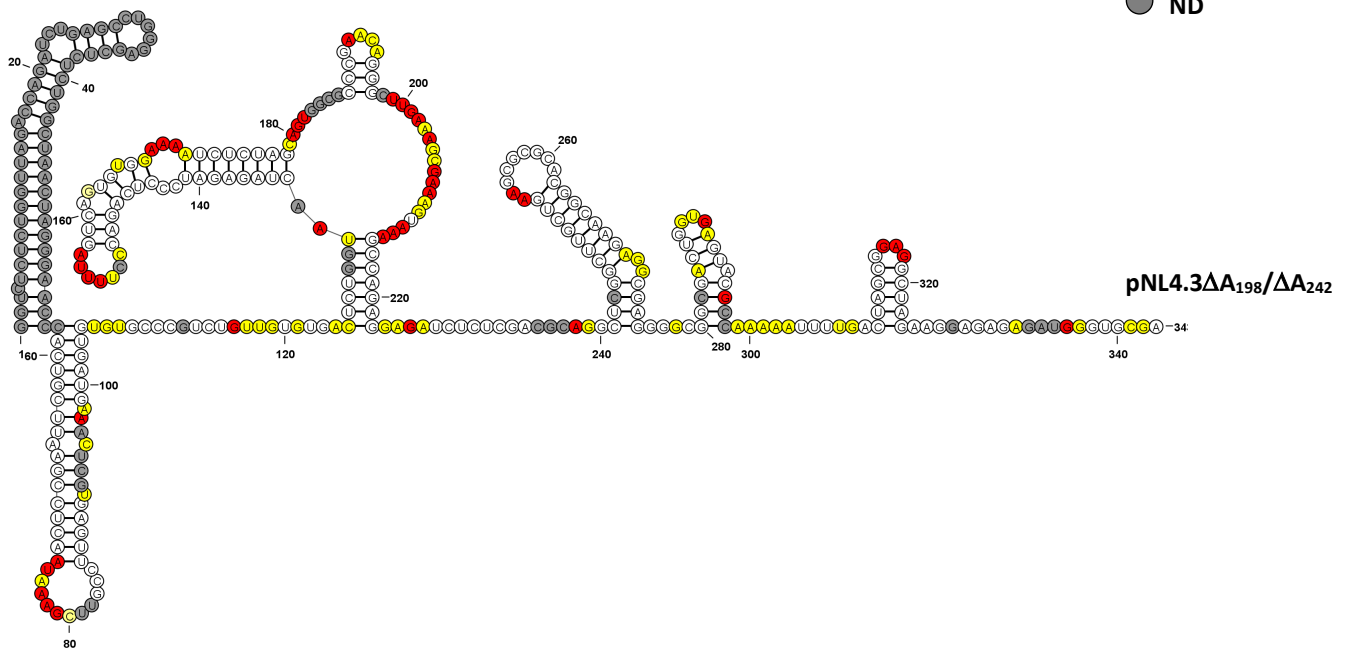
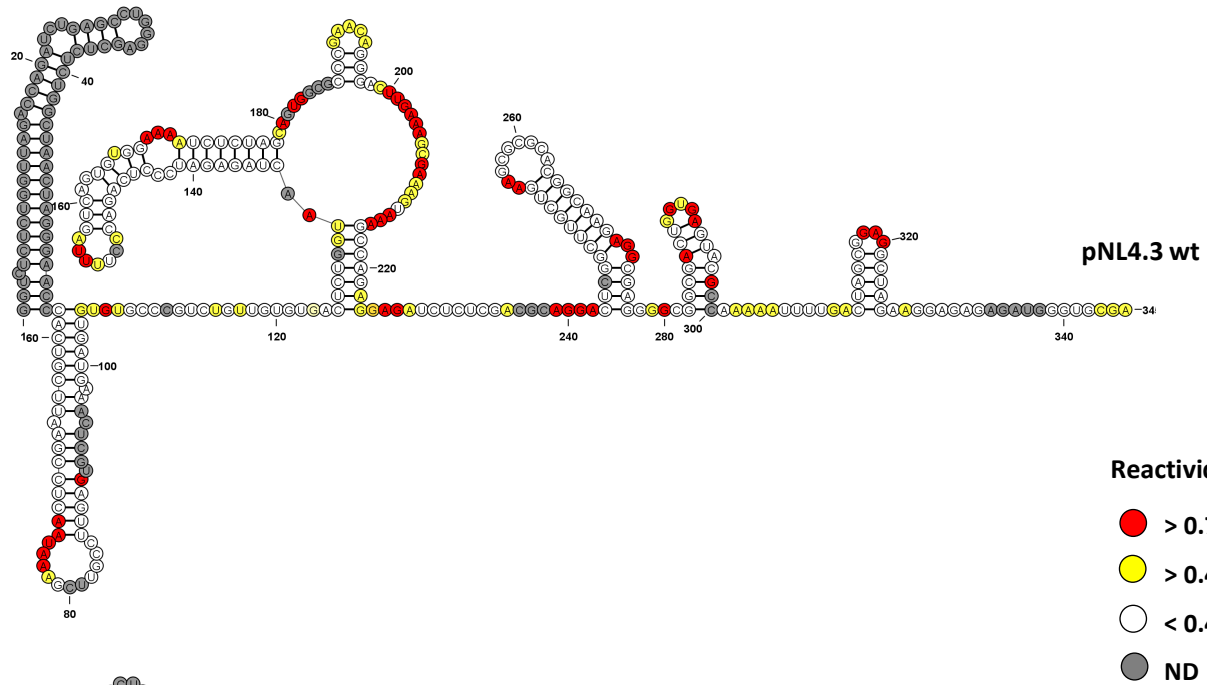


**Figura 24: Impacto de la doble delección de  $A_{198}$  y  $A_{242}$  en el empaquetamiento del ARNg.** Células HEK293T fueron co-transfectadas con el vector proviral pNL4.3 o pNL4.3 $\Delta A_{198}/\Delta A_{242}$  junto con el vector pCMV-VSVg. 24 hpt se analizaron: A) Los niveles de Gag (y sus productos de procesamiento CAP24) mediante un WB y los niveles de ARNg intracelular mediante un RT-qPCR. B) Los niveles de CAP24 y ARNg en las partículas virales mediante un ELISA anti-p24 y un RT-qPCR, respectivamente. Los resultados fueron normalizados respecto del control, y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Se realizó una prueba T-test; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**La ausencia de ambas adenosinas no altera la estructura secundaria de la 5'-UTR del ARNg *in vitro*.**

Entendiendo que el efecto en el empaquetamiento del ARNg observado puede estar dado porque la ausencia de ambas adenosinas altera la estructura de la 5'-UTR del ARNg de VIH-1 es que evaluamos estos posibles cambios mediante la técnica SHAPE-CE (Acilación selectiva de Hidroxilo 2' analizada por Extension de Partidores) en colaboración con el Dr. Bruno Sargueil (Université de Paris Descartes, Francia), como se describe en la sección materiales y métodos. Para esto se realizó una transcripción *in vitro* del 5'-UTR del provirus silvestre y con la doble delección. Posteriormente, los transcritos fueron modificados con el reactivo SHAPE 1M7, al igual que en el SHAPE-MaP, formando aductos con los nucleótidos expuestos. Como control, una fracción equivalente de la muestra se trató con DMSO. Luego los ARN modificados y control fueron sometidos a una transcripción reversa con partidores específicos para la región 5'-UTR, deteniéndose la transcripción cuando hay aductos presentes. Los ADNc fueron resueltos en un secuenciador CEQ-8000 (Beckman Coulter). Los análisis fueron realizados por el Dr. Bruno Sargueil quien utilizó el programa *QuSHAPE* y el programa *VaRNA* para predecir el modelo estructural de la 5'-UTR en ambas condiciones. Las diferencias de reactividades se evaluaron entre el ARNg silvestre y la doble delección, las cuales se observan en el modelo de estructura secundaria de la figura 25. Los nucleótidos con reactividad SHAPE mayor a 0,7 y mayor a 0,4 son considerados alta y moderadamente reactivos, respectivamente. Diferencias menores a 0,4 no reactivos y ND no determinados; siendo reactivos aquellos nucleótidos que fueron modificados con 1M7. De este experimento, observamos que la ausencia de las adenosinas 198 y 242 no altera la estructura de la 5'-UTR del ARNg (Figura 25), indicando que el impacto

observado en el empaquetamiento del ARNg no está dado por cambios en el plegamiento de la 5'-UTR del ARN viral inducidos por la doble deleción, pudiendo ser explicado por una disminución de la interacción del ARNg con Gag, interfiriendo así en el empaquetamiento de este.



**Figura 25: La doble delección de las adenosinas 198 y 242 no altera la estructura de la 5'-UTR del ARNg.** Se evaluó la estructura del 5'-UTR de transcritos *in vitro* del ARNg de VIH-1 wt (arriba) y con la ausencia de las adenosinas 198 y 242 (abajo) mediante un SHAPE-CE, como se describe en la sección materiales y métodos. Los nucleótidos con reactividad SHAPE mayor a 0,7 y mayor a 0,4 son considerados alta y moderadamente reactivos, respectivamente. Diferencias menores a 0,4 no reactivos y ND no determinados. Los resultados fueron analizados con el programa QuSHAPE y el programa VarNA fue utilizado para predecir el modelo estructural.

En su conjunto estos resultados sugieren que las adenosinas 198 y 242, son al menos, dos de las adenosinas que participan en la regulación del empaquetamiento del ARNg de VIH-1.

## Discusión

Durante el ciclo replicativo, el ARNg de VIH-1 cumple más de una función en el citoplasma celular siendo el ARN mensajero que será traducido para codificar Gag y Gag-Pol y el genoma que será empaquetado en la nueva partícula viral. A diferencia de un retrovirus simple como MLV, en VIH-1 se ha propuesto que el ARNg existe como una sola población que puede cumplir ambas funciones (Melinda Butsch and Boris-lawrie 2002; Andrew Lever 2000). Es interesante notar que un reporte reciente indicó que a pesar de que el ARNg puede cumplir ambas funciones de manera indistinta, este existe como dos poblaciones dinámicas (Chen et al. 2020). Se sabe que Gag es clave en el empaquetamiento, donde sus diversos dominios participan en las diferentes etapas de este proceso. En una etapa inicial, Gag selecciona el ARNg que será empaquetado mediante la interacción entre su dominio NC y elementos de ARN específicos presentes en la 5'-UTR del ARN viral (Mailler et al. 2016b). Estudios estructurales *in vitro* indicaron que un cambio estructural en la 5'-UTR podría explicar esta coordinación, sin embargo, estudios estructurales *ex vivo* e *in virio* no pudieron detectar estas diferencias. Recientemente, un reporte indicó que la presencia de Cap1G, Cap2G o Cap3G al inicio del ARNg regularían la estructura del 5'-UTR y en consecuencia su función como mensajero o como genoma, sugiriendo que la decisión de que el ARNg sea traducido o empaquetado ocurriría a nivel transcripcional. Estos antecedentes han entregado importantes aportes que permiten ir dilucidando como ocurre la decisión de que el ARNg sea empaquetado, sin embargo, los mecanismos moleculares asociados son aún inciertos. Considerando el rol emergente de las modificaciones químicas reversibles en definir el destino de los ARNm celulares y ARN



virales incluyendo el ARNg de VIH-1 nos preguntamos: ¿Puede la m<sup>6</sup>A ser una marca reversible en el ARNg que defina su destino como mensajero o como genoma?

En el presente trabajo de tesis hemos observado que la metilación/desmetilación de las A<sub>198</sub> y A<sub>242</sub> presentes en la 5'-UTR son importantes para la regulación del empaquetamiento del ARNg, donde la ausencia de esta modificación, mediada por la desmetilasa de RNA celular FTO, favorece la selección del genoma viral para ser incorporado en las partículas. De manera similar, aunque por un mecanismo diferente, se ha reportado que en el virus de la Hepatitis C (HCV), un virus que replica en el citoplasma, el ARN viral que carece de m<sup>6</sup>A es selectivamente empaquetado (Gokhale et al. 2016). Consistente con lo reportado en la literatura, donde se observa que la metilación del ARN tiene un impacto positivo en la síntesis de las proteínas virales (Kennedy et al. 2016; Lichinchi, Gao, et al. 2016; Tirumuru et al. 2016), nosotros observamos que la presencia de m<sup>6</sup>A inducida por la sobreexpresión de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 induce un aumento en los niveles de Gag. Es importante destacar que no sabemos si el aumento observado en Gag es por un aumento en los niveles de traducción o de la estabilidad del ARN destinados a ser traducidos. Sin embargo, al analizar las partículas virales, observamos que la presencia de m<sup>6</sup>A disminuye los niveles de ARNg empaquetados, a pesar de no disminuir los niveles de partículas liberadas, indicando que la presencia de m<sup>6</sup>A interfiere en el empaquetamiento del ARN viral. Esta observación fue ratificada al observar el efecto contrario ya sea silenciando METTL3 o sobreexpresando la desmetilasa FTO. Estudios futuros se requieren para evaluar si las partículas, al sobreexpresar el complejo METTL3/14, se encuentran vacías o contienen otros ARNs

virales o celulares que suplan el rol de soporte estructural que juega el ARNg dentro de la partícula.

Los resultados obtenidos son consistentes con lo observado en nuestros datos de m<sup>6</sup>A-seq, donde el ARNg que se encuentra empaquetado en la nueva partícula viral es aquel que no posee la modificación en la 5'-UTR. Análisis de la sobreexpresión de la desmetilasa FTO muestran que la disminución en los niveles de m<sup>6</sup>A resulta en un efecto opuesto al observado al sobreexpresar METTL3/14 (y por ende similares al efecto observado al silenciar METTL3), induciendo un aumento en los niveles de ARNg empaquetados, indicando que la regulación del empaquetamiento mediada por m<sup>6</sup>A es un proceso dinámico que puede ser coordinado por la metilación/desmetilación de adenosinas, donde la presencia de m<sup>6</sup>A parece promover el uso del ARNg como ARNm, pero interfiere con su incorporación en la nueva partícula viral.

Indagando en los mecanismos asociados a esta regulación observamos que la metiltransferasa METTL3 interacciona con el ARNg en el núcleo de la célula lo que es consistente con la metilación ocurriendo a nivel co-transcripcional (Ke et al. 2017; Salditt-Georgieff et al. 1976; Williams et al. 2019; Zaccara et al. 2019). Además, vimos que solo la presencia de m<sup>6</sup>A mediada por la sobreexpresión de METTL3/14 puede inducir cambios estructurales en la 5'-UTR que podrían ayudar a explicar la disminución en la interacción de Gag con el ARNg observada. Esta disminución podría explicar, además, la disminución tanto de la señal del ARNg en la membrana plasmática como del empaquetamiento del ARNg a pesar de existir un aumento en los niveles de Gag intracelular. Es posible que el ARNg no interaccione con Gag al estar

metilado lo que trae como consecuencia que no pueda ser empaquetado en la nueva partícula. Interesantemente, nuestros datos de SHAPE-MaP muestran un cambio estructural en la 5'-UTR, donde a pesar de no verse alteradas las estructuras de dominios importantes para el empaquetamiento, como DIS (SL1) o SL3, sí se puede ver cambios estructurales en regiones como el PBS e incluso se observa que las adenosinas 198 y 242 ya no se encuentran expuestas al sobreexpresar las metiltransferasas. Mediante un análisis de CLIP-seq, se reportó que Gag muestra sitios de unión en toda la 5'-UTR (Kutluay et al. 2014), los que pueden verse enmascarados por estos cambios estructurales. Interesantemente, la región que ve alterada su estructura coincide con unos de los sitios observados en el CLIP-seq mencionado y con la región de metilación observada en los datos de m<sup>6</sup>A-seq generados por el laboratorio. Estos resultados de sobreexpresión de metiltransferasas, en su conjunto, sugieren que una posible explicación es que los cambios estructurales observados, inducidos por la presencia de m<sup>6</sup>A, conlleven una disminución en la interacción del ARNg con Gag (observado por ISH-PLA) y en consecuencia una disminución en su empaquetamiento.

Adicional a los cambios estructurales observados, otra posible explicación puede ser que la presencia de m<sup>6</sup>A disminuya la afinidad de Gag por el ARNg, para promover su empaquetamiento, no necesariamente con un efecto en traducción. Por otro lado, otra explicación posible es que las proteínas lectoras de m<sup>6</sup>A pertenecientes a la familia YTH interaccionen con el ARNg metilado para favorecer su traducción e impidan que Gag pueda unirse. Esta es una explicación viable ya que se ha reportado *in vitro* que las proteínas YTHs interaccionan preferentemente con el ARNg que se encuentra

metilado respecto del que no se encuentra modificado y se ha observado que forman un complejo celular con Gag y el ARNg (W. Lu et al. 2018). Para seguir dilucidando los mecanismos moleculares asociados a esta regulación sería interesante evaluar la dimerización del ARNg producido en sobreexpresión de METTL3/METTL14 y evaluar la estructura del 5'-UTR del ARNg que se encuentra empaquetado y/o la estructura del ARNg cuando la expresión de METTL3 se encuentra silenciada. Adicional a la interacción del ARNg con Gag resultaría interesante evaluar el impacto de esta modificación en la interacción con el tRNA<sup>Lys3</sup> ya que este interactúa con la región PBS y es selectivamente incorporado en las partículas (Kleiman, Halwani, and Javanbakht 2004). Además, la unión del tRNA<sup>Lys3</sup> favorece la dimerización del ARNg *in vitro*, paso clave para que el ARNg se empaquete (Seif, Niu, and Kleiman 2013).

Por otro lado, en este trabajo de tesis observamos que Gag forma un complejo con la desmetilasa FTO en el núcleo e incluso observamos que Gag puede favorecer la desmetilación del ARNg. Juntos, estos resultados sugieren que Gag interacciona con FTO en el núcleo celular para promover la desmetilación del ARNg, proceso necesario para que este sea empaquetado. Resulta interesante que Gag se encuentre en el núcleo de la célula asociada a FTO, sin embargo, estudios han reportado que Gag puede estar presente en el núcleo celular, aunque esta posibilidad sigue siendo debatida (Lochmann et al. 2013; Maldonado et al. 2020; Yu et al. 2016). Por otro lado, puede resultar contradictorio observar que Gag no interacciona con el ARNg metilado para encapsularlo, pero si pudiese modular su desmetilación. Como se mencionó en la sección resultados, sería interesante evaluar si ocurre una interacción directa entre el ARNg metilado y Gag, y por otro lado analizar si la desmetilación del ARNg

favorecida por Gag, sería modulado por el dominio NC p7, que es el dominio que interacciona con el ARNg para encapsularlo.

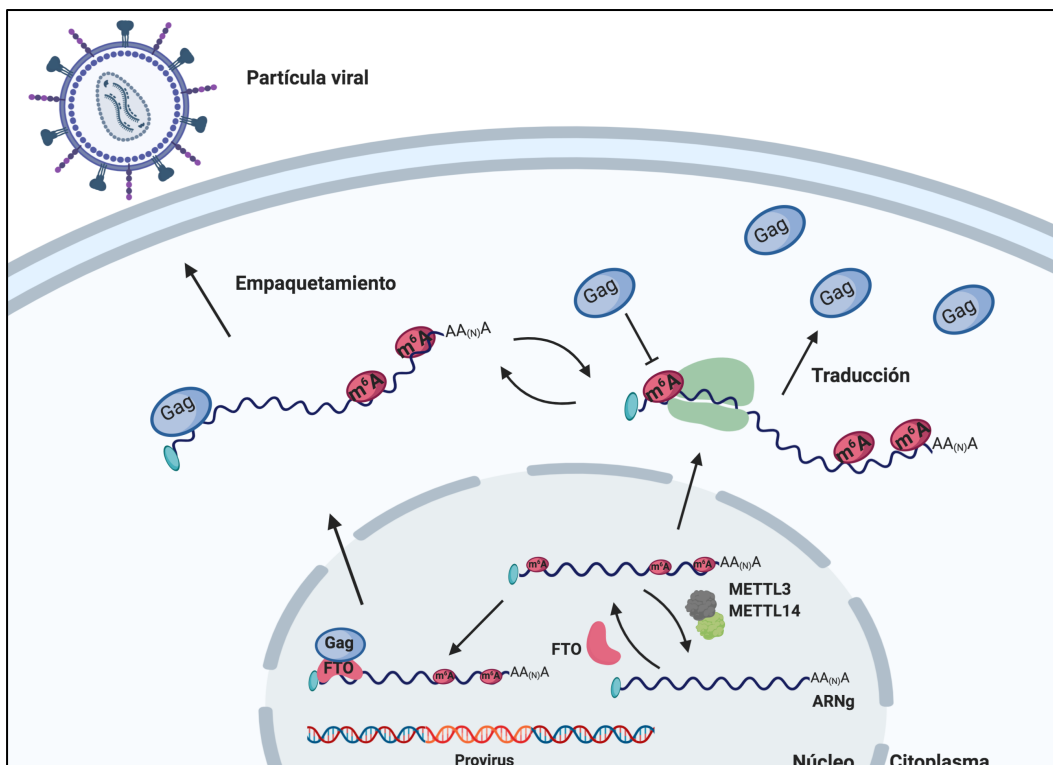
Los resultados de m<sup>6</sup>A-seq mencionados en los antecedentes, al igual que lo reportado en la literatura (Kennedy et al. 2016; Lichinchi, Zhao, et al. 2016; Tirumuru et al. 2016), indican que hay tres picos de metilación a lo largo del ARNg que se encuentra en la célula (5'-UTR, RRE y 3'-UTR), perdiéndose el peak de metilación de la 5'-UTR en el ARNg empaquetado. El análisis bioinformático predijo que las posibles adenosinas que podrían estar metiladas en la región 5'-UTR corresponden a la adenosina 198 y la adenosina 242, que se encuentran en un contexto favorable de metilación (DRACH) y en regiones de hebra simple. Interesantemente, estas adenosinas se encuentran dentro del pico de metilación, observado en el m<sup>6</sup>A-seq, que abarca desde el nucleótido 80 al 283. La adenosina 198 se encuentra en la región PBS, región donde ocurre la interacción con el tRNA<sup>Lys3</sup> (esencial para que ocurra la transcripción reversa), y ambas adenosinas se encuentran en un dominio de unión de Gag identificado por CLIP-seq. Adicionalmente, un reporte reciente indicó que ambas adenosinas son importantes para el ciclo viral, donde la ausencia de ellas conlleva la producción de partículas menos infectivas (W. Lu et al. 2018). Al analizar el provirus con la doble delección de estas adenosinas observamos que este, a pesar de acumular más Gag en la célula que en la condición silvestre, disminuye los niveles de CAp24 liberados y de ARNg empaquetados, sugiriendo que estas adenosinas son claves en el empaquetamiento del ARNg, y que este efecto no está dado porque la ausencia de ambas adenosinas conlleve un cambio en la estructura del 5'-UTR, como se observó en nuestros resultados de SHAPE. Al inducir la metilación mediada por el complejo

METTL3/14, observamos que la ausencia de ambas adenosinas juntas (pero no de forma individual) induce un aumento en los niveles de CAp24 liberados y un aumento en los niveles de ARNg empaquetados, a diferencia de lo observado en la condición silvestre, siendo la mutante con la doble delección resistente al efecto observado por la sobreexpresión de las metiltransferasas. Esto sugiere que el estado de metilación/desmetilación de la A<sub>198</sub> y la A<sub>242</sub> es importante en la regulación del empaquetamiento del ARNg mediada por m<sup>6</sup>A. Estos resultados son consistentes con lo esperado ya que, como se mencionó, la adenosina 198 se encuentra en la región donde ocurre la interacción con el tRNA<sup>Lys3</sup> y ambas adenosinas se encuentran en dominios de unión a Gag, interacción que, además, se ve interferida al sobreexpresar las metiltransferasas. Adicional a lo observado, podría ser interesante analizar otros parámetros que son fundamentales en el empaquetamiento del ARNg, como la dimerización del ARNg en ambas condiciones o analizar si la sobreexpresión de las metiltransferasas induce los mismos cambios estructurales (observados en la condición silvestre) en el provirus con la doble delección. Para corroborar que la desmetilación de estas dos adenosinas, mediada por FTO, es necesaria para que el ARNg sea seleccionado por Gag y empaquetado sería interesante analizar el impacto de la sobreexpresión de la desmetilasa FTO o el silenciamiento de METTL3 en el empaquetamiento del ARNg con la doble delección. Es importante destacar que no necesariamente son las únicas adenosinas que participan en esta regulación, pero con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podemos concluir que al menos son importantes. Sin duda hay detalles del mecanismo aun desconocidos, pero los resultados presentados en esta tesis nos sugieren que un aumento en los niveles de ARNg metilados induce un cambio en la estructura del 5'-UTR, que puede ser

responsable de una disminución de la interacción del ARNg con Gag, resultando finalmente en una disminución en los niveles de ARNg empaquetado. Dado que se ha reportado que adición de m<sup>6</sup>A en los ARNs ocurre a nivel co-transcripcional, es posible que la regulación del empaquetamiento mediada por m<sup>6</sup>A presentada en este trabajo, pueda ocurrir simultáneamente a la regulación mediada por la heterogeneidad en el uso del sitio de inicio de la transcripción (Brown et al. 2020; Siarhei Kharytonchyk et al. 2016; Masuda et al. 2015) o quizás puede ser un paso de regulación posterior, o alternativo, donde ambos coinciden en que la decisión del ARNg de ser empaquetado es una decisión que se toma a nivel nuclear y que conlleva cambios en la estructura del 5'-UTR. Sería interesante evaluar el estado de metilación de los ARNs <sup>Cap1G</sup>, <sup>Cap2G</sup> o <sup>Cap3G</sup> y analizar la presencia de estos ARNs en las partículas virales, como una manera de evaluar si hay alguna conexión entre ambos mecanismos. En este sentido, el uso de secuenciación directa de ARN de largo completo mediante la tecnología *Oxford Nanopore* permitiría determinar si estas adenosinas se encuentran metiladas o no en estas 3 subpoblaciones de ARNg (Lorenz et al. 2020; Workman et al. 2019).

Los resultados presentados en esta tesis permiten concluir que la presencia de m<sup>6</sup>A en la 5'-UTR interfiere en la interacción de Gag con el ARNg y, por ende, en el empaquetamiento en la nueva partícula viral, confirmando la hipótesis planteada (Figura 26). Los resultados indican que esto podría estar explicado por cambios estructurales en la 5'-UTR inducidos por la presencia de las adenosinas metiladas. Adicionalmente, este trabajo sugiere que la A<sub>198</sub> y la A<sub>242</sub>, son al menos, dos de las adenosinas responsables de esta regulación mediada por m<sup>6</sup>A. Además, de los

resultados generados en esta tesis se puede concluir que Gag interacciona con FTO en el núcleo de las células, y modula el estado de metilación del ARNg, sugiriendo que Gag podría participar en la regulación de la desmetilación del ARNg para que este sea seleccionado para empaquetarse en la nueva partícula viral.



**Figura 26: Modelo propuesto del impacto de m<sup>6</sup>A en el empaquetamiento del ARNg de VIH-1.** Según los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se propone que el ARNg es metilado por el complejo metiltransferasa METTL3/14 en el núcleo celular, cuya metilación interfiere la interacción del ARNg con Gag y su posterior empaquetamiento. La proteína estructural Gag interacciona con FTO en el núcleo. Se sugiere que esta interacción promueve la desmetilación del ARNg. El ARNg no metilado es seleccionado por Gag para ser empaquetado en la nueva partícula viral.

Sin duda, faltan experimentos que permitan seguir dilucidando los mecanismos moleculares asociados a esta regulación, sin embargo, la tesis de doctorado



presentada en este escrito entrega un aporte importante en esta área que busca dilucidar como se regula que el ARNg sea seleccionado para empaquetarse, presentando evidencia de que la metilación y desmetilación de residuos de adenosina sería uno de los componentes que participan en esta regulación, sugiriendo que el ARNg de VIH-1 podría existir, al menos como dos poblaciones, con diferentes patrones de metilación, donde el ARNg que carece de esta metilación en la 5'-UTR será preferentemente seleccionado por Gag para empaquetarse.

## Conclusiones

- La metilación de adenosinas, mediada por METTL3/14, interfiere en el empaquetamiento del ARNg en la nueva partícula viral.
- La ausencia de m<sup>6</sup>A, mediada por FTO, favorece el empaquetamiento del ARNg en la nueva partícula viral.
- METTL3 interacciona con el ARNg en el núcleo celular.
- La presencia de m<sup>6</sup>A, mediada por METTL3/14, induce cambios estructurales en la 5'-UTR del ARNg.
- La presencia de m<sup>6</sup>A, mediada por METTL3/14, disminuye la interacción del ARNg con Gag.
- FTO desmetila el ARNg de VIH-1.
- FTO interacciona con Gag en el núcleo celular.
- Gag disminuye los niveles de ARNg metilados.
- Las adenosinas 198 y 242 participan en la regulación del empaquetamiento mediada por m<sup>6</sup>A.

## Bibliografía

- Abbink, Truus E.M., and Ben Berkhout. 2003. "A Novel Long Distance Base-Pairing Interaction in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rna Occludes the Gag Start Codon." *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 11601–11.
- Abbink, Truus E.M. et al. 2005. "The HIV-1 Leader RNA Conformational Switch Regulates RNA Dimerization but Does Not Regulate MRNA Translation." *Biochemistry* 44(25): 9058-66.
- Agarwala, Sudeep D, et al. 2012. "RNA Methylation by the MIS Complex Regulates a Cell Fate Decision in Yeast." 8(6): 1–13.
- Alarcón, Claudio R. et al. 2015. "N6-Methyladenosine Marks Primary MicroRNAs for Processing." *Nature* 519(7544): 482–85.
- Aldovini, A, and R A Young. 1990. "Mutations of RNA and Protein Sequences Involved in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Packaging Result in Production of Noninfectious Virus." *Journal of Virology* 64(5): 1920–26.
- Amorim, Raquel et al. 2014. "HIV-1 Transcripts Use Ires-Initiation under Conditions Where Cap-Dependent Translation Is Restricted by Poliovirus 2A Protease." *PLoS ONE* 9(2).
- Anderson, Emma C., and Andrew M. L. Lever. 2006. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Modulates Its Own Translation." *Journal of Virology* 80(21).
- Arrigo, S. J., and I. S.Y. Chen. 1991. "Rev Is Necessary for Translation but Not Cytoplasmic Accumulation of HIV-1 Vif, Vpr, and Env/Vpu 2 RNAs." *Genes and Development* 5(5): 808–19.
- Arts, Eric J., and Stuart F.J.Le Grice. 1997. "Interaction of Retroviral Reverse Transcriptase with Template–Primer Duplexes during Replication." In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 58: 339–93.
- Barré-Sinoussi, F et al. 1983. "Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 868–71.
- Barrera, Aldo et al. 2020. "Cap-Independent Translation Initiation of the Unspliced RNA of Retroviruses." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1863(9).
- Van Bel, Nikki et al. 2014. "A Short Sequence Motif in the 5' Leader of the HIV-1 Genome Modulates Extended RNA Dimer Formation and Virus Replication." *Journal of Biological Chemistry* 289(51): 35061–74.
- Berkhout, B. 1996. "Structure and Function of the Human Immunodeficiency Virus Leader

- RNA." *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 54: 1–34.
- Berkhout, B, and J L van Wamel. 1996. "Role of the DIS Hairpin in Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of virology* 70(10): 6723–32.
- Berkhout, Ben, Kelly Arts, and Truus E.M. Abbink. 2011. "Ribosomal Scanning on the 5'-Untranslated Region of the Human Immunodeficiency Virus RNA Genome." *Nucleic Acids Research* 39(12): 5232–44.
- Berkowitz, R D, J Luban, and S P Goff. 1993. "Specific Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein and Nucleocapsid Protein to Viral RNAs Detected by RNA Mobility Shift Assays." *Journal of Virology* 67(12): 7190–7200.
- de Bisschop, Grégoire et al. 2019. "HIV-1 GRNA, a Biological Substrate, Uncovers the Potency of DDX3X Biochemical Activity." *Biochimie* 164: 83–94.
- Boeras, I. et al. 2017. "The Basal Translation Rate of Authentic HIV-1 RNA Is Regulated by 5'UTR Nt-Pairings at Junction of R and U5." *Scientific Reports* 7(1): 6902.
- Brasey, Ann et al. 2003. "The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G2/M Phase of the Cell Cycle." *Journal of Virology* 77(7): 3939–49.
- de Breyne, Sylvain, and Théophile Ohlmann. 2019. "Focus on Translation Initiation of the HIV-1 mRNAs." *International Journal of Molecular Sciences* 20(1): 101.
- Brown, Joshua D. et al. 2020. "Structural Basis for Transcriptional Start Site Control of HIV-1 RNA Fate." *Science* 368(6489): 413–17.
- Busan, Steven, and Kevin M. Weeks. 2018. "Accurate Detection of Chemical Modifications in RNA by Mutational Profiling (MaP) with ShapeMapper 2." *RNA* 24(2): 143–48.
- Butsch, M, and K Boris-Lawrie. 2000. "Translation Is Not Required To Generate Virion Precursor RNA in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected T Cells." *Journal of virology* 74(24): 11531–37.
- Butsch, Melinda, and Kathleen Boris-lawrie. 2002. "Destiny of Unspliced Retroviral RNA: Ribosome and/or Virion ?" *Journal of Virology* 76(7): 3089–94.
- Campbell, S, and V M Vogt. 1995. "Self-Assembly in Vitro of Purified CA-NC Proteins from Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of virology* 69(10): 6487–97.
- Campbell, Stephen, and Alan Rein. 1999. "In Vitro Assembly Properties of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Lacking the P6 Domain." *Journal of Virology* 73(3): 2270–79.
- Chen, Jianbo et al. 2009. "High Efficiency of HIV-1 Genomic RNA Packaging and

- Heterozygote Formation Revealed by Single Virion Analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32): 13535–40.
- Chen, Jianbo et al. 2020. "Visualizing the Translation and Packaging of HIV-1 Full-Length RNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(11): 6145-6155.
- Chiu, Ing Ming et al. 1985. "Nucleotide Sequence Evidence for Relationship of AIDS Retrovirus to Lentiviruses." *Nature* 317(6035): 366–68.
- Choe, Junho et al. 2018. "MRNA Circularization by METTL3–EIF3h Enhances Translation and Promotes Oncogenesis." *Nature* 561(7724): 556–60.
- Cimarelli, Andrea et al. 2000. "Basic Residues in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Promote Virion Assembly via Interaction with RNA." *Journal of Virology* 74(7): 3046–57.
- Clavel, F, and J M Orenstein. 1990. "A Mutant of Human Immunodeficiency Virus with Reduced RNA Packaging and Abnormal Particle Morphology." *Journal of Virology* 64(10): 5230–34.
- Clever, J L, M L Wong, and T G Parslow. 1996. "Requirements for Kissing-Loop-Mediated Dimerization of Human Immunodeficiency Virus RNA." *Journal of virology* 70(9): 5902–8.
- Clever, Jared L., Daniel Miranda, and Tristram G. Parslow. 2002. "RNA Structure and Packaging Signals in the 5' Leader Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome." *Journal of Virology* 76(23): 12381–87.
- Cochrane, Alan W., Mark T. McNally, and Andrew J. Mouland. 2006. "The Retrovirus RNA Trafficking Granule: From Birth to Maturity." *Retrovirology* 3: 18.
- Cuceanu, Margareta et al. 2006. "Nucleic Acid Binding and Chaperone Properties of HIV-1 Gag and Nucleocapsid Proteins." *Nucleic Acids Research* 34(2): 593–605.
- Cullen, Bryan R. 2003. "Nuclear MRNA Export: Insights from Virology." *Trends in Biochemical Sciences* 28(8): 419–24.
- D'arc, M., L. Etienne, E. Delaporte, and M. Peeters. 2017. "Origin and Emergence of HIV/AIDS." In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases: Second Edition*, Elsevier Inc., 573–99.
- D'Souza, Victoria, and Michael F. Summers. 2005. "How Retroviruses Select Their Genomes." *Nature Reviews Microbiology* 3(8): 643–55.
- Damgaard, Christian Kroun, Helle Dyhr-Mikkelsen, and Jørgen Kjems. 1998. "Mapping the RNA Binding Sites for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Gag and NC Proteins within the Complete HIV-1 and -2 Untranslated Leader Regions." *Nucleic Acids*

- Research* 26(16): 3667–76.
- Darty, Kévin, Alain Denise, and Yann Ponty. 2009. “VARNA: Interactive Drawing and Editing of the RNA Secondary Structure.” *Bioinformatics* 25(15).
- Demirov, D. G., J. M. Orenstein, and E. O. Freed. 2002. “The Late Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 P6 Promotes Virus Release in a Cell Type-Dependent Manner.” *Journal of Virology* 76(1): 105-117.
- Dominissini, Dan, et al. 2012. “Topology of the Human and Mouse M6A RNA Methylomes Revealed by M6A-Seq.” *Nature* 485(7397): 201–6.
- Dorman, Nijsje, and Andrew Lever. 2000. “Comparison of Viral Genomic RNA Sorting Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), HIV-2, and Moloney Murine Leukemia Virus.” *Journal of Virology* 74(23): 11413–17.
- Du, Hao et al. 2016a. “Complex.” *Nature Communications* 7: 1–11.
- Du, Hao et al. 2016b. “YTHDF2 Destabilizes M6A-Containing RNA through Direct Recruitment of the CCR4–NOT Deadenylation Complex.” *Nature Communications* 7: 12626.
- Edupuganti, Raghu R et al. 2017. “N 6-Methyladenosine (m 6 A) Recruits and Repels Proteins to Regulate mRNA Homeostasis HHS Public Access Author Manuscript.” *Nat Struct Mol Biol* 24(10): 870–78.
- El-Wahab, Ekram W.Abd et al. 2014. “Specific Recognition of the HIV-1 Genomic RNA by the Gag Precursor.” *Nature Communications* 5: 4304.
- Frankel, Alan D., and John A.T. Young. 1998. “HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA.” *Annual Review of Biochemistry* 67: 1–25.
- Fray, Rupert G, and Gordon G Simpson. 2000. “ScienceDirect The Arabidopsis Epitranscriptome.” *Current Opinion in Plant Biology* 27: 17–21.
- Freed, Eric O. 2015. “HIV-1 Assembly, Release and Maturation.” *Nature Reviews Microbiology* 13(8): 484–96.
- Gendron, Karine et al. 2011. “The Activity of the HIV-1 IRES Is Stimulated by Oxidative Stress and Controlled by a Negative Regulatory Element.” *Nucleic Acids Research* 39(3): 902–12.
- Gentile, Massimo et al. 1994. “Determination of the Size of HIV Using Adenovirus Type 2 as an Internal Length Marker.” *Journal of Virological Methods* 48(1): 43–52.
- Geula, Shay et al. 2015. “M6A mRNA Methylation Facilitates Resolution of Naïve Pluripotency toward Differentiation.” *Science* 347(6225): 1002–6.
- Gokhale, Nandan S et al. 2016. “N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes

- Regulates Infection." *Cell host & microbe* 20(5): 654–65.
- Grewe, C., A. Beck, and H. R. Gelderblom. 1990. "Hiv: Early Virus-Cell Interactions." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 3(10): 965–74.
- Grozhiik, Anya V. et al. 2017. "Mapping M6A at Individual-Nucleotide Resolution Using Crosslinking and Immunoprecipitation (MiCLIP)." In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 55–78.
- Guerrero, Santiago et al. 2015. "Hiv-1 Replication and the Cellular Eukaryotic Translation Apparatus." *Viruses* 7(1): 199–218.
- Harrison, Geoffrey P. et al. 1998. "Functional Analysis of the Core Human Immunodeficiency Virus Type 1 Packaging Signal in a Permissive Cell Line." *Journal of Virology* 72(7): 5886–96.
- Helga-Maria, C., Marie-Louise Hammarskjöld, and David Rekosh. 1999. "An Intact TAR Element and Cytoplasmic Localization Are Necessary for Efficient Packaging of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA." *Journal of Virology* 73(5): 4127–35.
- Hendrix, Jelle et al. 2015. "Live-Cell Observation of Cytosolic HIV-1 Assembly Onset Reveals RNA-Interacting Gag Oligomers." *Journal of Cell Biology* 210(4): 629–46.
- Hill, M. K. et al. 2003. "The Dimer Initiation Sequence Stem-Loop of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Dispensable for Viral Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Journal of Virology* 77(15): 8329–35.
- Hirsch, Vanessa M. et al. 1989. "An African Primate Lentivirus (SIVsmclosely Related to HIV-2)." *Nature* 339(6223): 389–92.
- Houzet, Laurent et al. 2007. "HIV Controls the Selective Packaging of Genomic, Spliced Viral and Cellular RNAs into Virions through Different Mechanisms." *Nucleic Acids Research* 35(8): 2695–2704.
- Hsu, Phillip J et al. 2017. "Ythdc2 Is an N6-Methyladenosine Binding Protein That Regulates Mammalian Spermatogenesis." *Cell Research* 27(9): 1115–27.
- Hu, Wei Shau, and Stephen H. Hughes. 2012. "HIV-1 Reverse Transcription." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(10).
- Huthoff, Hendrik, and Ben Berkhout. 2001. "Two Alternating Structures of the HIV-1 Leader RNA." *RNA* 7(1): 143–57.
- Jackson, Richard J., Christopher U.T. Hellen, and Tatyana V. Pestova. 2010. "The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(2): 113–27.
- Jang, S K et al. 1988. "A Segment of the 5' Nontranslated Region of Encephalomyocarditis

- Virus RNA Directs Internal Entry of Ribosomes during in Vitro Translation." *Journal of Virology* 62(8): 2636–43.
- Jia, Guifang et al. 2011. "N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO." *Nature chemical biology* 7(12): 885–87.
- Jouvenet, Nolwenn et al. 2006. "Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly." *PLoS Biology* 4(12): 2296–2310.
- Jurczynszak, Denise et al. 2020. "HIV Protease Cleaves the Antiviral M6A Reader Protein YTHDF3 in the Viral Particle." *PLoS Pathogens* 16(2): e1008305.
- Kahvejian, A., G. Roy, and N. Sonenberg. 2001. "The mRNA Closed-Loop Model: The Function of PABP and PABP-Interacting Proteins in mRNA Translation." In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 66: 293–300.
- Karabiber, Fethullah, et al. 2013. "QuShape: Rapid, Accurate, and Best-Practices Quantification of Nucleic Acid Probing Information, Resolved by Capillary Electrophoresis." *RNA* 19(1): 63–73.
- Karn, Jonathan, and C. Martin Stoltzfus. 2012. "Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(2): a006916.
- Kasowitz, Seth D. et al. 2018. "Nuclear M6A Reader YTHDC1 Regulates Alternative Polyadenylation and Splicing during Mouse Oocyte Development." *PLoS Genetics* 14(5): e1007412.
- Ke, Shengdong et al. 2017. "M(6)A mRNA Modifications Are Deposited in Nascent Pre-mRNA and Are Not Required for Splicing but Do Specify Cytoplasmic Turnover." *Genes & development* 31(10): 990–1006.
- Keane, Sarah C. et al. 2015. "Structure of the HIV-1 RNA Packaging Signal." *Science* 348(6237): 917–21.
- Kennedy, Edward M et al. 2016. "Posttranscriptional M6A Editing of HIV-1 MRNAs Enhances Viral Gene Expression." *Cell Host and Microbe* 19(5): 675–85.
- Kharytonchyk, Sergei, and Finn Skou Pedersen. 2010. "A Unique, Thermostable Dimer Linkage Structure of RD114 Retroviral RNA." *RNA* 16(3): 572-584.
- Kharytonchyk, Siarhei et al. 2016. "Transcriptional Start Site Heterogeneity Modulates the Structure and Function of the HIV-1 Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(47): 13378–83.
- Kimura, T. et al. 1996. "A Role for Rev in the Association of HIV-1 Gag mRNA with Cytoskeletal  $\beta$ -Actin and Viral Protein Expression." In *Biochimie*, Elsevier B.V. 78(11-12):



1075–80.

- Kleiman, Lawrence, Rabih Halwani, and Hassan Javanbakht. 2004. “The Selective Packaging and Annealing of Primer TRNALys3 in HIV-1.” *Current HIV Research* 2(2): 163–75.
- Kutluay, Sebla B. et al. 2014. “Global Changes in the RNA Binding Specificity of HIV-1 Gag Regulate Virion Genesis.” *Cell* 159(5):1096-1109.
- Kutluay, Sebla B., and Paul D. Bieniasz. 2010. “Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging.” *PLoS Pathogens* 6(11): e1001200.
- Kuzembayeva, Malika, et al. 2014. “Life of Psi: How Full-Length HIV-1 RNAs Become Packaged Genomes in the Viral Particles.” *Virology* 454–455(1): 362–70.
- Larson, Daniel R. et al. 2003. “Direct Measurement of Gag-Gag Interaction during Retrovirus Assembly with FRET and Fluorescence Correlation Spectroscopy.” *Journal of Cell Biology* 162(7): 1233–44.
- Laughrea, M et al. 1997. “Mutations in the Kissing-Loop Hairpin of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reduce Viral Infectivity as Well as Genomic RNA Packaging and Dimerization.” *Journal of virology* 71(5): 3397–3406.
- Lever, A. et al. 1989. “Identification of a Sequence Required for Efficient Packaging of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA into Virions.” *Journal of Virology* 63(9): 4085–87.
- Lever, A. 2000. “Comparison of Viral Genomic RNA Sorting Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus Type 1 ( HIV-1 ), HIV-2 , and Moloney Murine Leukemia Virus.” *Journal of Virology* 74(23): 11413–17.
- Levin, J G. et al. 1974. “Deficiency of 60 to 70S RNA in Murine Leukemia Virus Particles Assembled in Cells Treated with Actinomycin D.” *Journal of virology* 14(1): 152–61.
- Li, Li et al. 2005. “Roles of HIV-1 Auxiliary Proteins in Viral Pathogenesis and Host-Pathogen Interactions.” *Cell Research* 15(11–12): 923–34.
- Lichinchi et al. 2016. “Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection.” *Cell Host & Microbe* 20(5): 666–73.
- Lichinchi et al. 2016. “Dynamics of the Human and Viral m<sup>6</sup>A RNA Methylomes during HIV-1 Infection of T Cells.” *Cell* 166(1): 16011.
- Lin, Shuibin et al. 2016. “The m<sup>6</sup>A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells Article The m<sup>6</sup>A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells.” *Molecular Cell* 62(3): 335–45.
- Linder, Bastian et al. 2015. “Single-Nucleotide-Resolution Mapping of M<sup>6</sup>A and M<sup>6</sup>Am throughout the Transcriptome.” *Nature Methods* 12(8): 767–72.

- Lingappa, Jaisri R. et al. 2006. "Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Required for Interaction of HIV-1 Gag with ABCE1 (HP68), a Cellular Protein Important for HIV-1 Capsid Assembly." *Journal of Biological Chemistry* 281(7): 3773–84.
- Liu, Jianzhao et al. 2014a. "A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-Adenosine Methylation." *Nature chemical biology* 10(2): 93–95.
- Lochmann, Timothy L. et al. 2013. "NC-Mediated Nucleolar Localization of Retroviral Gag Proteins." *Virus research* 171(2): 304–18.
- López-Lastra, Marcelo, Andrea Rivas, and María Inés Barría. 2005. "Protein Synthesis in Eukaryotes: The Growing Biological Relevance of Cap-Independent Translation Initiation." *Biological Research* 38(2–3): 121–46.
- Lorenz, Daniel A. et al. 2020. "Direct RNA Sequencing Enables M6A Detection in Endogenous Transcript Isoforms at Base-Specific Resolution." *RNA* 26(1): 19–28.
- Lu, Kun et al. 2011. "NMR Detection of Structures in the HIV-1 5'-Leader RNA That Regulate Genome Packaging." *Science* 334(6053): 242–45.
- Lu, Wuxun et al. 2018. "N6-Methyladenosine– Binding Proteins Suppress HIV-1 Infectivity and Viral Production." *Journal of Biological Chemistry* 293(34): 12992–5.
- Luban, J, and S P Goff. 1994. "Mutational Analysis of Cis-Acting Packaging Signals in Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA." *Journal of Virology* 68(6): 3784–93.
- Ma, Honghui et al. 2019. "N 6-Methyladenosine Methyltransferase ZCCHC4 Mediates Ribosomal RNA Methylation." *Nature Chemical Biology* 15(1): 88–94.
- Mailler, Elodie et al. 2016a. "The Life-Cycle of the HIV-1 Gag–RNA Complex." *Viruses* 8(9): 1-19.
- Maldonado, Rebecca J.Kaddis et al. 2020. "Visualizing Association of the Retroviral Gag Protein with Unspliced Viral RNA in the Nucleus." *mBio* 11(2): e00524-20.
- Malim, Michael H. et al. 1989. "The HIV-1 Rev Trans-Activator Acts through a Structured Target Sequence to Activate Nuclear Export of Unspliced Viral MRNA." *Nature* 338(6212): 254–57.
- Masuda, Takao et al. 2015. "Fate of HIV-1 CDNA Intermediates during Reverse Transcription Is Dictated by Transcription Initiation Site of Virus Genomic RNA." *Scientific Reports* 5: 17680.
- Mattei, Simone et al. 2015. "RNA and Nucleocapsid Are Dispensable for Mature HIV-1 Capsid Assembly." *Journal of Virology* 89(19): 9739–47.
- Mauer, Jan et al. 2017. "Reversible Methylation of M6 Am in the 5' Cap Controls MRNA Stability." *Nature* 541(7637): 371–75.

- McBride, M S, M D Schwartz, and A T Panganiban. 1997. "Efficient Encapsidation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors and Further Characterization of Cis Elements Required for Encapsidation." *Journal of virology* 71(6): 4544–54.
- Meyer, Kate D. et al. 2012. "Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons." *Cell* 149(7): 1635–46.
- Meyer, Kate D et al. 2015. "Article 5 0 UTR m 6 A Promotes Cap-Independent Translation." *Cell* 163(4): 1–12.
- Miele, G et al. 1996. "The Human Immunodeficiency Virus Type 1 5' Packaging Signal Structure Affects Translation but Does Not Function as an Internal Ribosome Entry Site Structure." *Journal of virology* 70(2): 944–51.
- Mikkelsen, Jacob Giehm, and Finn Skou Pedersen. 2000. "Genetic Reassortment and Patch Repair by Recombination in Retroviruses." *Journal of Biomedical Science* 7(2): 77–99.
- Monette, Anne et al. 2013. "Dual Mechanisms of Translation Initiation of the Full-Length HIV-1 mRNA Contribute to Gag Synthesis." *PLoS ONE* 8(7): e68108.
- Moore, Michael D., and Wei Shau Hu. 2009. "HIV-1 RNA Dimerization: It Takes Two to Tango." *AIDS Reviews* 11(2): 91–102.
- Mougel, M. et al. 2020. "NXF1 and CRM1 Nuclear Export Pathways Orchestrate Nuclear Export, Translation and Packaging of Murine Leukaemia Retrovirus Unspliced RNA." *RNA Biology* 17(4): 528-538.
- Mouland, Andrew J. et al. 2000. "The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufen Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation." *Journal of Virology* 74(12): 5441–51.
- Muriaux, Delphine et al. 2001. "RNA Is a Structural Element in Retrovirus Particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(9): 5246–51.
- Nikolaitchik, Olga A. et al. 2013. "Dimeric RNA Recognition Regulates HIV-1 Genome Packaging." *PLoS Pathogens* 9(3): e1003249.
- Nikolaitchik, Olga et al. 2006. "Effects of Mutations in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Gene on RNA Packaging and Recombination." *Journal of Virology* 80(10): 4691–97.
- Nisole, Sébastien, Jonathan P. Stoye, and Ali Saïb. 2005. "TRIM Family Proteins: Retroviral Restriction and Antiviral Defence." *Nature Reviews Microbiology* 3(10): 799–808.
- Ohlmann, Théophile, Chloé Mengardi, and Marcelo López-Lastra. 2014. "Translation Initiation of the HIV-1 mRNA." *Translation* 2(2): e960242.

- “Onusida , Hoja Informativa Mundial.” 2019.
- Paillart, J C et al. 1996. “A Dual Role of the Putative RNA Dimerization Initiation Site of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Genomic RNA Packaging and Proviral DNA Synthesis.” *Journal of virology* 70(12): 8348–54.
- Paillart, Jean-christophe et al. 2004. “First Snapshots of the HIV-1 RNA Structure in Infected Cells and in Virions \*.” 279(46): 48397–403.
- Paillart, Jean Christophe et al. 1994. “Mutational Analysis of the Bipartite Dimer Linkage Structure of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA.” *Journal of Biological Chemistry* 269(44): 27486–93.
- Paillart, Jean Christophe et al. 1996. “A Loop-Loop ‘Kissing’ Complex Is the Essential Part of the Dimer Linkage of Genomic HIV-1 RNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(11): 5572–77.
- Paillart, Jean Christophe et al. 2004. “Dimerization of Retroviral RNA Genomes: An Inseparable Pair.” *Nature Reviews Microbiology* 2(6): 461–72.
- Peeters, Martine et al. 1989. “Isolation and Partial Characterization of an HIV-Related Virus Occurring Naturally in Chimpanzees in Gabon.” *AIDS* 3(10): 625–30.
- Pelletier, Jerry, and Nahum Sonenberg. 1988. “Internal Initiation of Translation of Eukaryotic MRNA Directed by a Sequence Derived from Poliovirus RNA.” *Nature* 334(6180): 320–25.
- Pengfei Ding et al. 2020. “Identification of the initial nucleocapsid recognition element in the HIV-1 RNA packaging signal.” *PNAS* 117(30): 17737-17746.
- Pereira-Montecinos, Camila, Fernando Valiente-Echeverría, and Ricardo Soto-Rifo. 2017a. “Epitranscriptomic Regulation of Viral Replication.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1860(4): 460–71.
- Pestova, Tatyana V. et al. 1998. “A Prokaryotic-like Mode of Cytoplasmic Eukaryotic Ribosome Binding to the Initiation Codon during Internal Translation Initiation of Hepatitis C and Classical Swine Fever Virus RNAs.” *Genes and Development* 12(1): 67–83.
- Ping, Xiao-li et al. 2014. “Mammalian WTAP Is a Regulatory Subunit of the RNA N6-Methyladenosine Methyltransferase.” *Nature Publishing Group* 24(2): 177–89.
- Plank, Terra Dawn M., James T. Whitehurst, and Jeffrey S. Kieft. 2013. “Cell Type Specificity and Structural Determinants of IRES Activity from the 5’ Leaders of Different HIV-1 Transcripts.” *Nucleic Acids Research* 41(13): 6698-6714.
- Plantier, Jean Christophe et al. 2009. “A New Human Immunodeficiency Virus Derived from Gorillas.” *Nature Medicine* 15(8): 871–72.

- Pocock, Ginger M. et al. 2016. "HIV-1 and M-PMV RNA Nuclear Export Elements Program Viral Genomes for Distinct Cytoplasmic Trafficking Behaviors." *PLoS Pathogens* 12(4): e1005565.
- Reed, Jonathan C. et al. 2012. "HIV-1 Gag Co-opts a Cellular Complex Containing DDX6, a Helicase That Facilitates Capsid Assembly." *Journal of Cell Biology* 198(3): 439–56.
- Rein, Alan. 2019. "RNA Packaging in HIV." *Trends in Microbiology* 27(8): 715–23.
- Rein, Alan et al. 2011. "Diverse Interactions of Retroviral Gag Proteins with RNAs." *Trends in Biochemical Sciences* 36(7): 373–80.
- Ricci, Emiliano P. et al. 2008. "Lentiviral RNAs Can Use Different Mechanisms for Translation Initiation." *Biochemical Society Transactions* 36(4): 690–93.
- Riquelme-Barrios, S. et al. 2018. "Emerging Roles of N<sup>6</sup>-Methyladenosine on HIV-1 RNA Metabolism and Viral Replication." *Frontiers in Microbiology* 9:576.
- Robinson, B. A. et al. 2014. "A Temporospatial Map That Defines Specific Steps at Which Critical Surfaces in the Gag MA and CA Domains Act during Immature HIV-1 Capsid Assembly in Cells." *Journal of Virology* 88(10): 5718–41.
- Russell, Rodney S. et al. 2002. "Deficient Dimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Caused by Mutations of the U5 RNA Sequences." *Virology* 303(1): 152–63.
- Saaidi, Afaf et al. 2020. "IPANEMAP: Integrative Probing Analysis of Nucleic Acids Empowered by Multiple Accessibility Profiles." *Nucleic acids research* 48(15): 8276–89.
- Sakuragi, J I, and A T Panganiban. 1997. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Outside the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region Affects RNA Dimer Stability in Vivo." *Journal of virology* 71(4): 3250–54.
- Salditt-Georgieff, M. et al. 1976. "Methyl Labeling of HeLa Cell HnRNA: A Comparison with MRNA." *Cell* 7(2): 227–37.
- Sandri-Goldin, Rozanne M. 2004. "Viral Regulation of MRNA Export." *Journal of Virology* 78(9): 4389–96.
- Schibler, U., and R. P. Perry. 1977. "The 5'-Termini of Heterogeneous Nuclear RNA: A Comparison among Molecules of Different Sizes and Ages." *Nucleic Acids Research* 4(12): 4133–50.
- Schwartz, S, B K Felber, and G N Pavlakis. 1992. "Distinct RNA Sequences in the Gag Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Decrease RNA Stability and Inhibit Expression in the Absence of Rev Protein." *Journal of Virology* 66(1): 150–59.
- Seif, Elias, Meijuan Niu, and Lawrence Kleiman. 2013. "Annealing to Sequences within the Primer Binding Site Loop Promotes an HIV-1 RNA Conformation Favoring RNA

- Dimerization and Packaging.” *Rna* 19(10): 1384–93.
- Sharp, Paul M., and Beatrice H. Hahn. 2011. “Origins of HIV and the AIDS Pandemic.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1).
- Shi, Hailing et al. 2017. “YTHDF3 Facilitates Translation and Decay of N<sup>6</sup>-Methyladenosine-Modified RNA.” *Nature Publishing Group*. 27(3): 315-328.
- Siliciano, Robert F., and Warner C. Greene. 2011. “HIV Latency.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1): a007096.
- Skripkin, Eugene et al. 1994. “Identification of the Primary Site of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Dimerization in Vitro.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(11): 4945–49.
- Śledź, Paweł, and Martin Jinek. 2016. “Structural Insights into the Molecular Mechanism of the M6A Writer Complex.” *eLife* 5: e18434.
- Smola, Matthew J. et al. 2015. “Selective 2’-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling (SHAPE-MaP) for Direct, Versatile and Accurate RNA Structure Analysis.” *Nature Protocols* 10: 1643-1669.
- Smyth, Redmond P. et al. 2015. “Mutational Interference Mapping Experiment (MIME) for Studying RNA Structure and Function.” *Nature Methods* 12(9): 866–72.
- Sonenberg, Nahum, and Alan G. Hinnebusch. 2009. “Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets.” *Cell* 136(4): 731–45.
- Song, Rujun, Jafar Kafaie, and Michael Laughrea. 2008. “Role of the 5’ TAR Stem-Loop and the U5-AUG Duplex in Dimerization of HIV-1 Genomic RNA.” *Biochemistry* 47(10): 3283–93.
- Sonigo, Pierre et al. 1985. “Nucleotide Sequence of the Visna Lentivirus: Relationship to the AIDS Virus.” *Cell* 42(1): 369–82.
- Soto-Rifo, Ricardo, et al. 2012. “DEAD-Box Protein DDX3 Associates with EIF4F to Promote Translation of Selected MRNAs.” *EMBO Journal* 31(18): 3745–56.
- Soto-Rifo, Ricardo, et al. 2012. “Different Effects of the TAR Structure on HIV-1 and HIV-2 Genomic RNA Translation.” *Nucleic Acids Research* 40(6): 2653–67.
- Soto-Rifo, Ricardo, Paulina S. Rubilar, and Théophile Ohlmann. 2013. “The DEAD-Box Helicase DDX3 Substitutes for the Cap-Binding Protein EIF4E to Promote Compartmentalized Translation Initiation of the HIV-1 Genomic RNA.” *Nucleic Acids Research* 41(12): 6286–99.
- Sun, Siyang, Venigalla B. Rao, and Michael G. Rossmann. 2010. “Genome Packaging in Viruses.” *Current Opinion in Structural Biology* 20(1): 114–20.

- Tirumuru, N. et al. 2016. "N<sup>6</sup>-Methyladenosine of HIV-1 RNA Regulates Viral Infection and HIV-1 Gag Protein Expression." 5: 1–20.
- Toro-Ascuy, D. et al. 2018. "A Rev–CBP80–EIF4AI Complex Drives Gag Synthesis from the HIV-1 Unspliced MRNA." *Nucleic Acids Research* 46(21): 11539-11552.
- Van Tran, Nhan et al. 2019. "The Human 18S RRNA M6A Methyltransferase METTL5 Is Stabilized by TRMT112." *Nucleic Acids Research* 47(15): 7719–33.
- Turner, Brian G., and Michael F. Summers. 1999. "Structural Biology of HIV." *Journal of Molecular Biology* 285(1): 1–32.
- UNAIDS. 2019. "UNAIDS DATA 2019 CHILE."
- Vallejos, Maricarmen et al. 2011. "Activity of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cell Cycle-Dependent Internal Ribosomal Entry Site Is Modulated by IRES Trans-Acting Factors." *Nucleic Acids Research* 39(14): 6186–6200.
- Vallejos, Maricarmen et al. 2012. "Functional and Structural Analysis of the Internal Ribosome Entry Site Present in the Mrna of Natural Variants of the Hiv-1." *PLoS ONE* 7(4): e35031.
- Wang, Xiang et al. 2016. "Structural Basis of N<sup>6</sup>-Adenosine Methylation by the METTL3–METTL14 Complex Chemical Modifications of RNA Have Essential Roles in a Vast Range of Cellular Processes." *Nature* 534(23).
- Wang, Xiao et al. 2014. "N<sup>6</sup>-Methyladenosine-Dependent Regulation of Messenger RNA Stability." *Nature* 505(7481): 117–20.
- Wang, Xiao et al. 2015a. "Article Messenger RNA Translation Efficiency." *Cell* 161(6): 1388–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.
- Wang, Xiao et al. 2015b. "N<sup>6</sup>-Methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency." *Cell* 161(6): 1388–99.
- Warda, Ahmed S et al. 2017. "Human METTL16 Is a N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Methyltransferase That Targets Pre-mRNAs and Various Non-coding RNAs." *EMBO reports* 18(11): 2004–14.
- Watts, Joseph M. et al. 2009. "Architecture and Secondary Structure of an Entire HIV-1 RNA Genome." *Nature* 460(7256): 711–16.
- Wei, Jiangbo et al. 2018. "Differential m<sup>6</sup>A, m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>, and m<sup>1</sup>A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm." *Molecular Cell* 71(6): 973-985.e5.
- Wilkinson, Kevin A. et al. 2008a. "High-Throughput SHAPE Analysis Reveals Structures in HIV-1 Genomic RNA Strongly Conserved across Distinct Biological States." *PLoS Biology* 6(4): 883–99.

- Williams, Graham D., Nandan S. Gokhale, and Stacy M. Horner. 2019. "Regulation of Viral Infection by the RNA Modification N6-Methyladenosine." *Annual Review of Virology* 6: 235–53.
- Workman, Rachael E. et al. 2019. "Nanopore Native RNA Sequencing of a Human Poly(A) Transcriptome." *Nature Methods* 16(12): 1297–1305.
- Wu, Ruifan et al. 2016. "N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Methylation in mRNA with A Dynamic and Reversible Epigenetic Modification." *Molecular Biotechnology* 58: 450–459.
- Xiao, Wen et al. 2016. "Nuclear M6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing." *Molecular Cell* 61(4): 507–19.
- Yamaguchi, Julie et al. 2020. "Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L." *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 83(3): 319–22.
- Yu, Kyung Lee et al. 2016. "HIV-1 Nucleocapsid Protein Localizes Efficiently to the Nucleus and Nucleolus." *Virology* 492: 204–12.
- Zaccara, Sara, Ryan J. Ries, and Samie R. Jaffrey. 2019. "Reading, Writing and Erasing mRNA Methylation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(10): 608–24.
- Zheng, Guanqun et al. 2013a. "ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase That Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility." *Molecular Cell* 49(1): 18–29.
- Zhong, Silin et al. 2008. "MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor." *20(May)*: 1278–88.
- Zhou, Qiang, and Phillip A. Sharp. 1995. "Novel Mechanism and Factor for Regulation by HIV-1 Tat." *EMBO Journal* 14(2): 321–28.
- Zhou, Yuan et al. 2016a. "SRAMP : Prediction of Mammalian N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Sites Based on Sequence-Derived Features". *Nucleic Acids Research* 44(10): 1–12.



