



**Rol de las proteínas celulares PTB1, Nucleolina y hnRNPU en el inicio de la traducción de mRNAs retrovirales mediado por IRESs.**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad De Chile**

**En cumplimiento parcial de los requisitos**

**Para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Nataly Contreras Santibañez**

**Abril, 2018**

**Director de Tesis**

**Dr. Marcelo López-Lastra**

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

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.**

**Nataly del Pilar Contreras Santibañez**

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

**Director de Tesis:**

**Dr. Marcelo López Lastra** .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Eugenio Spencer** .....

**Dr. Oscar León** .....

**Dr. Romilio Espejo** .....

**Con amor para todos aquellos que me motivaron durante el desarrollo de este trabajo.**



Nací un 11 de Mayo de 1986 en Santiago de Chile. A mi llegada me esperaban mis amados padres Nelson Contreras Quijano y Cecilia Santibáñez Valdés. En compañía de ellos se encontraba también mi compañero de vida Mauricio, quien con una diferencia de 5 años me esperaba para hacer de este planeta un lugar más divertido donde habitar. Mis padres me bautizaron con el nombre de Nataly, según mi madre porque era el nombre de un personaje que reflejaba dulzura en su actuar. Sin embargo, al cabo de unos años, mi abuelito Luis decidió apodarme chirigua, nombre que reciben unos pequeños pajaritos de campo que él había observado durante sus años de vida.

Pase los primeros 10 años de mi vida en una casa ubicada en calle los gladiolos, y aunque vivíamos en una casa humilde, esos diez años fueron los mejores de mi vida.

Cursé parte de la enseñanza básica en la Escuela Municipal DN-113 España, en la cual crecí como persona y aprendí el valor de lo sencillo. Luego, en el año 1997 nos mudamos de casa y me cambie al colegio Rafael Sanhueza Lizardi donde termine de cursar la enseñanza básica y media.

Mi gusto por las ciencias naturales y por entender cómo funcionaba la vida comenzó en el colegio, lo que me llevo a tomar los electivo de biología durante tercero y cuarto medio y más tarde a elegir una carrera relacionada a las ciencias. Es por esto que en el año 2004 ingresé a la carrera de Bioquímica en la Universidad Andrés Bello, gracias a una beca que gané y que financiaba mis estudios completos. Durante mis años de formación pase gran parte de mi tiempo en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la USACH, en el cual además de realizar mis unidades de investigación realice mi tesis de pregrado. Luego, en el año 2011 decidí ingresar al Doctorado en Microbiología con el objetivo de crecer como científico. En aquel entonces, sentía mucha curiosidad por entender cómo funcionaban los virus, y por ello, decidí acercarme al Dr. Marcelo López-Lastra con la intención de formar parte de su equipo de trabajo. Desde aquel entonces forme parte del Laboratorio de Virología Molecular, lugar en cual se gestó este trabajo y que hoy me permite optar al grado de doctor.

## Agradecimientos

El término de esta etapa me impulsa y motiva a agradecer a cada una de las personas que participaron de manera física y emocional en el desarrollo de este trabajo.

En primer lugar, agradezco al profesor Marcelo López por recibirme en su laboratorio y por darme la oportunidad de satisfacer mi curiosidad científica. Gracias profe por tener siempre su puerta abierta para recibirnos y para ayudarnos a resolver nuestras inquietudes, gracias por tratar de hacer que sus estudiantes sean cada día mejores.

A los que integran o integraron el laboratorio de Virología Molecular agradezco todos los momentos que me ayudaron a hacer más llevadero este trabajo. A Felipe, Estefi, Eduardo, Jenny, Lore, Pato y Vale, gracias chicos por las risas, las conversaciones, los tiempos extras post laboratorio y la motivación que en más de alguna oportunidad recibí de Uds. Gracias porque a pesar de que a veces las relaciones pueden no ser estrechas, nuestra convivencia diaria trajo como consecuencia la generación espontánea de cariño.

A mis amigos, Rodrigo, Clamuvi, Palma, Osa, Macka, Cote, agradezco la constante motivación y preocupación. Gracias por hacer de mis momentos fuera del laboratorio instancias amenas en las cuales distraerme, gracias por los constantes envíos de buenas energías, ánimos y oraciones para que siempre todo saliera bien.

A mi amiga Karlita, hay tanto, tanto que quisiera agradecer. Ella fue una luz muchas veces cuando me vi perdida, fue una palabra de aliento, una mano extendida, una guía de sabiduría y amor. Saco risas de mi rostro cuando por ella rodaban lágrimas, levanto mi ánimo cuando estaba dando la batalla por perdida. Me ayudo a reafirmar que en un escenario tan adverso como a veces es la ciencia, lo que realmente importa es lo que eres como persona antes que científico y a mantener tu espíritu y corazón siempre en alto aun cuando el entorno te empuje a cambiarlos.

A Fernando, mi solidario compañero tengo también tanto que agradecer. Fernando no solo me ayudo a mejorar como científica, sino que también a mejorar como persona. Fue un apoyo fundamental en el desarrollo de mi trabajo. Juntos pasamos risas y llantos, y aun cuando a veces ambos estábamos cansados, él siempre tenía una palabra de aliento para motivarme a seguir adelante. Gracias por ayudarme con el desarrollo de este trabajo, con las revisiones de los escritos, por escuchar los ensayos de mis presentaciones, por estar siempre dispuesto a tenderme una mano. Gracias por creer siempre en mí, porque cuando quería bajar los brazos, Fernando siempre estaba susurrándome al oído que todo saldría bien. Gracias por el amor y entrega de todos estos años, por la compañía, la motivación, por las risas y por ayudarme a crecer.

Por último, necesito agradecer tanto a mi familia. Sin ellos probablemente este trabajo no habría visto la luz. Estoy tan agradecida de tener esta familia, tan agradecida del amor infinito que me entregan cada día. Mejores padres sé que no me pudieron tocar. Gracias papa y mamá por tanta luz que dan a mi camino, gracias porque cuando estuve a punto de

perder mi propia batalla, me levantaron desde el abismo y me dieron el amor y sostén que necesitaba para pararme nuevamente firme ante la vida. Gracias porque cuando llegaba llorando a la casa, frustrada luego de largas horas de trabajo, Uds. con amor y risas levantaban mi ánimo y espíritu. Gracias porque me enseñaron que lo valioso no se basa en cuantos títulos sumemos a nuestro curriculum, si no que en la persona en la cual nos convertimos.

Gracias porque sé que siempre acompañaron mi camino no solo desde lo físico, si no que también desde lo espiritual pidiendo por mi cada vez que mi ánimo se veía quebrantado, cada vez que me tocaba enfrentar una situación difícil y por pedir que mi corazón estuviera fortalecido.

A mi pollito amado agradezco su constante entrega y compañía, sin ti hermanito este proceso habría sido tan difícil. Gracias porque, en cada decisión, siempre estas tu ayudándome con un sabio consejo o motivando mi decisión. Gracias porque siempre me estas impulsando hacia arriba, gracias por nuestras conversaciones, por hacerme ver las cosas importantes de la vida, por hacer crecer mi espíritu y corazón. Gracias por tu constante preocupación, por el amor infinito que me entregas, por alentarme a volar.

Gracias a mi flaquito por llenar mi vida de colores y alegría, por recordarme que la belleza de las cosas está en lo simple, en lo que nos sorprende y que el mundo sigue siendo siempre un lugar por descubrir.

A mis abuelitos Luis y yoyito, agradezco su constante apoyo y preocupación. Gracias abuelita por todas sus oraciones pidiendo que siempre todo saliera bien para mí. Gracias por su infinita generosidad con mis triunfos. Gracias porque aun en el olvido, sigue pensando en mí, en mi bienestar, y sigue disfrutando junto a mí de mis alegrías.

A mi familia, Gabriel, Negrita, Maquita, tío Esteban, Katita y tía Rosa agradezco enormemente toda la preocupación e interés en el avance de este proceso. Gracias familia por todos los momentos divertidos, por todas las risas, por nuestras onces características, por sus buenas vibras y buenos deseos, porque son parte del motor que me impulsa a seguir adelante.

Y finalmente gracias a ti, porque en mis momentos de desconsuelo y miedo, pusiste a alguien en mi camino que me ayudara a salir adelante. Porque en cada momento de dificultad me acompañaste, porque sé que a muchas de mis batallas no fui sola, porque soy una persona privilegiada, porque a pesar de mis olvidos sigues estando ahí conmigo. Gracias porque termino este proceso con una sonrisa en la cara agradeciendo todo cuanto pones en mi camino.

## **FINANCIAMIENTO**

**Beca de doctorado nacional CONICYT 2011**

**Proyecto Instituto Milenio**

**Proyecto FONDECYT 1130270**

**Proyecto FONDECYT 1170590**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Índice de contenidos</b>	<b>v</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xii</b>
<b>Resumen</b>	<b>xv</b>
<b>Abstract</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Mecanismo de iniciación traduccional cap-dependiente	1
1.2 Mecanismo de iniciación interno de la traducción	3
1.3 Retrovirus	5
1.4 Inicio de la traducción de gRNAs retrovirales: el caso de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.	6
1.5 Factores <i>trans</i> activadores de los IRESs (ITAFs)	9
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>15</b>
2.1 Cultivo celular	15
2.2 Vectores	15
2.3 Transcripción <i>in vitro</i>	19

2.4 Expresión y purificación proteína GλH	20
2.5 Extractos celulares	21
2.5.1 Extractos celulares: ensayo GRNA	21
2.5.2 Extractos celulares: localización de la proteína hnRNP	22
2.6 Western blot	23
2.7 Ensayo GRNA	24
2.8 Análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas	25
2.9 Medición de la actividad enzimática de las proteínas luciferasa de Renilla (RLuc) y luciferasa de luciérnaga (FLuc)	26
2.10 Transfección de RNAs interferentes (siRNA)	26
2.11 Transfección de DNA	28
2.12 Microscopía de fluorescencia	29
2.13 Ensayo de Unión: UV crosslinking e inmunoprecipitación (UV-CLIP)	30
2.14 Análisis estadístico	32
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
3.1 Caracterización de la actividad del IRES de MMTV	33
3.2 Identificación de sitios putativos de unión a ITAFs en la región 5'UTR del gRNA de MMTV	39
3.3 El silenciamiento de la expresión de PTB afecta el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV	40
3.4 La sobreexpresión de PTB1 estimula el inicio de la traducción	42

IRES-dependiente de MMTV	
3.5 La proteína PTB1 se une <i>in vivo</i> a la región 5'UTR de MMTV	44
3.6 Los motivos RRM de PTB1 son necesarios para estimular el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV	46
3.7 Identificación de proteínas que interactúan con la región 5'UTR del gRNA de HIV-1 y HTLV-1	49
3.8 Actividad de los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 en células Cos-7 y HEK293T	56
3.9 El silenciamiento de la expresión de nucleolina no impacta de manera específica la actividad de los IRESs retrovirales	63
3.10 La sobreexpresión de nucleolina solo incrementa la actividad del elemento IRES de HTLV-1 a altas concentraciones	67
3.11 El silenciamiento de la expresión de hnRNPU afecta el inicio de la traducción IRES retroviral	69
3.12 La sobreexpresión de hnRNPU estimula el inicio de la traducción IRES retroviral	73
3.13 El motivo RGG de hnRNPU es necesario para estimular el inicio de la traducción mediado por IRESs retroviral en células HEK293T	76
3.14 Localización de la proteína hnRNPU en células	79
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>97</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores celulares obtenidos desde extractos citoplasmáticos provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HIV-1	<b>53</b>
Tabla 2. Factores celulares obtenidos desde extractos nucleares provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HIV-1	<b>54</b>
Tabla 3. Factores celulares obtenidos desde extractos citoplasmáticos provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HTLV-1	<b>55</b>
Tabla 4. Factores celulares obtenidos desde extractos nucleares provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HTLV-1	<b>55</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un mensajero bicistrónico	4
Figura 2. Representación esquemática de la función de los ITAFs sobre los elementos IRESs	10
Figura 3. Representación esquemática de la interacción entre los elementos IRESs retrovirales y factores proteicos	13
Figura 4. El elemento MMTV IRES es activo en células HEK293T	34
Figura 5. La expresión de FLuc desde la construcción dl MMTV no se debe a la presencia de un promotor críptico	36
Figura 6. La actividad IRES de MMTV no se explica por la generación de variantes de <i>splicing</i>	38
Figura 7. La región 5'UTR de MMTV posee sitios putativos de unión para la proteína PTB	40
Figura 8. El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína PTB en células HEK293T	41
Figura 9. PTB1 estimula la actividad del elemento IRES de MMTV	43
Figura 10. La proteína PTB1 se une a la región 5'UTR de MMTV <i>in vivo</i>	46
Figura 11. Los motivos RRM de PTB1 son necesarios para estimular la actividad del elemento IRES de MMTV	48

Figura 12. Evaluación mediante western blot de los extractos nuclear y citoplasmático obtenidos de células Jurkat	50
Figura 13. Esquema representativo de las construcciones utilizadas para la síntesis <i>in vitro</i> de los RNAs 3BOXB, 5'UTR HIV-1/3BoxB y 5'UTR HTLV-1/3BoxB	51
Figura 14. Proteínas celulares que interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1	52
Figura 15. Expresión de Nucleolina y hnRNPU en distintos contextos celulares	57
Figura 16. Los elementos IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV son activos en células HEK293T y Cos-7	59
Figura 17. La expresión de FLuc desde las construcciones dl HIV-1, dl HTLV-1 y MMTV no se debe a la presencia de un promotor críptico.	60
Figura 18. La actividad del IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV no se explica por la generación de variantes de <i>splicing</i>	62
Figura 19. El silenciamiento de la expresión de nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistrónico dl HIV-1.	64
Figura 20. El silenciamiento de la expresión de nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistrónico dl HTLV-1	65

Figura 21. El silenciamiento de la expresión de nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistrónico dl MMTV	<b>66</b>
Figura 22. La sobreexpresión de Nucleolina no afecta la actividad de los IRESs retrovirales.	<b>68</b>
Figura 23. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1 requiere de la proteína hnRNPU	<b>70</b>
Figura 24. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HTLV-1 requiere de la proteína hnRNPU	<b>71</b>
Figura 25. El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína hnRNPU	<b>72</b>
Figura 26. Sobreexpresión de la proteína hnRNPU en células HEK293T	<b>73</b>
Figura 27. La sobreexpresión de hnRNPU estimula la actividad de los elementos IRESs retrovirales	<b>75</b>
Figura 28. La expresión de hnRNPU <sup>mut</sup> impacta de manera negativa la actividad de los IRESs retrovirales	<b>78</b>
Figura 29. Localización celular de la proteína hnRNPU	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5'UTR:** Región 5' no traducida

**5'cap:** 7-metilguanosina

**Cos-7:** Fibroblastos de mono verde africano

**dl:** Vector dual luciferasa

**DMEM:** Medio *Eagle* modificado por *Dulbecco*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNAsa:** Desoxirribonucleasa

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**eIF:** Factor de inicio de la traducción eucarionte

**FLuc:** Luciferasa de Luciérnaga

**gRNA:** RNA genómico

**hnRNPU:** ribonucleoproteína heterogénea nuclear U

**HCV:** Virus Hepatitis C

**HEK293T:** Células embrionarias de riñón humano

**HIV-1:** Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

**HTLV-1:** Virus de la leucemia de linfocitos T humano de tipo 1

**IRES:** Sitio interno de entrada del ribosoma

**ITAFs:** Factores *trans* activadores de los IRESs

**kDa:** Kilodaltons

**MMTV:** Virus del tumor mamario murino

**mRNA:** RNA mensajero

**PABP:** Proteína de unión a la cola 3' poli A

**PBS 1X:** Tampón boro fosfato 1X

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PTB:** Proteína de unión al tracto de polipirimidina

**PV:** Virus Polio

**RGG:** Motivo de unión a RNA rico en glicinas/argininas

**RLuc:** Luciferasa de *Renilla*

**RLA:** Actividad luciferasa relativa

**RRM:** Motivo de reconocimiento de RNA

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNP:** Complejo ribonucleoproteico

**RPMI:** medio *Roswell Park Memorial Institute*

**RRL:** Lisado de reticulocitos de conejo

**RT:** Retrotranscriptasa

**RTA:** Actividad traduccional relativa

**siRNA:** RNA interferente

**SC:** silenciador negativo o *scramble*

**Splicing:** Procesamiento de corte y empalme del mRNA

**T7:** RNA polimerasa del fago T7

**TBS:** Buffer tris-salino

**tRNA:** RNA de transferencia

**tRNAi:** RNA de transferencia iniciador

**UV-CLIP:** UV crosslinking e inmuniprecipitación

**$\Delta$ EMCV:** Región 5'UTR del virus de la encefalomiocarditis sin actividad IRES

## RESUMEN

Los RNA genómicos (gRNAs) de HIV-1, HTLV-1 y MMTV que codifican para las proteínas estructurales Gag y Gag-pol, pueden iniciar su traducción utilizando un mecanismo dependiente de la estructura 5'cap ( $m^7GpppN$ ) o bien mediante el uso de sitios de entrada interna del ribosoma (IRES). Los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV poseen un IRES en su región 5'UTR. Se ha propuesto que cuando la traducción cap-dependiente es inhibida, por ejemplo, durante la progresión del ciclo replicativo viral, el inicio de la traducción cambia de cap-dependiente a un mecanismo IRES-dependiente. Esta estrategia permitiría asegurar la síntesis de la proteína estructural Gag durante todo el ciclo replicativo.

En la actualidad aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales los elementos IRES reclutan la maquinaria traduccional, no obstante, se ha sugerido que la actividad del elemento IRES depende del contexto celular y requiere de la participación de proteínas celulares denominadas factores trans-activadores de IRES (ITAF) que actúan modulando el inicio de la traducción. Estudios comparativos de los IRESs retrovirales de HIV-1, HTLV-1 y MMTV han establecido que su actividad y mecanismo de reclutamiento de la maquinaria traduccional varía según el contexto celular en el que se encuentren. Más aún, diversos estudios sugieren que el reconocimiento del gRNA de HIV-

1 por parte de la maquinaria traduccional requiere un paso del RNA por el núcleo celular. Desde un punto de vista biológico este fenómeno se puede contextualizar al considerar que a diferencia de otros virus de RNA que poseen IRESs como sería el caso de los picornavirus cuyo ciclo replicativo está confinado al citoplasma de la célula, los retrovirus realizan un ciclo replicativo que transcurre entre el núcleo y citoplasma de la célula, siendo el núcleo el lugar de síntesis de los gRNAs. De esta forma, durante la síntesis de los gRNAs retrovirales diversas proteínas celulares interactuarían, de forma directa o indirecta, con el gRNA formando al menos un complejo ribonucleoproteico (RNP) el cual participaría en la etapa de exporte del gRNA viral y podría posteriormente regular la asociación del gRNA viral con la maquinaria traduccional.

Considerando esta posibilidad, el objetivo de este trabajo fue identificar al menos una proteína celular que forme parte del complejo-RNP y que participe en la regulación de la traducción IRES-dependiente del gRNA de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

A través de un análisis *in silico*, se determinó que la región 5'UTR de MMTV posee sitios putativos de unión para la proteína PTB1. Posteriormente y a través de ensayos funcionales determinamos que la proteína PTB1 se une *in vitro e in vivo* a la región 5'UTR y actúa como un factor trans-activador del elemento IRES de MMTV. En la búsqueda de nuevos ITAFs para los elementos IRES retrovirales, ensayos realizados por cromatografía de afinidad (GRNA) acoplado a espectrometría de masas nos permitieron identificar distintas proteínas celulares asociadas a las regiones 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1 entre las cuales se encontraban las proteínas nucleolina y hnRNPU. Los resultados obtenidos para nucleolina indican que el silenciamiento en la expresión génica

de la proteína no tiene un efecto sobre la traducción, mientras que una sobreexpresión de la proteína sólo incrementa la actividad del elemento IRES de HTLV-1. Por otra parte, los resultados obtenidos con hnRNP-U nos permitieron determinar que la proteína se une a la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1 y actúa como un factor *trans*-activador para el inicio de la traducción IRES-dependiente de los tres IRES retrovirales en estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron por lo tanto identificar nuevos ITAFs celulares que participan en el inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

## SUMMARY

The genomic RNA (gRNAs) of HIV-1, HTLV-1 and MMTV coding for the Gag and Gag-pol structural proteins, can start their translation process using a mechanism dependent on the 5'cap structure (m<sup>7</sup>GpppN) or through the use of internal ribosome entry sites (IRES). The gRNAs of HIV-1, HTLV-1 and MMTV have an IRES element in their 5'UTR region and it has been proposed that when the cap-dependent translation initiation is inhibited, for example, during the progression of the viral replicative cycle, the translation initiation changes from cap -dependent on an IRES-dependent mechanism. This strategy would allow to ensure the synthesis of the Gag structural protein throughout the replicative cycle.

At present times, the molecular mechanisms that allow the IRESs to recruit the translational machinery are still unknown, however, it has been suggested that the activity of the IRES element depends on the cellular background and requires the participation of cellular proteins called IRES trans-acting factors (ITAF) that can act by modulating the IRES dependent translation initiation. Comparative studies of the retroviral IRESs of HIV-1, HTLV-1 and MMTV have established that their activity and mechanism of recruitment of the translational machinery varies according to the cellular context in which they are located. Moreover, several studies suggest that recognition of HIV-1 gRNA by the

translational machinery requires the trafficking of the gRNAs from the cell nucleus to the cytoplasm. From a biological point of view this phenomenon can be contextualized considering that unlike other RNA viruses that have IRESs as would be the case of the picornaviruses, whose replicative cycle is confined to the cell cytoplasm, retroviruses perform a replicative cycle that takes place between the nucleus and cytoplasm of the cell, being the nucleus the place of synthesis of the gRNAs. In this way, during the synthesis of retroviral gRNAs, different cellular proteins would interact, directly or indirectly, with the gRNA forming at least one ribonucleoprotein complex (RNP) which would participate in the viral gRNA export stage and could subsequently regulate the association of viral gRNA with the translational machinery.

Considering this possibility, the objective of this work was to identify at least one cellular protein that forms part of the RNP-complex and that participates in the regulation of IRES-dependent mRNA translation initiation of HIV-1, HTLV- 1 and MMTV.

Through an *in silico* analysis, it was determined that the 5'UTR region of MMTV gRNA possesses putative binding sites for the PTB1 protein. Subsequently, and through functional tests, we determined that the PTB1 protein binds *in vitro* and *in vivo* to the 5'UTR region and acts as a trans-acting factor for the IRES element. In the search for new ITAFs for retroviral IRES elements, we performed a GRNA assay coupled to a mass spectrometry test. This allowed us to identify different cellular proteins associated with the 5'UTR regions of HIV-1 and HTLV-1, among which nucleolin and hnRNPU proteins were found. The results obtained for nucleolin indicate that silencing the gene expression

of the protein does not impact on translation, while an overexpression of the protein only increase the activity of the HTLV-1 IRES. On the other hand, the results obtained with hnRNPU allowed us to determine that the protein binds to the 5'UTR region of HIV-1 and HTLV-1 and acts as a trans-acting factor for the IRES translation initiation on the three retroviral IRES under study.

The results obtained in this work allowed us to identify new cellular ITAFs that participate in the IRES translation initiation of HIV-1, HTLV-1 and MMTV.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Mecanismo de iniciación traduccional cap-dependiente

Durante el proceso de traducción los RNAs mensajeros (mRNAs) son decodificados por la maquinaria traduccional para generar una cadena polipeptídica. La síntesis de proteínas en células eucariontes comprende tres etapas: iniciación, elongación y terminación, de las cuales el proceso de iniciación es la etapa limitante (Sonenberg and Hinnebusch, 2009) (Gebauer and Hentze, 2004).

El inicio de la traducción canónico o cap-dependiente, comienza con el reconocimiento de la estructura 5'cap ( $m^7GpppN$ ), modificación presente en el extremo 5' de todos los mRNAs celulares, por el factor de inicio de la traducción eucarionte (eIF) 4F, complejo formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G (Pestova *et al.*, 2001). La proteína eIF4E reconoce y se une al cap, eIF4A es una RNA helicasa dependiente de ATP que participa en la desestructuración de la región 5' no traducida (5'UTR) del mRNA y eIF4G coordina el ensamblaje del complejo de iniciación actuando como una proteína puente entre la estructura 5'cap del mRNA (vía eIF4E) y la subunidad 40S ribosomal (vía eIF3). La subunidad 40S ribosomal es reclutada como parte del complejo 43S, compuesto por eIF1, eIF1A, eIF2-GTP/tRNAiniciador(tRNA<sub>i</sub>), eIF3 y eIF5 (Pestova *et al.*, 2001).

El factor eIF4G interactúa además con la proteína de unión a la cola poliadenilada (PABP) presente en el extremo 3' de los mRNAs, evento que promueve la circularización del mRNA incrementando su eficiencia traduccional (Gallie, 1991).

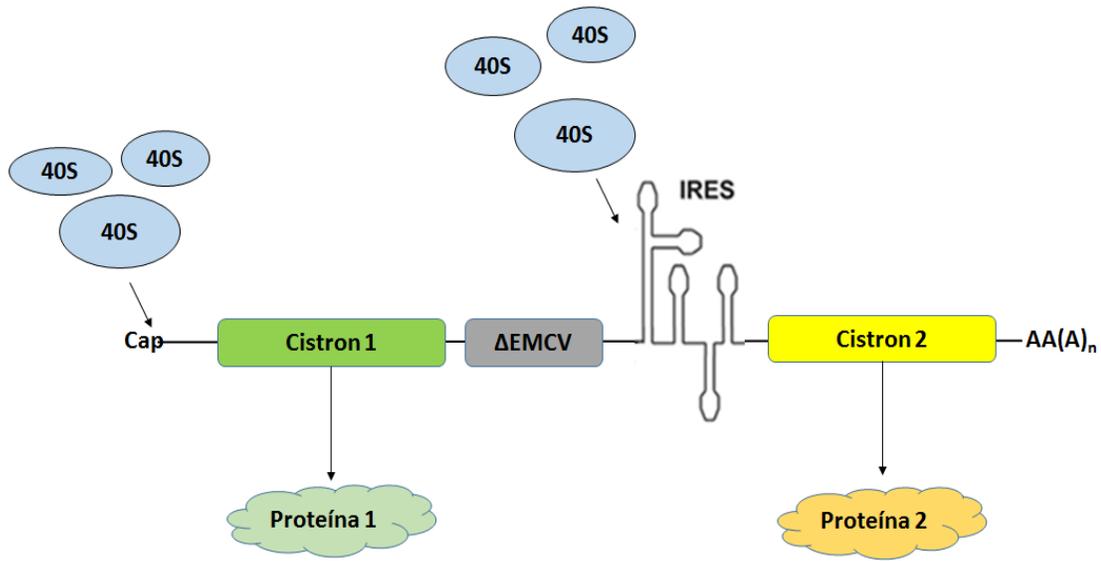
Una vez asociada al extremos 5' del mRNA, la subunidad 40S ribosomal se desplaza en dirección 5' a 3' por la región 5'UTR en un proceso denominado “*scanning*” (Gallie, 1991). La migración de la subunidad ocurre hasta encontrar el primer codón de inicio “AUG” en contexto apropiado (G/AXXAUGG, donde X representa cualquier nucleótido). El reconocimiento del codón de inicio, permite la interacción codón-anticodón entre el AUG y el Met-tRNA<sub>i</sub>, produciéndose la hidrólisis de GTP presente en el complejo ternario eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub> y la liberación de los eIFs (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005). Este proceso permite el reclutamiento de la subunidad 60S ribosomal y el ensamblaje del ribosoma 80S dando paso a la etapa de elongación (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005).

Además del mecanismo de iniciación cap-dependiente, algunos mRNAs celulares y virales pueden iniciar su traducción utilizando mecanismos alternativos, siendo uno de los más caracterizados el uso de sitios internos de entrada del ribosoma (IRES). En éste mecanismo cap-independiente, el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S al mRNA depende de un IRES que corresponde a una estructura de RNA capaz de reclutar la subunidad ribosomal 40S de manera independiente a la estructura 5'cap y a la cola 3' poliadenilada (Martínez-Salas, Piñeiro and Fernández, 2012).

## 1.2 Mecanismo de iniciación interno de la traducción

Los IRESs son capaces de reclutar la subunidad ribosomal 40S en una posición cercana, o bien directamente sobre el codón de inicio AUG (Jerry, 1988)(Jang *et al.*, 1988). Se ha descrito que la presencia de un IRES en el mRNA permite asegurar el inicio de la síntesis de la proteínas bajo condiciones en las cuales la iniciación cap-dependiente se encuentra inhibida (Hellen and Sarnow, 2001).

En la actualidad los IRESs son definidos exclusivamente por un criterio funcional, ya que no existe consenso de secuencias ni de estructuras que permitan su identificación (Baird *et al.*, 2006). Uno de los principales métodos utilizados para la identificación y caracterización de elementos IRESs corresponde al uso de construcciones bicistrónicas. Estas, poseen dos cistrones reporteros separados por una región intercistrónica, en la cual se inserta la región a evaluar (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005). En este contexto, el inicio de la traducción del primer cistrón es dependiente de la estructura 5'cap, mientras que el inicio de la traducción del segundo cistrón depende de la capacidad de la secuencia intercistrónica de reclutar la subunidad 40S ribosomal de manera IRES-dependiente (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005) (Fig. 1).



**Figura 1. Representación esquemática de un mensajero bicistrónico.** La traducción del primer cistron (cistron 1) ocurre por un mecanismo cap- dependiente, mientras que la traducción del segundo cistron (cistron 2) sólo ocurrirá si la región intercistronica actúa como un IRES. En el mensajero bicistrónico, la región ΔEMCV (recuadro gris) corresponde a la región 5'UTR del virus de la encefalomiocarditis que permite generar un IRES no funcional el que es utilizado para evitar el mecanismo de terminación-reiniciación del ribosoma (Adaptada de López-Lastra y cols., 2005).

Desde su caracterización inicial en mRNAs de la familia Picornaviridae, se ha descrito la presencia de elementos IRESs en algunos mRNAs provenientes de otras familias virales como son los Retroviridae (Buck *et al.*, 2001; Brasey *et al.*, 2003; Balvay *et al.*, 2007; Vallejos *et al.*, 2009; de Breyne *et al.*, 2012; Ohlmann, Mengardi and López-Lastra, 2014; Olivares *et al.*, 2014).

### 1.3 Retrovirus

Los Retrovirus son virus de RNA, agrupados en siete géneros, de los cuales destacan los lentivirus, los deltaretrovirus y los beta-retrovirus (M. P Knipe, M. D. & Howley, 2001). Algunos exponentes de éstos géneros son el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) (M. P. Knipe, M. D. & Howley, 2001), agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) , el virus de la leucemia de linfocitos T humano de tipo 1 (HTLV-1), agente etiológico de la leucemia de células T en adulto (ATL) y paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada a HTLV-1 (TSP/HAM) (Yasunaga and Matsuoka, 2011) y el virus del tumor mamario murino (MMTV) agente etiológico del cáncer de mamas en ratones y posible agente de cáncer de mamas en humanos (Wang *et al.*, 2014), respectivamente.

Como todos los miembros de la familia, las partículas virales de HIV-1, HTLV-1 y MMTV están constituidas por una envoltura lipoprotéica derivada de la célula hospedera y en la cual se encuentran embebidas las glicoproteínas virales, una nucleocápside icosaédrica formada por múltiples copias de la proteína de la cápside y finalmente el RNA genómico (gRNA) viral. El virus encapsida dos copias del gRNA, que corresponden a RNAs de hebra simple y polaridad positiva, unidas por interacciones no covalentes. En la partícula viral el gRNA se asocia a la proteína de la nucleocápside y a las enzimas retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR) (Frankel and Young, 1998). Durante el ciclo replicativo, el gRNA es retrotranscrito por la enzima viral RT a una molécula de DNA de doble hebra, la cual migra al núcleo y es integrada por la enzima IN en el genoma de la célula hospedera (LaFemina *et al.*, 1992; Basavapathruni and

Anderson, 2007). El DNA integrado (provirus) es transcrito posteriormente por la RNA polimerasa II celular, dando origen a un mRNA que posee una estructura 5'cap, una región 5'UTR, una región codificante, una región 3'UTR y una cola poliadenilada (Sundquist and Kräusslich, 2012). Dependiendo del grado de procesamiento de corte y empalme (*splicing*) al que sea sometido este mensajero se generan tres poblaciones de mRNAs virales: aquellos que han sufrido *splicing* completo, aquellos que han sufrido un *splicing* parcial y el que no sufre *splicing* denominado mensajero completo o RNA genómico (gRNA). Los mRNAs virales son posteriormente transportados al citoplasma celular, lugar en el cual son reconocidos por la maquinaria traduccional del hospedero para llevar a cabo la síntesis de proteínas virales. En el caso particular del gRNA este puede además ser reconocido por la maquinaria de ensamblaje del virus siendo encapsidado para formar parte de las nuevas partículas virales (Balvay *et al.*, 2007).

#### **1.4 Inicio de la traducción de gRNAs retrovirales: el caso de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.**

Los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV codifican para las proteínas estructurales Gag y Gag-pol. El gRNA de HIV-1 posee dos elementos IRESs; uno localizado en la región 5'UTR (denominado HIV-1 IRES) el cual dirige la síntesis de la proteína Gag y otro presente en la región codificante para la proteína Gag (denominado IRES-*gag*) el cual dirige la síntesis de una proteína viral de 40 kDa de función hasta ahora desconocida (Buck *et al.*, 2001; Brasey *et al.*, 2003). Por lo tanto, el gRNA de HIV-1

puede iniciar la síntesis de la proteína Gag a través de un mecanismo cap y/o IRES-dependiente (Ricci *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que la traducción IRES-dependiente del gRNA de HIV-1 permite al virus asegurar la síntesis de Gag cuando la traducción cap-dependiente se ve inhibida como consecuencia de la replicación viral (Brasey *et al.*, 2003). Durante la infección por HIV-1, el virus induce el arresto del ciclo celular en el estadio G2/M (Emerman, 1996), inhibiendo la traducción cap-dependiente. Durante esta fase del ciclo celular las proteínas de unión al factor eIF4E (4E-BPs) se encuentran hipofosforiladas, estado en el cual compiten con la proteína puente eIF4G por la unión a eIF4E, impidiendo la formación del complejo eIF4F (Pyronnet and Sonenberg, 2001). Por otra parte, en estados tardíos de la infección por HIV-1, la proteína viral PR es capaz de procesar el factor eIF4G, inhibiendo su interacción con el factor eIF4E y por lo tanto afectando el inicio de la traducción cap-dependiente (Ventoso *et al.*, 2001; Ohlmann *et al.*, 2002; Perales and Carrasco, 2003). Más aún, se ha descrito qué en condiciones de estrés oxidativo y osmótico, situación en la cual la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida, el elemento HIV-1 IRES permite asegurar la síntesis de las proteínas virales (Monette *et al.*, 2009; Gendron *et al.*, 2011).

Al igual que HIV-1, los gRNAs de HTLV-1 y MMTV poseen un elemento IRES en su región 5'UTR (denominados HTLV-1 IRES y MMTV IRES, respectivamente) (Vallejos *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2014). A la fecha se desconoce la relevancia de la presencia de estos elementos en el gRNA viral. Sin embargo, y considerando la similitud que existe ente los mecanismos de regulación de la expresión génica entre los retrovirus,

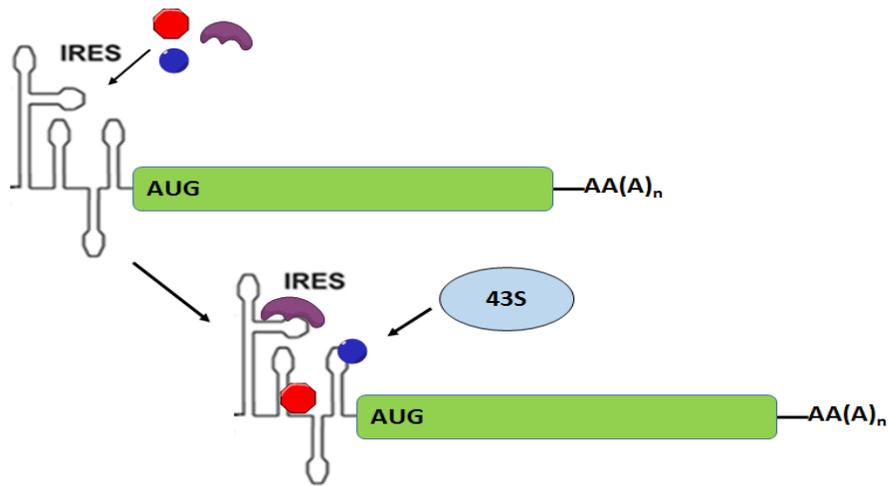
se postula que los elementos IRESs de HTLV-1 y MMTV permitirían asegurar la síntesis de la proteína Gag cuando la iniciación de la traducción cap-dependiente es inhibida durante el ciclo viral (Vallejos *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2014). En el caso de MMTV, se ha propuesto además que durante la formación de tumores y en condiciones de hipoxia (situación en la cual la traducción cap-dependiente se ve disminuida), la presencia de este elemento permitiría llevar a cabo la síntesis de las proteínas virales, asegurando la producción de las partículas retrovirales (Vallejos *et al.*, 2009).

Ensayos realizados *in vitro* para evaluar la actividad de los IRESs retrovirales, demuestran que el HIV-1 IRES no es activo en lisado de reticulocito de conejo (RLL) (Vallejos *et al.*, 2011). Sin embargo, al complementar el RRL con extractos preparados a partir de células HeLa, se observa actividad del IRES (Vallejos *et al.*, 2011). Más aún, la actividad del HIV-1 IRES incrementa al complementar el RRL con extractos de células HeLa arrestadas en la fase G2/M del ciclo celular (Vallejos *et al.*, 2011). En contraste con lo observado para el HIV-1 IRES, los IRESs de HTLV-1 y MMTV son activos en RRL. Más aún, en el caso particular de HTLV-1 IRES se observa un estímulo en la actividad traduccional al complementar el RRL con extracto de células HeLa arrestadas o no en el estadio G2/M del ciclo celular (Vallejos *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que la actividad del elemento MMTV IRES varía significativamente dependiendo del contexto celular en el que se encuentre (Vallejos *et al.*, 2009). Estas observaciones sugieren que los IRESs retrovirales requieren de factores celulares específicos para asegurar su actividad.

El mecanismo molecular utilizado por la maquinaria traduccional del hospedero para reconocer los elementos IRESs virales no ha sido del todo dilucidado. No obstante, diversos estudios han sugerido que la utilización de la estructura 5'cap y/o del elemento IRES para iniciar la traducción depende del contexto celular, y de proteínas celulares que actúen en *trans*, denominadas factores *trans* activadores de los IRESs (ITAFs) (Monette *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Por lo tanto, en conjunto estas observaciones sugieren que la actividad de los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV requiere de ITAFs. Más aun, dado que se observa una actividad diferencial de estos IRESs retrovirales en RRL o en diferentes tipos celulares, se puede proponer que el ITAF o el conjunto de ITAFs requeridos por cada uno de ellos es diferente.

### **1.5 Factores *trans* activadores de los IRESs (ITAFs)**

Los ITAFs corresponden a proteínas que se caracterizan por poseer motivos o dominios de unión a RNA y/o dominios de multimerización, lo que permite establecer interacciones proteína-RNA así como también proteína-proteína (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005). En la actualidad se desconoce con exactitud el mecanismo por el cual actúan los ITAFs sin embargo, se propone que estas proteínas actúan como chaperonas remodelando las estructuras de RNA que dan origen a los elementos IRESs (King, Cobbold and Willis, 2010) (Fig. 2).



**Figura 2. Representación esquemática de la función de los ITAFs sobre los elementos IRESs.** La interacción del elemento IRES con factores proteicos favorece su estructuración y el reclutamiento del complejo 43S permitiendo el inicio de la traducción (esquema adaptado de López-Lastra y cols., 2005).

Se ha descrito que un mismo ITAF puede interactuar con distintos elementos IRESs (King, Cobbold and Willis, 2010). Sin embargo, la regulación ejercida por un único ITAF sobre diferentes IRESs puede ser opuesta. Esto implica que la asociación de un ITAF con un elemento IRES puede favorecer el reclutamiento de la maquinaria de inicio de la traducción, mientras que el reclutamiento de este mismo ITAF sobre un IRES distinto puede reprimir el inicio de la traducción (Stoneley and Willis, 2004). A modo de ejemplo, la proteína río arriba de N-ras (Unr) estimula la actividad del elemento IRES presente en el mRNA del factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), pero reprime la traducción IRES-dependiente de su propio mRNA (Schepens *et al.*, 2007).

A su vez, se ha descrito que la actividad de un IRES puede estar regulada por la asociación de más de un ITAF. Por ejemplo, el IRES de rinovirus requiere de la proteína de unión al tracto de polipirimidina 1 (PTB-1), Unr, La y de la proteína 2 de unión a poli

(rC) PCBP2 para reclutar de manera eficiente la maquinaria de inicio de la traducción (Martínez-Salas *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que la participación de los ITAFs en el inicio de la traducción dependiente de un IRES puede, en algunos casos, depender de modificaciones postraduccionales a las que éstos sean sometidos. De esta forma, un cambio en la estructura de estas proteínas puede modificar su localización en la célula, así como también su capacidad de interactuar con el mRNA y por tanto de regular la actividad del IRES (Monette *et al.*, 2009).

Dada la relevancia de los ITAFs en la actividad IRES diversos estudios se han focalizado en su identificación. Es así como en la búsqueda de la(s) proteína(s) responsable(s) de modular la actividad del HIV-1 IRES, trabajos anteriores han identificado las proteínas: polipéptido caja 3 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)(DDX3), eIF5A, ribonucleoproteína heterogeneonuclear A1 (hnRNPA1) y proteína tipo ELAV humana (visión anormal letal embrionaria)(HuR) (Bériault *et al.*, 2004; Monette *et al.*, 2009; Rivas-Aravena *et al.*, 2009), como moduladores (activadores o represores) de la actividad del elemento HIV-1 IRES.

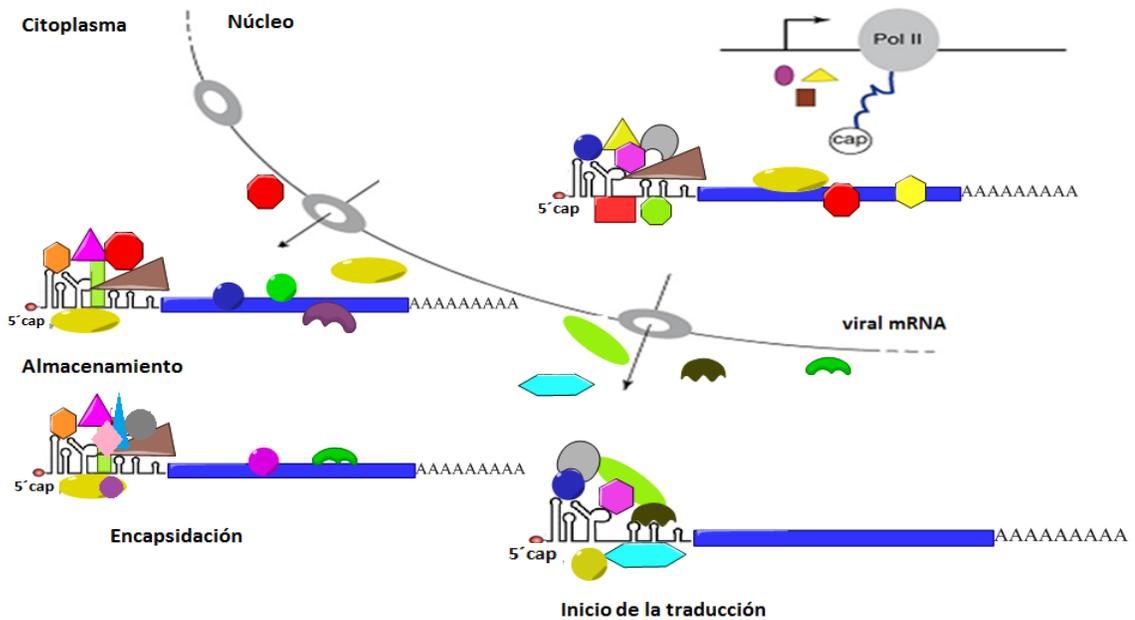
La ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNPA1), cuya localización es preferentemente nuclear, ha sido identificada como un modulador positivo de la actividad traduccional del elemento HIV-1 IRES. Se ha observado que durante la replicación de HIV-1, hnRNPA1 migra desde el núcleo hacia el citoplasma asociada al RNA viral regulando el inicio de la traducción mediado por el elemento HIV-1 IRES (Bériault *et al.*, 2004; Monette *et al.*, 2009). Diversos estudios indican que el gRNA de HIV-1 requiere, al igual que los mRNAs celulares, un paso por el núcleo celular para ser reconocido por

la maquinaria traduccional (Cochrane, McNally and Mouland, 2006; Semler and Waterman, 2008). En este contexto se ha demostrado que la transfección de RNAs bicistrónicos que posean el HIV-1 IRES en células HeLa, resulta en una nula actividad traduccional (Olivares, 2014). Lo mismo se ha evidenciado para los RNAs bicistrónicos que poseen el elemento HTLV-1 IRES (Olivares, 2014).

Durante la síntesis de los gRNAs retrovirales diversos factores nucleares interactuarían, de forma directa o indirecta, con el RNA (Ej. hnRNPA1), formando al menos un complejo ribonucleoproteico (RNP) el cual participaría en la etapa de transporte del RNA viral (Monette *et al.*, 2009). Se ha postulado que este complejo RNP migraría hacia el citoplasma unido al RNA, lugar en el que posteriormente podría ser modificado debido a la interacción con diversas proteínas citoplasmáticas. Según el contexto celular, la interacción de determinados factores proteicos con el RNA podría determinar la localización de esta molécula en el citoplasma, su tiempo de vida media y su asociación con la maquinaria traduccional para dirigir el inicio de la traducción cap- o IRES-dependiente, como se ha descrito ocurriría para algunos mRNAs celulares (Semler and Waterman, 2008) (Fig. 3).

En base a estos antecedentes y al comportamiento diferencial que se observa para la actividad de los IRESs provenientes de la misma familia viral (HIV-1 IRES, HTLV-1 IRES y MMTV IRES), se sugiere que el reclutamiento de proteínas celulares y por tanto la formación de los complejos ribonucleoproteicos sobre los gRNAs retrovirales es distinto. Se propone por tanto la identificación de al menos una proteína celular que forme parte del complejo RNP y el estudio de su función sobre la regulación del inicio de la traducción

del gRNA retroviral. Se sugiere que los resultados obtenidos ayudarían a comprender cómo la asociación de factores proteicos al gRNA, determinan su utilización por la maquinaria traduccional.



**Figura 3. Representación esquemática de la interacción entre los elementos IRESs retrovirales y factores proteicos.** Durante la síntesis del gRNA retroviral en el núcleo distintos factores celulares interactúan con la región 5'UTR formando complejos RNP. Posteriormente, el gRNA asociado a los complejos RNP es transportado hacia el citoplasma, lugar en el cual éstos pueden ser modificados. Dependiendo de los complejos RNP finales que se ensamblen sobre el gRNA se definirá su destino en la célula (esquema adaptado de Semler y cols., 2008).

## **Hipótesis**

El inicio de la traducción IRES dependiente de los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV es regulada por complejos ribonucleoproteicos compuestos por proteínas celulares diferentes a los factores de inicio de la traducción.

### **Objetivo general**

Identificar y evaluar la participación de proteínas celulares, diferentes de los factores canónicos utilizados en la síntesis de proteínas celulares, en la traducción del gRNA de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar proteínas celulares, diferentes de los factores canónicos utilizados en la síntesis de proteínas celulares, que interactúen con la región 5'UTR del gRNA de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.
2. Evaluar la participación de al menos una de las proteínas identificadas en el objetivo 1 sobre la traducción de los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cultivo celular

Células Cos-7 (ATCC: CRL-1651) y HEK293T (ATCC: ACS-4500) fueron cultivadas en medio DMEM (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT) complementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone), 2.5  $\mu\text{g}$  de fungizona (HyClone), 100 U/ml de penicilina (HyClone) y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina (HyClone). Las células Jurkat (J77) fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute con Glutamax (RPMI, Gibco), suplementado al igual que el medio DMEM. Las células fueron cultivadas en un ambiente al 5% en  $\text{CO}_2$  y 37°C.

### 2.2 Vectores

El vector que permite la expresión de la proteína PTB1 de manera exógena se generó como parte del trabajo de tesis de magister de Constanza Pino (Pino, 2011). Brevemente, se amplificó por PCR la región codificante de la proteína desde el vector pSPORT-PTB1 (donado por el Dr. M. García-Blanco, Duke University, USA) utilizando los partidores *Bam*HI-PTB-F (5'-GGA TCC ATG GAC GGC ATT GTC CCA G-3') y *Eco*RI-PTB-R (5'-GAA TTC CTA GAT GGT GGA CTT GGA G-3'). El fragmento obtenido fue resuelto en un gel de agarosa, purificado y clonado en el vector pGEMTt-easy. La incorporación del fragmento en el vector se verificó por PCR utilizando los

partidores T7-F (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y *EcoRI*-PTB-R. Posteriormente, el fragmento con la región codificante de PTB1, se liberó desde el vector utilizando las enzimas de restricción *BamH* y *EcoRI* y se clonó en el vector pcDNA4/HisMax TOPO digerido previamente con las mismas enzimas de digestión. La correcta incorporación del fragmento en el vector se evaluó por PCR utilizando los partidores *BamHI*-PTB-F y *EcoRI*-PTB-R. La construcción resultante se denominó pcDNA4/HisMax/PTB1 y permite obtener la proteína PTB1 fusionada a un *tag* de histidina (PTB-His).

Los vectores pcDNA4/HisMax/PTB1 mut1.2 y pcDNA4/HisMax/PTB1 mut3.4 fueron generados por sobrelapamiento de productos de PCRs utilizando como molde de DNA los vectores PTB4 1.2mut o PTB4 3.4mut donados gentilmente por el Dr. Christopher Smith (Department of Biochemistry, University of Cambridge). Para la amplificación se utilizaron los partidores PTB1C-terFOR (5'-CCT TCG GCC TTT CCG TTC CGA ACG TCC-3') y PTB1R-EcoRI (5'-GGG AAG GAA TTC CTA GAT GGT GGA CTT GGA G-3') los cuales permiten obtener el segmento C-terminal y los partidores PTB1F-BamHI (5'-GGG AAG GGA TCC ATG GAC GGC ATT GTC CCA G-3') y PTB1N-terRov (5'-GGA AAG GCC GAA GGC CGC GGC CAT G-3') para obtener el segmento N-terminal. Una vez realizado el sobrelapamiento, los fragmentos fueron amplificados con los partidores PTB1F-BamHI y PTB1R-EcoRI, digeridos con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* y clonados posteriormente en el vector pcDNA4/HisMax/PTB digerido previamente con las mismas enzimas de restricción.

El vector pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HTLV-1/3BoxB se construyó a partir del fragmento de DNA <sup>5'</sup>UTRHTLV-1/3BoxB sintetizado químicamente (GeneArt, life technology). Para ello el fragmento de DNA se digirió con las enzimas *NheI* y *NotI* (Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se clonó en el vector pcDNA3.1(+) digerido previamente con las mismas enzimas.

Para la obtención del vector pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HIV-1/3BoxB se amplificó la región <sup>5'</sup>UTR de HIV-1 desde el vector dl HIV-1 IRES (Brasey *et al.*, 2003) utilizando los partidores 1-336-F-*NheI* (5'-CTA TAG GCT AGC GGT CTC TCT GGT TAG-3') y 1-336-R-*EcoRI* (5'-CTA TAG GAA TTC TCT CTC TCC TTC TAG CCTC-3'). Posteriormente, los productos de PCR se digirieron con las enzimas *NheI* y *EcoRI*, se purificaron con el kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega) y se clonaron en el vector pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HTLV-1/3BoxB digerido previamente con las mismas enzimas de restricción.

Para la obtención del vector pcDNA3.1(+)<sup>3'</sup>BoxB, el vector pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HTLV-1/3BoxB se digirió con las enzimas *NheI* y *EcoRI* y los extremos del fragmento de DNA se rellenaron utilizando la enzima Klenow (EP0054, Thermo Scientific) de manera de obtener extremos cohesivos. Posteriormente, el vector se re-ligo utilizando la enzima T4 ligasa (EL0014, Thermo Scientific).

El vector pcDNA4/HisMax/hnRNPU que permite la expresión de la ribonucleoproteína heterogénea nuclear U (hnRNPU) se construyó amplificando por PCR la región codificante de la proteína hnRNPU a partir del vector pET15b/hnRNPU utilizando los partidores hnRNPU-F (5'- GGA TTC ATG AGT TCC TCG CCT GTT AAT GTA AAA AAG-3') y hnRNPU-R (5'-GAA TTC TCA ATA ATA TCC TTG GTG

ATA ATG CTG ACT CC-3'). Posteriormente, los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa, se purificaron como se describió previamente y se clonaron en el vector pGEMT-easy (Promega) obteniendo la construcción pGEMT/hnRNPU. La incorporación de los productos de PCR en el vector se verificó por PCR utilizando los partidores T7-F y hnRNPU-R. A continuación, el vector pGEMT/hnRNPU se sometió a digestión utilizando las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, permitiendo liberar el fragmento correspondiente a la región codificante de la proteína hnRNPU. Posterior a su purificación, el fragmento se clonó en el vector pcDNA4/HisMax TOPO el que se digirió previamente con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. La incorporación del fragmento en el vector se evaluó por PCR utilizando los partidores hnRNPU-F y hnNRPU-R.

A partir del vector pcDNA4/HisMax/hnNRPU se generó posteriormente el vector pcDNA4/HisMax/hnNRPUmut. Para ello la región codificante de hnRNPU se amplificó por PCR desde el vector utilizando los partidores hnRNPU-F y hnRNPU-Rmut (5'-GAA TTC TCA ATT GAA TCC TCC ACG TCC TCT ATG-3'). Los productos de PCR se sometieron posteriormente a digestión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, se purificaron y clonaron en el vector pcDNA4/HisMax/hnNRPU digerido previamente con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*. La incorporación del fragmento en el vector se evaluó por PCR utilizando los partidores hnRNPU-F y hnNRPU-Rmut.

Los vectores dl  $\Delta$ EMCV, dl HCV IRES, dl HTLV-1 IRES, dl MMTV IRES,  $\Delta$ SV40 dl  $\Delta$ EMCV,  $\Delta$ SV40 dl HTLV-1,  $\Delta$ SV40 dl HIV-1 IRES, pTCN-NCL, pNL4.3-RLuc y pCMV6-AC-GFP (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) utilizados en este trabajo han sido previamente descritos en la literatura (Wilson *et al.*,

2000; Barría *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2009; Soto-Rifo *et al.*, 2012; Olivares *et al.*, 2014; Salvetti *et al.*, 2016)

Todas las construcciones originadas en esta tesis fueron confirmadas por análisis de secuencia (Macrogen Corp., Rockville, MD, USA).

### **2.3 Transcripción *in vitro*.**

Para sintetizar los RNAs utilizados en el ensayo GRNA, los vectores pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HTLV-1/3BoxB, pcDNA3.1(+)<sup>5'</sup>UTR HIV-1/3BoxB y pcDNA3.1(+)<sup>3'</sup>BoxB generados previamente se linealizaron con la enzima de restricción *NotI*. Posteriormente los vectores linealizados se utilizaron en ensayos de transcripción *in vitro* por 2 horas a 37°C utilizando la enzima T7 RNA polimeraza (Fermentas), 5 mM DTT, 2 mM rNTP's, 1X tampón de transcripción y 0.04 U de inhibidor de RNAsas. Posterior a la síntesis, los RNAs se trataron con la enzima DNAsa Turbo (Ambion) por 15 minutos (min) a 37°C de manera de eliminar el DNA presente en la reacción. Luego, los RNAs se purificaron mediante precipitación con LiCl (Ambion). Para esto, se agregó LiCl a una concentración final de 2.5 M y la reacción se incubo por 3 horas a -20 °C. Luego, los tubos se centrifugaron a 16.000 *g* por 30 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas. Los RNAs obtenidos se denominaron: 3BoxB, <sup>5'</sup>UTR HIV-1/3BoxB y <sup>5'</sup>UTR HTLV-1/3BoxB.

La concentración de los RNAs se determinó mediante análisis de espectrofotometría (NanoDrop, Technology, Wilmington, DE, USA) y la integridad se analizó por electroforesis en gel de agarosa desnaturante.

## **2.4 Expresión y purificación proteína GλH**

Para la expresión de la proteína GλH, bacterias *Escherichia coli* BL21-CodonPlus se transformaron con el vector pGλH (donado por el Dr. Matthias Hentze, Laboratorio de Biología Molecular Europeo, Unidad de Expresión Génica, Heidelberg, Alemania) en el cual se encuentra la región codificante de la proteína. Las bacterias transformadas se crecieron hasta OD<sub>600</sub> 0,4 y luego se indujeron con 1 mM de IPTG por 4 horas. Posterior a la inducción, las células se centrifugaron y el pellet obtenido se resuspendió en tampón de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 % v/v glicerol y 1 mM PMSF) complementado con 1 mM de DTT y Tritón X-100 0.1 % final. La lisis de las células se realizó por sonicación (Sonic Ruptor 250, Omni international) y el lisado obtenido se centrifugo a 3.200 g por 30 min a 4°C.

Posterior a la centrifugación el sobrenadante se incubó con esferas de glutatión-sefarosa (GE Healthcare) (equilibradas previamente en tampón de lisis) a 4°C por 3 horas. Transcurrido este tiempo, las esferas se centrifugaron por 7 min a 1.700 g y el sobrenadante se descartó. Posteriormente, las esferas se lavaron 3 veces con Buffer de lisis y se centrifugaron a 1.700 g por 7 min.

Para realizar la elución y concentración de la proteína GλH, el tampón de lisis se complementó con 20 mM de glutatión y la fracción obtenida se concentró utilizando

columnas Amicon Ultra-0.5 mL 10 K (Milipore). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) y la detección de la misma se realizó por western blot.

## **2.5 Extractos celulares**

### **2.5.1 Extractos celulares: ensayo GRNA**

La preparación del extracto citoplasmático a partir de células Jurkat se llevó a cabo utilizando el Kit Nuclear/Cytosol Fractionation según especificaciones del fabricante (#K266-25, BioVision, USA). Para la obtención del extracto nuclear, células Jurkat se crecieron en 500 mL de medio RPMI hasta obtener  $6.0 \times 10^5$  células/mL y posteriormente se centrifugaron a 300 g por 7 min. El pellet obtenido se lavó dos veces con PBS 1X, se resuspendió en tampón NE-1 (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, complementado con inhibidor de proteasas) y se incubó por 10 min en hielo. Transcurrido este tiempo, las células se lisaron utilizando un homogeneizador Dounce y una jeringa con aguja de 30G y el lisado obtenido se centrifugó a 250 g por 10 min a 4°C. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en tampón NE-2 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 M NaCl, 25 % v/v Glicerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, complementado con inhibidor de proteasas), se sonicó en frío y se incubó en hielo por 30 min.

Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 21.000 g por 30 min a 4°C y el sobrenadante se conservó como la fracción nuclear.

### **2.5.2 Extractos celulares: localización de la proteína hnRNP**

Para la preparación de los extractos,  $15 \times 10^6$  células Jurkat, Cos-7 y HEK293T fueron centrifugadas a 340 g por 5 min. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer PBS 1X; 1 ml se utilizó para la preparación del extracto celular completo y el otro ml se utilizó para obtener las fracciones citoplasmática y nuclear. Para la preparación del extracto celular completo, las células fueron centrifugadas a 500 g por 5 min. a 4°C. Transcurrido el tiempo, el pellet obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer RIPA (Tris-HCl pH 7.5 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM, NP-40 0.5%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1 % e inhibidor de proteasas Roche) se sónico en frío y se conservó como el extracto celular completo.

Para la obtención de las fracciones nuclear y citoplasmática, las células fueron centrifugadas a 500 g por 5 min. a 4°C. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer RLNa (10 mM de Tris-HCl (pH 8), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,5% NP40, 10 U/ $\mu$ l de inhibidor de RNAsas) y se incubó en hielo por 5 min. Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 16.000 g por 3 min. El sobrenadante obtenido se rescató, se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas previamente y se conservó como la fracción citoplasmática.

Por otra parte, el pellet obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer RLNa y se centrifugó a 16.000 g por 3 min. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer RIPA, se sónico en frío y el lisado obtenido se conservó como la fracción nuclear.

La especificidad de la preparación de los extractos descritos previamente se evaluó mediante ensayos de western blot utilizando anticuerpos que reconocen proteínas presentes en el núcleo (Nucleolina o PARP) o en el citoplasma ( $\alpha$ -tubulina).

## **2.6 Western blot**

Para llevar a cabo los ensayos de western blot, las células fueron lisadas con Buffer de lisis pasivo (Promega) y la concentración de los extractos se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Para la detección de las proteínas nucleolina,  $\alpha$ -tubulina, actina y GADPH, 30  $\mu$ g del total de proteínas fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 12% y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para la detección de las proteínas hnRNPU, hnRNPU-His, hnRNPUmut-His y PARP, 30  $\mu$ g del total de proteínas fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 10% y luego transferidos a una membrana de PDVF (Thermo Scientific). Para la detección de la proteína PTB-His y PTB endógena, 40 y 30  $\mu$ g del total de proteínas fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 10 y 12% y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa y PDVF respectivamente.

Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 1 hora con TBS 1X, 5 % de leche descremada y 0.1 % de tween 20. Transcurrido el tiempo se lavaron 3 veces por 5 min con TBS 1X y 0.1 % de tween 20 y se incubaron durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios según corresponda: anti-nucleolina (sc-17826, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) diluido 1:10.000, anti- $\alpha$ -tubulina (#T5168,

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluido 1:5.000, anti-actina (#08691001, MP Biomedicals, Solon, OH, USA) diluido 1:10.000, anti-GAPDH (#MAS-15738, Thermo Scientific) diluido 1:5.000, anti-Histidina diluido 1:5.000 (#H1029 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-hnRNP diluido 1:5.000 (sc-365852, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA), anti-PTBP1 (#8776, Cell signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA) diluido 1: 1.000 y anti-PARP (# 9542, Cell signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA) diluido 1:1.000. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS 1X y 0.1 % de tween 20 y luego se incubaron por 1.5 horas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1: 10.000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). La presencia de cada una de las proteínas se visualizó por separado a través de una reacción de quimioluminiscencia que fue capturada utilizando placas fotográficas

## **2.7 Ensayo GRNA**

Para llevar a cabo el ensayo GRNA, 10 µg del RNA 3Boxb se incubaron con 90 µg de la proteína GλH por 1 hora a 4°C. Posteriormente, el complejo 3BoxB/GλH se mezcló con 300 µg del extracto citoplasmático o nuclear por 45 min a 4°C y luego se agregó sobre una solución de esferas de glutatión-sefarosa equilibradas previamente en tampón de unión (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.7 % v/v glicerol, 0.05 % de NP-40 y 12 µg/mL de Heparina) por 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugo y el sobrenadante se incubó nuevamente con el complejo 3BoxB/GλH. Esta etapa comprendió la “clarificación del extracto”.

De forma paralela a la etapa descrita previamente, 10 µg de los RNAs 5'UTR-HIV-1/3BoxB, 5'UTR-HTLV-1/3BoxB o 3BoxB se incubaron con 90 µg de la proteína GλH por 1 h a 4°C. Posteriormente los complejos RNA/GλH se incubaron por 45 min a 4°C con los extractos citoplasmáticos o nuclear obtenidos de la etapa de “clarificación” y se mezclaron con esferas de glutatión-sefarosa por 1 hora a 4°C. Luego de una etapa de centrifugación, los sobrenadantes se descartaron y los pellets se lavaron tres veces con tampón de unión para luego realizar una incubación por 45 min con RNasa A. Una vez centrifugadas las muestras, los sobrenadantes se rescataron y se resolvieron en un gel SDS-PAGE en gradiente. La identificación de las proteínas presentes en cada muestra se realizó por espectrometría de masas Nano LC-MS/MS (Applied Biomics, Inc. Hayward, CA).

## **2.8 Análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas**

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas permitieron identificar diversas proteínas que interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1. Para filtrar y analizar estos resultados, las proteínas obtenidas fueron sometidas a un análisis sustractivo. En el experimento, las proteínas obtenidas con el RNA 3Boxb se consideraron como el “*background*” y se eliminaron de las listas de proteínas obtenidas para el RNA 5'UTR-HIV-1/3BoxB o 5'UTR-HTLV-1/3BoxB. Posterior a este análisis, las proteínas fueron además seleccionadas utilizando como patrón de comparación los resultados obtenidos de un experimento “*pull down*” que se realizó previamente por nuestro laboratorio utilizando una estrategia alternativa (Vallejos *et al.*, 2011), de manera

que solo las proteínas que fueron detectadas utilizando ambas estrategias experimentales se muestran en los resultados.

## **2.9 Medición de la actividad enzimática de las proteínas luciferasa de Renilla (RLuc) y luciferasa de luciérnaga (FLuc).**

Para medir las actividades enzimáticas de las proteínas RLuc y FLuc se utilizaron 20 µl de lisado celular y el kit *DLR assay system* (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción fue seguida utilizando un luminómetro Sirius de tubo único (Berthold Detection Systems GmbH, Germany).

## **2.10 Transfección de RNAs interferentes (siRNA)**

Para silenciar la expresión de la proteína RLuc,  $5.5 \times 10^4$  células HEK293T y Cos-7 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzado el 60-70% de confluencia, las células fueron co-transfectadas con 200 ng de los vectores bicistrónicos retrovirales dl HIV-1 IRES, dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES y con diferentes concentraciones (50, 100 o 250 nM) de un siRNA que hibrida con la región codificante de la proteína RLuc (RLuc-siRNA, 5'-UAUA AGA ACC AUU ACC AGA UUU GCC UG-3'; IDT, Coralville, Iowa, USA) utilizando el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen). Como control para cada punto de transfección se utilizó el silenciador negativo N°1 siRNA (#4390844; Ambion, ThermoFisher Scientific Inc) también denominado *scramble* (SC) bajo las mismas condiciones.

A 24 horas post transfección las células fueron rotas utilizando Buffer de lisis pasivo y las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc fueron determinadas.

Para silenciar la expresión de la proteína PTB  $8.0 \times 10^4$  células HEK293T fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. Alcanzado el 60-70% de confluencia, las células fueron co-transfectadas con 100ng del vector bicistrónico dl MMTV en conjunto con 375 ng del vector vacío pSP64-poly(A) y con 75 nM de una mezcla de siRNA contra el mRNA de PTB (siRNA PTBP1; 5'-AAC UUC CAU CAU UCC AGA GAA-3', siRNA PTBP2; 5'-GAG AGG AUC UGA CGA ACU A-3' and SMARTpool siGENOME PTBP1 siRNA (# M-003528-02, GE Healthcare Dharmacon Inc, Piscataway, NJ, USA) o con 75nM del siRNA-SC.

A las 48 horas post transfección las células fueron rotas utilizando buffer de lisis pasivo; las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc fueron determinadas y una alícuota del lisado fue utilizada para evaluar el silenciamiento de PTB mediante western blot.

El silenciamiento en la expresión de las proteínas Nucleolina y hnRNPU se llevó a cabo sembrando  $11 \times 10^4$  células Cos-7 o HEK293T en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzado el 60-70% de confluencia, cada línea celular fue co-transfectada con 100 ng de los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1 y dl MMTV en conjunto con 375 ng del vector vacío pSP64-poly(A) y con 100 nM de un siRNA que permite silenciar la expresión endógena de nucleolina (sc-29230, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) o hnRNPU (sc-38298, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) respectivamente. Como control se utilizó el silenciador negativo N°1 siRNA descrito previamente.

Transcurridas 48 horas post transfección las células fueron rotas utilizando buffer

de lisis pasivo; las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc fueron determinadas y una alícuota de cada lisado fue utilizada para evaluar el silenciamiento de Nucleolina y hnRNP-U mediante western blot.

## 2.11 Transfecciones de DNA

Para determinar la actividad IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV y para los análisis de la actividad de promotor críptico,  $1.1 \times 10^5$  células HEK293T y Cos-7 fueron cultivadas en placas de 12 pocillos y crecidas hasta que alcanzaron el 60-70% de confluencia. Posteriormente, fueron co-transfectadas con 400 ng de los vectores bicistrónicos retrovirales dl HIV-1 IRES, dl HTLV-1 IRES, dl MMTV IRES y en el caso de los ensayos de actividad de promotor críptico con los vectores  $\Delta$ SV40 dl HIV-1,  $\Delta$ SV40 dl HTLV-1 y  $\Delta$ SV40 dl MMTV (carecen del promotor SV40) utilizando para ello el reactivo polietilenimina (PEI). Para controlar la eficiencia de la transfección, 50 ng del plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, fueron incorporados a cada condición experimental. Como control negativo de actividad IRES se utilizó un vector bicistrónico que posee la región 5'UTR del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) mutada y que da origen al elemento IRES de EMCV no funcional denominado dl  $\Delta$ EMCV.

Para evaluar la participación de la proteína PTB1 en la traducción IRES-dependiente de MMTV,  $5.5 \times 10^4$  células HEK293T fueron co-transfectadas con 100 ng de los vectores dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HCV o dl MMTV, 25 ng del plásmido pcDNA 20 *Z* y con 125 o 375 ng del vector pcDNA4/HisMax/PTB.

A continuación, se evaluó el impacto de la sobreexpresión de las proteínas PTB mutantes sobre la traducción IRES-dependiente de MMTV. Para ello,  $5.5 \times 10^4$  células HEK293T fueron co-transfectadas con 100 ng del vector dl MMTV, 25 ng del plásmido pcDNA 3.1 LacZ y con 375 ng de los vectores pcDNA4/HisMax/PTB, pcDNA4/HisMax/PTB mut1.2 y pcDNA4/HisMax/PTB mut3.4.

Para evaluar el impacto de la sobreexpresión de las proteínas nucleolina, hnRNPU y hnRNPUmut en la traducción IRES-dependiente retroviral,  $5.5 \times 10^4$  células HEK293T y Cos-7 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta que alcanzaron el 60-70% de confluencia. Luego, las células se co-transfectaron con el reactivo jetPEI utilizando 100 ng de los vectores dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV, 25 ng del plásmido pcDNA 3.1 LacZ y con concentraciones crecientes de los vectores pTCN-NCL, el cual codifica para la proteína nucleolina, pcDNA4/HisMax/hnNRPU o pcDNA4/HisMax/hnNRPUmut.

Para todos los ensayos descritos previamente, 24 horas post-transfección las células se lisaron utilizando Buffer de lisis pasivo; 20  $\mu$ l de lisado celular fueron utilizados para medir la actividad de las proteínas reporteras y el lisado remanente se utilizó para evaluar la sobreexpresión de las proteínas mediante western blot.

## **2.12 Microscopía de fluorescencia**

$5.5 \times 10^4$  células HEK293T fueron sembradas sobre un cobertor de vidrio hasta que alcanzaron un 60% de confluencia. Posteriormente, las células se transfectaron con 200

ng del vector psp64 o con 200 ng del vector pNL4.3-RLuc. Luego de 24 horas post transfección, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3 % por 10 min. Luego, las células se lavaron nuevamente y se incubaron por 30 min con una solución de bloqueo y permeabilización preparada en PBS 1X con 1 % de suero fetal bovino y tritón X-100 0,3 %. Posteriormente, cada cobertor de vidrio se incubo toda la noche con el anticuerpo primario anti-hnRNPU diluido 1:200. Al día siguiente las células se lavaron tres veces por 5 min cada vez con PBS 1X complementado con tween 10 0,05 % y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min con el anticuerpo secundario Alexa fluor 555 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) diluido 1:200. Transcurrido el tiempo las muestras se incubaron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 710301, KPL Inc.) por 7 min a temperatura ambiente. Posteriormente los cobertores se lavaron y montaron en medio de montaje DAKO (S3023, DAKO Denmark A/S).

Las imágenes se capturaron con magnificación 60X utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y se procesaron con el programa ImageJ.

### **2.13 Ensayos de unión: UV crosslinking e inmunoprecipitación (UV-CLIP)**

Para realizar el ensayo,  $3.5 \times 10^6$  células HEK293T fueron sembradas en placas de 100 mm y crecidas hasta que alcanzaron el 60-70% de confluencia. Posteriormente, fueron co-transfectadas con 5  $\mu$ g de los vectores dl MMTV, dl HIV-1 o dl EMCV junto con 20  $\mu$ g del vector pcDNA4/HisMax/PTB o del vector pCMV6-AC-GFP (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA), utilizado como control de sobreexpresión. 48

horas post transfección el medio fue removido, las células fueron lavadas, mantenidas en 7 mL de buffer PBS 1X frío e irradiadas con luz UV (400 mJ/cm<sup>2</sup>). Posteriormente las células fueron recolectadas y centrifugadas a 4°C. El pellet obtenido fue luego resuspendido en 3 mL de buffer RIPA complementado con 3 µL de Riboblock (Fermentas) y 6 µL de DNAsaRQ1 (Promega) para luego ser sonificado (en hielo) dos veces por 20 segundos utilizando un 40% de amplitud. El contenido de proteínas fue determinado utilizando el kit de detección BCA (Thermo Scientific).

El lisado completo obtenido fue posteriormente preclarificado por 1 hora a 4°C utilizando esferas de agarosa recubiertas con proteína G (Calbiochem, Merck Millipore), las cuales fueron previamente bloqueadas con 1mg/mL de BSA. Luego de la preclarificación, una alícuota del lisado fue recolectada y almacenada como el “input” del experimento mientras que el resto del lisado fue utilizado para realizar los ensayos de inmunoprecipitación (IP) o extracción de RNA. Para los ensayos de IP, las esferas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-His o anti-IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) como control y fueron incubadas durante toda la noche con el lisado. Posteriormente las esferas fueron lavadas con buffer RIPA y con buffer salino (Tris-HCl pH 7.5 50mM, NaCl 1M, EDTA 1mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1 %).

Las proteínas obtenidas fueron luego resueltas en un gel de poliacrilamida en tris-tricina al 12%, transferidas a una membrana de PDVF, bloqueada e incubada con los anticuerpos primarios anti-His, anti-PTB o anti GAPDH. Como anticuerpo secundario se utilizó la proteína G diluida 1:10.000 conjugada a peroxidasa de rábano (Thermo

Scientific)

Para la extracción de RNA, las muestras fueron incubadas previamente con proteinasa K y luego tratadas con el reactivo Trizol según indicaciones del fabricante (Life Technologies). Los RNAs obtenidos fueron tratados con DNAsa I (Ambion) y utilizados en un ensayo de RT-qPCR utilizando el kit *Brilliant II SYBR green qRT-PCR master mix* (Agilent) y los partidores para amplificar la región codificante de FLuc o GAPDH descritos previamente (Vera-Otarola *et al.*, 2010, 2012). Las veces de enriquecimiento fueron posteriormente calculadas utilizando la siguiente formula:  $2^{-\Delta\Delta Ct [His/IgG]}$  o  $2^{-\Delta\Delta Ct [HA/IgG]}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

#### **2.14 Análisis estadístico**

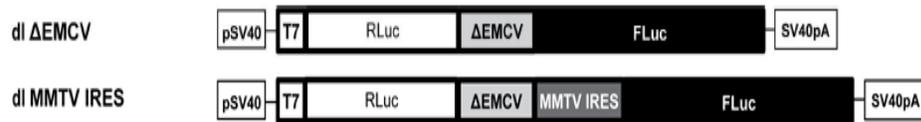
Los gráficos y análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad versión 5 (La Jolla, CA 92037, USA). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante t-test o ANOVA según corresponda seguido de los post-test indicados en cada experimento.

### 3. RESULTADOS

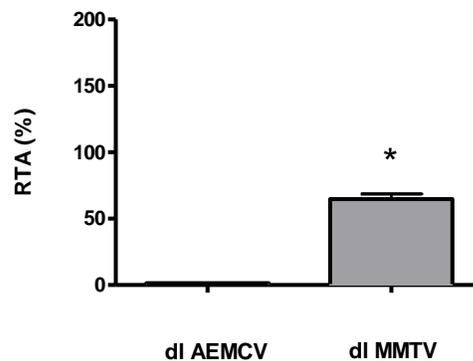
#### 3.1 Caracterización de la actividad del IRES de MMTV.

Previo a estudiar el posible rol de los ITAFs en la actividad del MMTV IRES, se decidió caracterizar la actividad de este elemento en células HEK293T, modelo celular elegido para conducir el trabajo experimental. La selección de HEK293T se sustenta en trabajos que establecen que diferentes procesos asociados a MMTV son funcionales en este contexto celular (Vallejos *et al.*, 2009; Boeras, Sakalian and West, 2012). La ventaja principal de esta línea celular es que es fácilmente transfectable. Sin embargo, la actividad del MMTV IRES sólo ha sido caracterizada de forma parcial en células HEK293T (Vallejos *et al.*, 2009). Por ello, células HEK293T se transfectaron con 400 ng del vector bicistrónico que posee la secuencia del elemento IRES de MMTV (dl MMTV) (Fig. 4A) junto con 50 ng del plásmido pcDNA 3.1 *LacZ*. Como control en este ensayo se utilizó el vector bicistrónico dl  $\Delta$ EMCV que carece de actividad IRES, descrito previamente en la sección 2.11 de materiales y métodos. Transcurridas 24 horas las células se lisaron y se determinaron las actividades enzimáticas de RLuc, que da cuenta de la actividad cap-dependiente y FLuc, que da cuenta de la actividad IRES-dependiente como se describió en materiales y métodos. Posteriormente, los resultados fueron expresados en porcentaje de actividad traduccional relativa (% RTA) lo que corresponde a la razón entre las actividades de FLuc y RLuc (Fig. 4B).

**A**



**B**

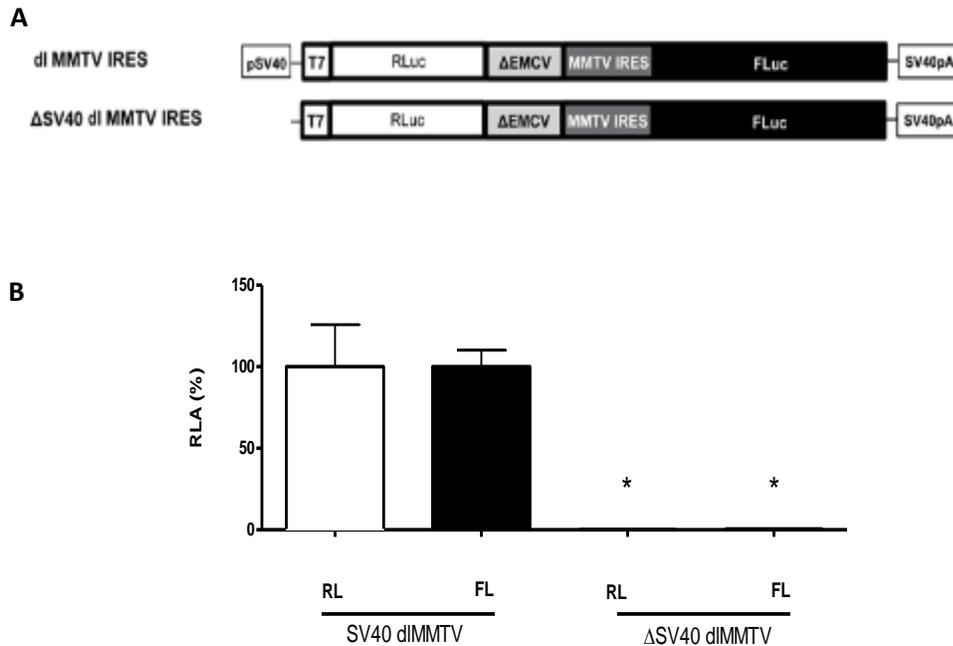


**Figura 4. El elemento MMTV IRES es activo en células HEK293T.** (A) Representación esquemática de las construcciones bicistrónicas (dl) utilizadas. El RNA mensajero bicistrónico es expresado desde el promotor SV40 y es poliadenilado gracias a la señal SV40 poly(A). (B) Los vectores descritos en A se transfectaron en células HEK293T en conjunto con el vector pcDNA3.1 *LacZ*, el cual expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa y que es utilizado como control de transfección. Las actividades de las proteínas reporteras RLuc y FLuc fueron medidas y expresadas como (%) RTA. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados sugieren que el elemento MMTV IRES es funcional en células HEK293T.

Una crítica al sistema de vectores bicistrónicos es la obtención de falsos positivos debido a la posible presencia de un promotor crítico en la región 5'UTR analizada o debido a la generación de mRNAs de menor tamaño producidos por *splicing* alternativo

(Baranick *et al.*, 2008; Lemp *et al.*, 2012). En ambos casos el resultado sería la generación de un mRNA 5'cap monocistrónico para FLuc. Por ello, y con el propósito de determinar si la actividad FLuc obtenida al transfectar el vector bicistrónico dl MMTV se debe a la generación de mRNAs monocistrónicas, las células HEK293T se transfectaron con el vector bicistrónico dl MMTV o con el vector  $\Delta$ SV40 dl MMTV el cual carece del promotor SV40 (Fig. 5A). Este último permite evaluar la presencia de un promotor críptico en la región 5'UTR en estudio ya que en ausencia del promotor la síntesis del mRNA bicistrónico debería encontrarse inhibida. Transcurridas 24 horas post transfección, las células se lisaron y se determinaron las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc, las cuales fueron expresadas como porcentaje de actividad luciferasa relativa (% RLA) donde el 100 % corresponde a las actividades luciferasa obtenidas con la construcción que contiene el promotor SV40 (Fig. 5B).

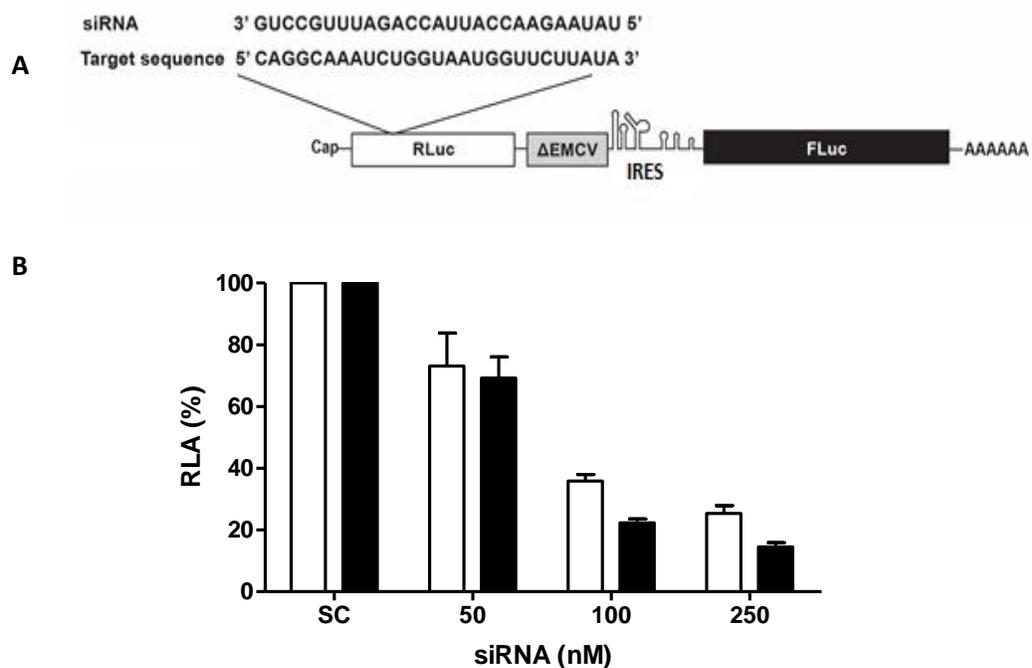


**Figura 5. La expresión de FLuc desde la construcción dI MMTV no se debe a la presencia de un promotor críptico. (A)** Representación esquemática de los vectores bicistronicos, con y sin promotor SV40 ( $\Delta$ SV40). **(B)** Células HEK293T se transfectaron con los vectores descritos en A, junto al vector pcDNA3.1 *LacZ*. Las actividades luciferasa de cada reportero se expresaron como RLA (%) y se llevaron al 100 % con respecto a las actividades obtenidas con los vectores SV40. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que en ausencia del promotor SV40 no se detecta actividad RLuc y FLuc. Estos resultados permiten descartar la expresión de un mRNA monocistronic que codifica para FLuc mediado por la presencia de un promotor críptico.

De manera complementaria se decidió evaluar si la presencia de FLuc podía ser atribuida a la generación de un mRNA monocistronic que codifica para este reportero generado a partir de un proceso de *splicing* alternativo. Para ello células HEK293T se

transfectaron con 200 ng del vector dl MMTV junto con concentraciones crecientes del RLuc-siRNA (Fig. 6A) o siRNA-SC. En este contexto, si una sola especie de mRNA es sintetizada luego de la transfección de los vectores bicistrónicos, las actividades de ambas proteínas reporteras deberían disminuir en presencia del RLuc-siRNA. Por el contrario, si la actividad FLuc proviene de mRNAs generados por *splicing* alternativo, en presencia del RLuc-siRNA sólo la actividad de la proteína reportera RLuc disminuirá. Luego de 24 horas post-transfección las células se lisaron y las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron. Los resultados se graficaron en RLA (%) donde el 100 % corresponde a las actividades luciferasa obtenidas en presencia del siRNA-SC (Fig. 6B).



**Figura 6. La actividad IRES de MMTV no se explica por la generación de variantes de *splicing*.** (A) Representación esquemática en la cual se indica la posición de la región blanco del siRNA contra RLuc. (B) Células HEK293T se transfectaron con el vector dl MMTV en conjunto con un siRNA control (SC), o con cantidades crecientes de un siRNA diseñado contra la región codificante de RLuc. Las actividades de RLuc y FLuc se graficaron como RLA (%), considerando las actividades de RLuc y FLuc en presencia del SC como 100 %.

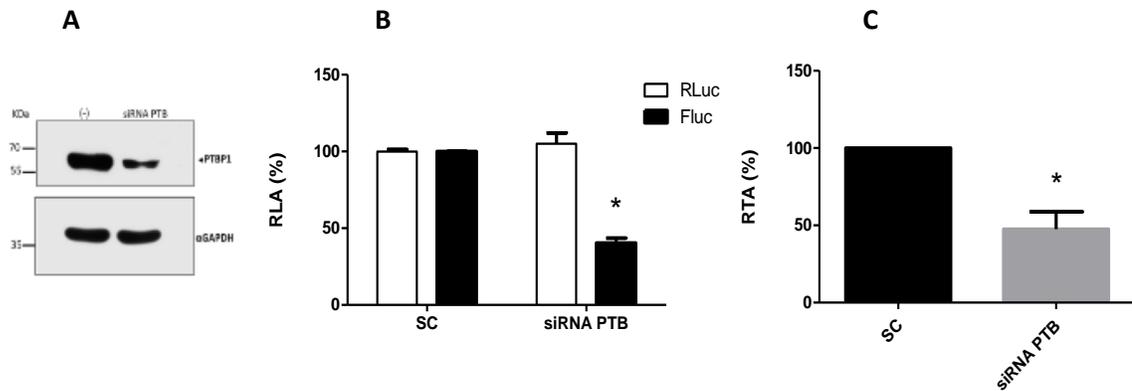
Se observa que en presencia del RLuc-siRNA las actividades tanto de RLuc como de FLuc disminuyen de manera concentración-dependiente. En conjunto estos resultados establecen que el IRES de MMTV es funcional en células HEK293T.

### **3.2. Identificación de sitios putativos de unión a ITAFs en la región 5'UTR del gRNA de MMTV**

Como primera aproximación para la identificación de ITAFs del IRES de MMTV se decidió realizar un estudio *in silico* identificando secuencias de unión en la región 5'UTR del gRNA de MMTV para proteínas caracterizadas por ser ITAFs de IRESs virales. En este estudio se utilizó como referencia la secuencia del clon infeccioso de MMTV [genbank M15122]. Se identificó tres sitios UCUU, seis sitios CCU y siete sitios UUC, todos previamente descritos como sitios putativos de asociación para la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) (Vagner *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2005; Oberstrass, 2005) (Fig. 7). PTB se caracteriza por poseer 4 motivos de reconocimiento de RNA (RRM) y por participar en la regulación del inicio de la traducción de diversos mRNAs celulares y virales (Sawicka *et al.*, 2008; King, Cobbold and Willis, 2010). Basado en esta predicción *in silico* se evaluó si PTB es un ITAF para el IRES de MMTV.



experimento, células HEK293T fueron co-transfectadas con el vector bicistrónico dl MMTV en conjunto con el vector vacío pSP64-poly(A), el cual se utiliza para aumentar la eficiencia de transfección, y con el siRNA-SC o una mezcla de siRNAs contra el mRNA de PTB. Luego de 48 horas post- transfección las células fueron lisadas. El silenciamiento de la proteína PTB endógena se verifico mediante un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo anti-PTB (Fig. 8A). Como control de carga en el experimento se utilizó la proteína GPDH (Fig. 8A). Adicionalmente se midieron las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc. Los resultados obtenidos fueron graficados como porcentaje de actividad luciferasa relativa, RLA (%), y como porcentaje de actividad traduccional relativa, RTA (%). En este ensayo el 100% corresponde a las actividades RLuc y FLuc obtenidas en presencia del siRNA-SC (Fig. 8B-C).



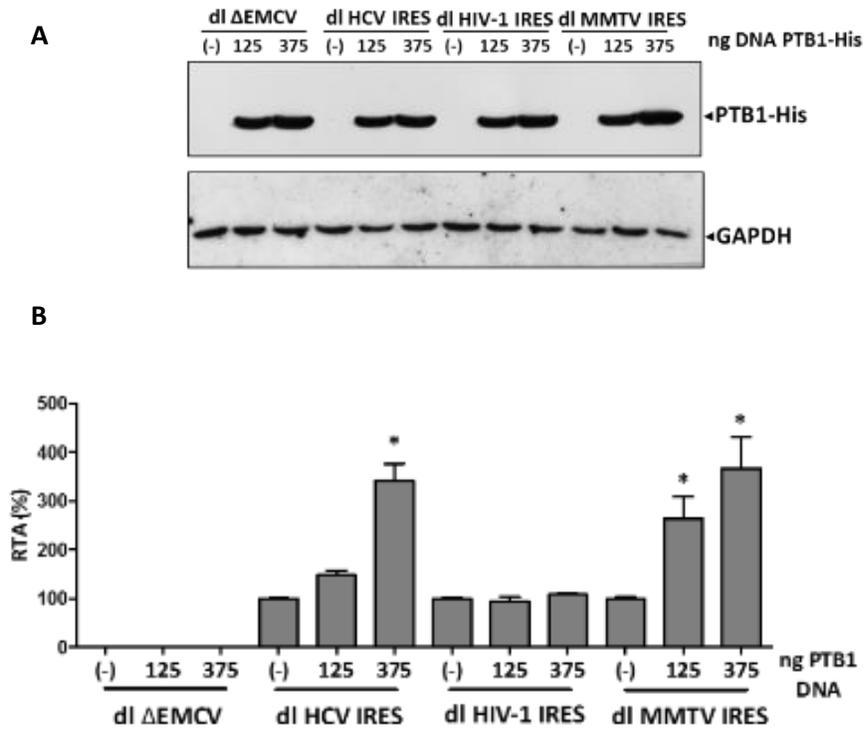
**Figura 8. El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína PTB en células HEK293T.** (A) Células HEK293T fueron transfectadas con 75  $\mu$ M del SC o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína PTB. El efecto del silenciamiento de la proteína PTB sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B) o RTA (%) (C) considerando las actividades obtenidos en presencia del SC como 100%. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados indican que el silenciamiento parcial de PTB visualizado como una disminución en la expresión de la proteína endógena (Fig. 8A), se asocia a una disminución en el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV (Fig. 8B, 8C) sin afectar la actividad de RLuc. Esta observación sugiere que la actividad del MMTV IRES es dependiente, al menos en parte, de la proteína PTB.

### **3.4 La sobreexpresión de PTB1 estimula el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV.**

A continuación, se evaluó el impacto de la sobreexpresión de la proteína PTB1 sobre la traducción IRES-dependiente de MMTV. Para ello células HEK293T fueron co-transfectadas con los vectores bicistrónicos dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HCV o dl MMTV en conjunto con el vector pcDNA 3.1 LacZ y con concentraciones crecientes del vector pcDNA4/HisMax/PTB1. En el experimento, el vector dl HIV-1 es utilizado como control negativo ya que la actividad del IRES de HIV-1 es independiente de la proteína PTB1 (Waysbort *et al.*, 2001) Por otra parte, el vector dl HCV (el cual contiene la secuencia del elemento IRES del virus de la hepatitis C clonado en la región intercistronica) fue utilizado como control positivo ya que la actividad del IRES de HCV se ve favorecida en presencia de la proteína PTB1 (Ali and Siddiqui, 1995). Luego de 24 horas post-transfección las células fueron lisadas y se evaluó la sobreexpresión de la proteína PTB1 mediante western blot utilizando para ello un anticuerpo anti-His. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH (Fig. 9A). En paralelo se determinó la actividad de RLuc y FLuc. Los resultados obtenidos se presentan como RTA (%) considerando las actividades obtenidas

en ausencia del vector pcDNA4/HisMax/PTB1 como 100% (Fig. 9B).



**Figura 9. PTB1 estimula la actividad del elemento IRES de MMTV.** (A) Células HEK293T fueron co-transfectadas con 100 ng de los vectores bicistrónicos dl ΔEMCV, dl HCV, dl HIV-1 o dl MMTV junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia (-) o presencia de 125 y 375 ng del vector pcDNA4/HisMax/PTB1. (B) Las actividades de los reporteros RLuc y FLuc fueron medidas y normalizadas respecto a la actividad β-galactosidasa. Los valores de actividad se expresan como RTA (%) relativo a la actividad de cada vector en ausencia del plásmido que permite la expresión de PTB1. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Tukey. \*,  $p < 0.05$ .

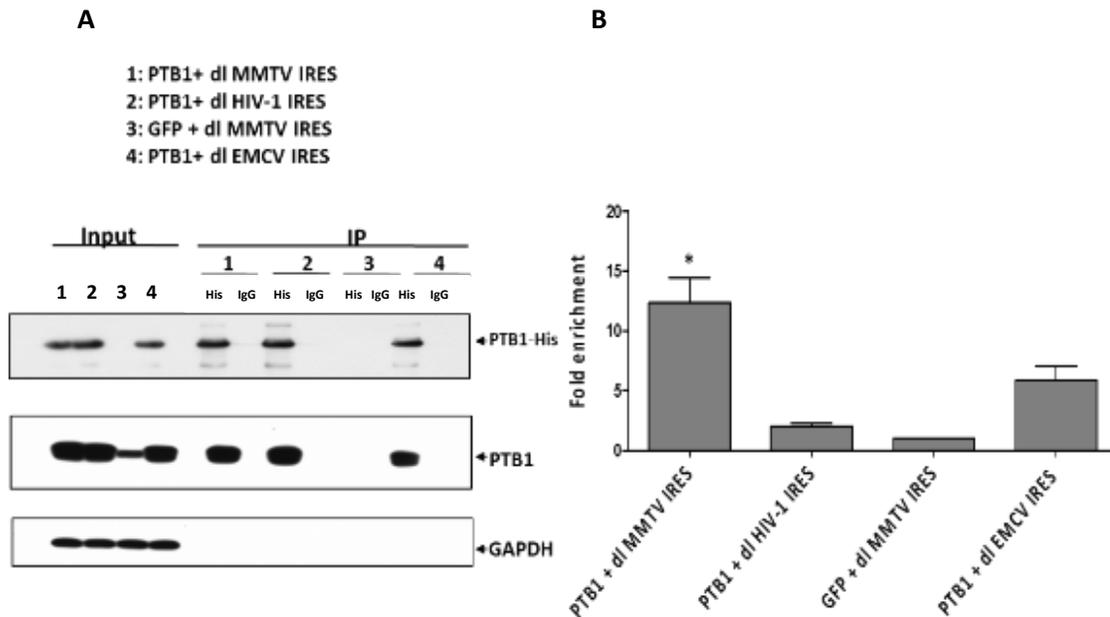
Los resultados muestran que en acuerdo a lo previamente reportado (Waysbort *et al.*, 2001), la sobreexpresión de PTB1 en el contexto de células HEK293T, no afecta la actividad del IRES de HIV-1. Sin embargo, la sobreexpresión de PTB1 induce un incremento en la actividad del elemento IRES de MMTV, de manera similar a lo observado para la actividad del elemento IRES de HCV. Por lo tanto, estos resultados en conjunto con los obtenidos en la sección 3.3 permiten concluir que PTB1 es un ITAF para el IRES de MMTV.

### **3.5 La proteína PTB1 se une *in vivo* a la región 5'UTR de MMTV.**

Considerando que la proteína PTB1 posee 4 RRM y que su participación en el inicio de la traducción IRES-dependiente en otros mRNAs virales involucra una interacción directa proteína-RNA (Hunt and Jackson, 1999; Grover, Ray and Das, 2008; Kafasla *et al.*, 2009), se evaluó si la proteína PTB1 interactúa con la región 5'UTR de MMTV *in vivo*. Para ello, se realizaron experimentos de UV-CLIP acoplados a ensayos de qPCR. En éste experimento, células HEK293T fueron transfectadas con los vectores dl MMTV, dl HIV-1 o dl EMCV en conjunto con el vector pcDNA4/HisMax/PTB1 o con el vector pCMV6-AC-GFP el cual permite la expresión de la proteína GFP y es utilizado en el experimento como control de no interacción. Transcurridas 48 hrs. desde la transfección las células fueron expuestas a luz UV (400 mJ/cm<sup>2</sup>), de manera de estabilizar los complejos RNA/proteína. Las células fueron lisadas mediante sonicación y el extracto obtenido previamente clarificado (input) fue utilizado en ensayos de IP y posterior

extracción de RNA. Para la IP se utilizaron esferas de agarosa recubiertas con proteínas G cargadas con un anticuerpo anti-His o anti-IgG como control. Para determinar la cantidad de RNA asociado a la proteína PTB-His, las muestras fueron tratadas con proteinasa K y los RNA fueron cuantificados mediante RT-qPCR como se indica en materiales y métodos. Los resultados se presentan como veces de enriquecimiento de RNA con respecto a la IP obtenida entre el dl MMTV y el control de no interacción.

Como se anticipaba, mediante western blot se detecta la proteína PTB1-His en el “input” de cada condición experimental donde se transfectó el vector pcDNA4/HisMax/PTB1 (Fig. 10A panel superior, Input: 1,2 y 4) y no en la condición experimental en la cual se transfectó el vector pCMV6-AC-GFP (Fig. 10A, panel superior, Input: 3). A su vez, es posible detectar la proteína PTB-His solo en aquellas IPs en las cuales se utilizó el anticuerpo anti-His (Fig. 10A, panel superior, IP His: 1, 2 y 4) y no en aquellas en las cuales se utilizó el anticuerpo anti-IgG (Fig. 10A, panel superior, IP IgG: 1, 2 y 4). La detección y especificidad de PTB1 (endógena y recombinante) en todas las condiciones experimentales se corroboró mediante western blot utilizando un anticuerpo específico contra PTB1 (Fig. 10A, panel central: Input, IP). Como control de carga se realizó un western blot contra la proteína GAPDH demostrando que en todas las condiciones experimentales se cargaron cantidades similares de la muestra (Fig. 10A, panel inferior, Input). A su vez, los resultados del ensayo RT-qPCR dan cuenta de un enriquecimiento del dl RNA de MMTV en la IP (Fig. 10B).



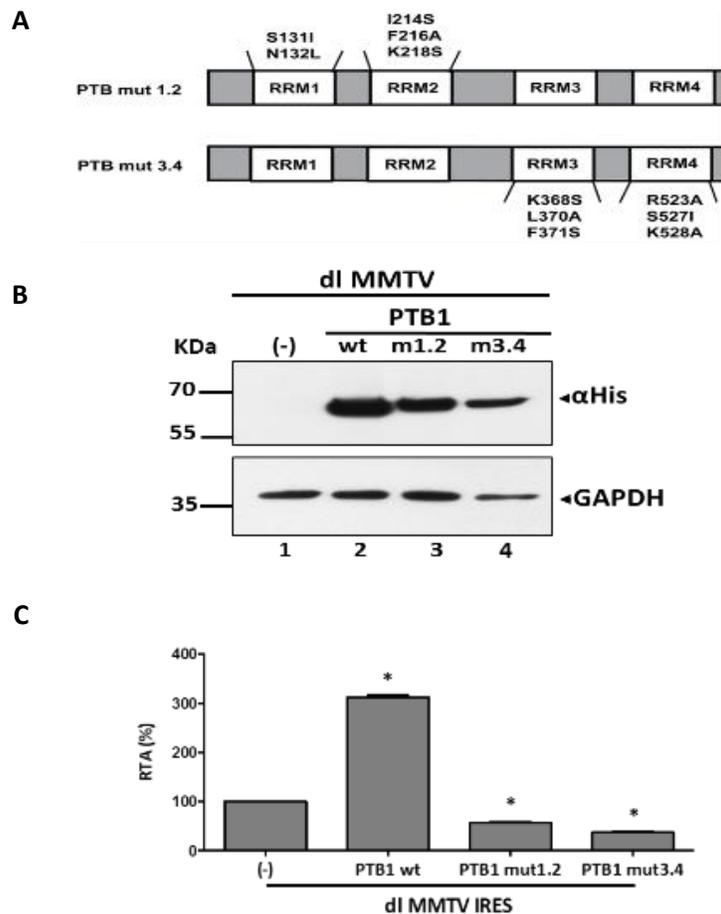
**Figura 10. La proteína PTB1 se une a la región 5'UTR de MMTV *in vivo*.** (A) Las proteínas obtenidas desde el input e inmunoprecipitación fueron identificadas mediante un ensayo de western blot utilizando los anticuerpos primarios anti-His, anti-PTB o anti-GAPDH. (B) Gráfico de las veces de enriquecimiento de cada RNA en presencia de PTB1. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA Kruskal-Wallis. \*,  $p < 0.00001$ .

Los resultados de los ensayos *in vivo* demuestran que la proteína PTB1 interactúa con a la región 5'UTR de MMTV.

### 3.6 Los motivos RRM de PTB1 son necesarios para estimular el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV.

Se decidió luego evaluar la relevancia de los dominios RRM de PTB1 en la regulación de la traducción mediada por el MMTV IRES. Para ello, se realizaron mutaciones agrupadas en los dominios RRM1/RRM2 o en los dominios RRM3/RRM4 las

que han sido previamente descritas y caracterizadas como mutaciones que alteran la unión de PTB1 al RNA (Kafasla *et al.*, 2011) (Fig. 11A). Para introducir las mutaciones en el contexto de PTB1 se elaboraron las construcciones pcDNA4/HisMax/PTB1 mut1.2 y pcDNA4/HisMax/PTB1 mut3.4 utilizando la metodología descrita previamente en la sección 2.2 de materiales y métodos. Posteriormente, células HEK293T fueron co-transfectadas con 100 ng del vector dl MMTV junto con 25 ng del plásmido pcDNA 3.1 LacZ y con 375 ng de los vectores pcDNA4/HisMax/PTB1, pcDNA4/HisMax/PTB1 mut1.2 o pcDNA4/HisMax/PTB1 mut3.4. Luego de 24 horas post-transfección las células fueron lisadas y se evaluó la sobreexpresión de las proteínas PTB1 mutantes mediante western blot utilizando un anticuerpo primario anti-His. Como control de carga en el experimento se utilizó la proteína GAPDH (Fig. 11B). En forma paralela se determinó la actividad RLuc y FLuc en cada condición. Los resultados se presentan como RTA (%) considerando como 100% las actividades obtenidas en ausencia de los vectores (Fig. 11C).



**Figura 11. Los motivos RRM de PTB1 son necesarios para estimular la actividad del elemento IRES de MMTV.** (A) Esquema representativo de las mutaciones introducidas en los motivos RRM de PTB1. (B) Células HEK293T fueron co-transfectadas con 100 ng del vector bicistrónico dlMMTV junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* y con 375 ng de los vectores que permiten expresar la proteína PTB1 silvestre o las proteínas PTB1.2mut y PTB3.4mut. (C) El efecto de la expresión de las proteínas mutantes sobre la actividad del elemento IRES de MMTV se muestra cómo RTA (%), relativo a la actividad del vector dl MMTV en ausencia de las proteínas. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Dunnet \*,  $p < 0.05$ .

Las mutaciones tanto en los motivos RRM1/RRM2 como en los motivos RRM3/RRM4 inhiben la actividad del MMTV IRES. Por lo tanto, se concluye que ambos grupos de motivos de unión a RNA son necesarios para que la proteína PTB1 estimule la

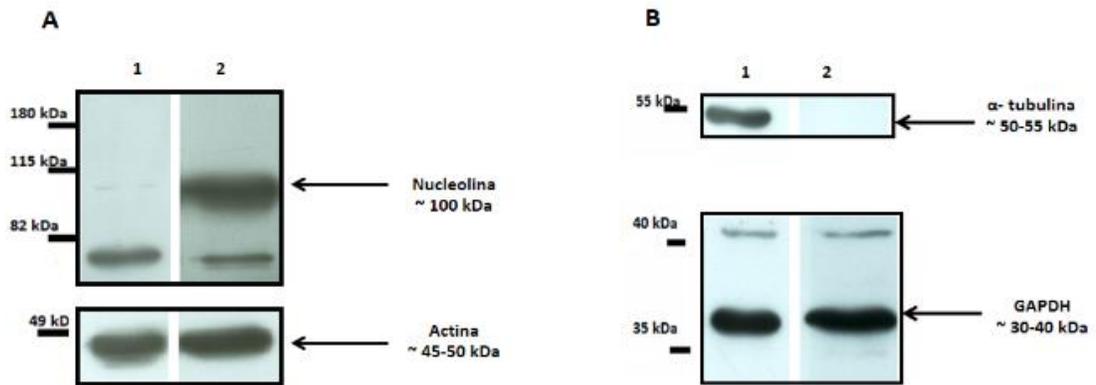
actividad del elemento IRES.

### **3.7 Identificación de proteínas que interactúan con la región 5'UTR del gRNA de HIV-1 y HTLV-1.**

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína PTB1 interactúa con la región 5'UTR del gRNA de MMTV (Fig. 10) y regula la actividad del elemento IRES presente en ella (Fig. 9B). Sin embargo, PTB1 no interactúa con la región 5'UTR de HIV-1 (Waysbort *et al.*, 2001), ni activa al IRES de HIV-1 (Fig. 9B). En conjunto estas observaciones sugieren que una misma proteína puede modular de diferentes maneras distintos IRESs retrovirales (Stoneley and Willis, 2004). En base a estos resultados, se decidió extender la búsqueda de proteínas celulares que interactúan con los diferentes 5'UTRs de los gRNAs retrovirales para luego evaluar su impacto sobre la actividad de los elementos IRESs que éstos poseen. Con este fin se utilizó una aproximación proteómica basada en cromatografía por afinidad a RNA denominada GRNA (*Glutathione RNA Affinity chromatography*) acoplada a espectrometría de masas (Czaplinski *et al.*, 2005). El sistema de GRNA se basa en utilizar RNAs que posean una secuencia de interés fusionada a la secuencia 3BoxB, la cual consiste de tres horquillas o *hairpin* que son reconocidas de manera específica por el dominio de unión a RNA de la proteína N del bacteriófago lambda. En este sistema, la proteína N se encuentra fusionada a glutatión S-transferasa (denominada desde ahora en adelante GλH) y se une con alta afinidad a esferas de glutatión-sefarosa. De esta forma, los RNAs son expuestos a diferentes factores proteicos y los complejos riboproteicos son aislados para su posterior identificación. En este experimento se

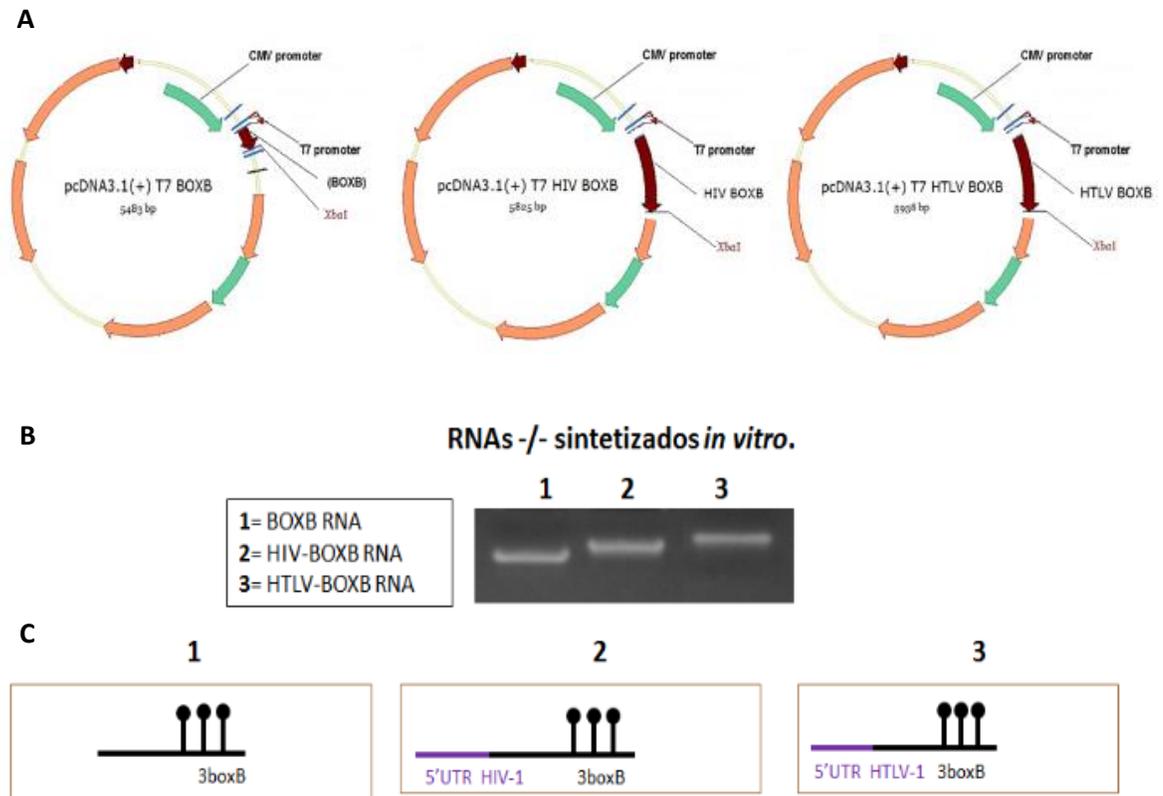
decidió limitar la búsqueda a aquellas proteínas que interactúan con las regiones 5'UTR de los gRNAs de HIV-1 y HTLV-1.

En un trabajo previo (Vallejos *et al.*, 2011), se utilizaron extractos de células HeLa como fuente de proteínas para identificar la interacción de distintos factores proteicos con la región 5'UTR de HIV-1. Sin embargo, considerando que el blanco de infección por el virus HIV-1 son los linfocitos T, se decidió repetir los experimentos utilizando extractos nucleares (Fig. 12A) y citoplasmáticos (Fig. 12B) provenientes de la línea celular linfocitaria Jurkat.



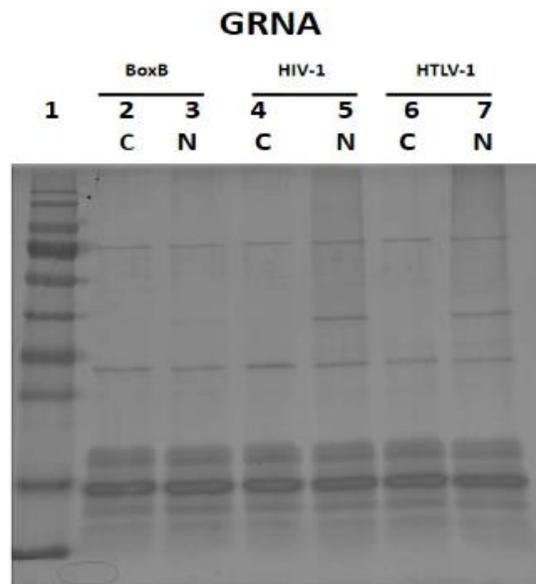
**Figura 12. Evaluación mediante western blot de los extractos nuclear y citoplasmático obtenidos de células Jurkat. (A) Western blot para nucleolina (marcador de núcleo) y (B)  $\alpha$ -tubulina (marcador de citoplasma) de extractos citoplasmático (carril 1) y nuclear (carril 2) proveniente de células Jurkat.**

Para realizar el experimento de GRNA, se generaron las construcciones pcDNA3.1(+)<sub>5'</sub>UTR HTLV-1/3BoxB, pcDNA3.1(+)<sub>5'</sub>UTR HIV-1/3BoxB y pcDNA3.1(+)<sub>3</sub>BoxB (Fig. 13A), las cuales permiten obtener por ensayos de transcripción *in vitro* RNAs con las secuencias <sub>5'</sub>UTR de HTLV-1 o HIV-1 fusionadas a la secuencia <sub>3</sub>BoxB o RNAs sólo con la secuencia <sub>3</sub>BoxB, respectivamente. (Fig. 13B,C).



**Figura 13. Esquema representativo de las construcciones utilizadas para la síntesis *in vitro* de los RNAs <sub>3</sub>BOXB, <sub>5'</sub>UTR HIV-1/<sub>3</sub>BoxB y <sub>5'</sub>UTR HTLV-1/<sub>3</sub>BoxB. (A)** Representación de los vectores elaborados para obtener las regiones <sub>3</sub>BoxB y <sub>5'</sub>UTR de HIV-1 o HTLV-1 fusionadas a la secuencia <sub>3</sub>BOXB. **(B)** Evaluación de la integridad de los RNAs <sub>3</sub>BOXB, <sub>5'</sub>UTR HIV-1/<sub>3</sub>BoxB y <sub>5'</sub>UTR HTLV-1/<sub>3</sub>BoxB sintetizados a partir de los vectores descritos en A. **(C)** representación esquemática de los RNAs obtenidos.

Los mRNAs obtenidos se incubaron con extractos nucleares o citoplasmáticos provenientes de células Jurkat, y los complejos RNA/proteínas fueron aislados utilizando esferas de glutatión-sefarosa siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.7 de materiales y métodos. Las proteínas obtenidas en cada condición experimental fueron resueltas en un gel SDS-PAGE en gradiente (Fig. 14) y su identificación se realizó por espectrometría de masas Nano LC-MS/MS.



**Figura 14. Proteínas celulares que interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1.** Los RNAs 5'UTR HIV-1/BoxB, 5'UTR HTLV-1/BoxB y BoxB fueron expuestos a extractos citoplasmáticos (C) y nuclear (N) de células Jurkat. Los complejos RNA/proteína se aislaron mediante la técnica GRNA y las proteínas obtenidas en cada complejo se resolvieron en un gel SDS-PAGE en gradiente (carriles 2-7) (carril 1 corresponde al estándar de peso molecular).

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas permitieron identificar diversas proteínas que interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1. Para filtrar estos resultados, las proteínas obtenidas fueron sometidas a un análisis sustractivo. En el experimento, las proteínas obtenidas con el RNA 3Boxb se consideraron como el “background” y se eliminaron de las listas de proteínas obtenidas para el RNA 5'UTR-HIV-1/3BoxB o 5'UTR-HTLV-1/3BoxB. Posterior a este análisis, las proteínas fueron además seleccionadas utilizando como patrón de comparación los resultados reportados en el trabajo de Vallejos *et al.*, 2011, y una lista extendida generada del mismo trabajo pero que no ha sido publicada (Vallejos, 2011). Sólo las proteínas aisladas utilizando ambas estrategias experimentales se muestran en los resultados (Tabla 1, 2, 3 y 4).

**Tabla N°1.** Factores celulares obtenidos desde extractos citoplasmáticos provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HIV-1.

Abreviatura	Nombre de la proteína	Mw
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.854
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	49.850
HSP76	Heat shock 70 kDa protein	70.984
NUCL	Nucleolin	76.568

**Tabla N°2.** Factores celulares obtenidos desde extractos nucleares provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HIV-1.

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Mw</b>
NUCL	Nucleolin	76.568
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	90.360
HNRPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33.650
HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	90.528
H31	Histone H3.1	15.394
HMGB1	High mobility group protein B1	24.878
SMD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	13.907
CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61.016
H12	Histone H1.2	21.352
HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	50.944
GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	73.635
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	49.850
SMD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	13.518
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.854
THOC4	THO complex subunit 4	26.872
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	32.930
RS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	17.953

**Tabla N°3.** Factores celulares obtenidos desde extractos citoplasmáticos provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HTLV-1.

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Mw</b>
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.854
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	49.850
RNPS1	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	34.188
RL19	60S ribosomal protein L19	23.451

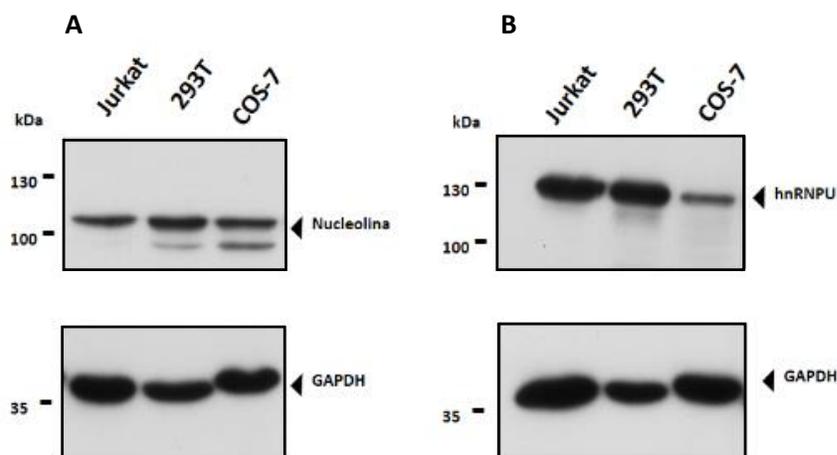
**Tabla N°4.** Factores celulares obtenidos desde extractos nucleares provenientes de células Jurkat asociados a la región 5'UTR de HTLV-1.

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Mw</b>
NUCL	Nucleolin	76.568
H14	Histone H1.4	21.852
H4	Histone H4	11.360
HNRPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	33.650
HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	90.528
H31	Histone H3.1	15.394
HMGB1	High mobility group protein B1	24.878
SMD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	13.907
CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61.016
HMGB2	High mobility group protein B2	24.019

Luego, se decidió focalizar el estudio en el rol de la ribonucleoproteína heterogénea nuclear U (hnRNPU) y Nucleolina sobre la iniciación de la traducción dependiente de los IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Los criterios de selección se basaron en que ambas proteínas: i) interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1 (ver Tablas); ii) son capaces de unir RNA; hnRNPU posee un motivo rico en glicina/arginina o RGG mientras que nucleolina posee 4 motivos de reconocimiento de RNA o RRM y un motivo RGG (Kiledjian and Dreyfuss, 1992; Serin *et al.*, 1996); iii) se caracterizan además por translocar entre el núcleo y citoplasma (Han, Tang and Smith, 2010; Salvetti *et al.*, 2016); iv) participan en diferentes procesos asociados al metabolismo del mRNA como son transcripción, estabilización y traducción (Tajrishi, Tuteja and Tuteja, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2017).

### **3.8 Actividad de los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 en células Cos-7 y HEK293T.**

Una de las dificultades que presenta el trabajar con líneas celulares derivadas de linfocitos T, es su baja eficiencia de transfección. Considerando esta dificultad se decidió ejecutar los experimentos en el contexto de células Cos-7 y HEK293T, dos líneas celulares fácilmente transfectables que ya han sido utilizadas previamente para el estudio de elementos IRESs retrovirales (Vallejos *et al.*, 2009; Carvajal *et al.*, 2012; Olivares *et al.*, 2014; Cáceres *et al.*, 2016). Más aún, tanto la proteína nucleolina (Fig. 15A) como hnRNPU (Fig. 15B) se expresan en células Jurkat, Cos-7 y HEK293T.

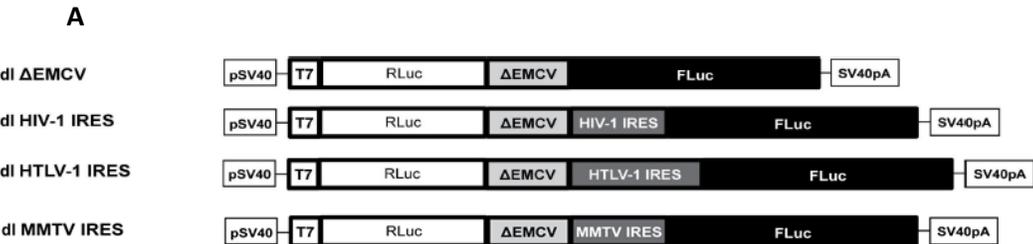


**Figura 15. Expresión de Nucleolina y hnRNP en distintos contextos celulares. (A)** Western blot para nucleolina y **(B)** hnRNP en células Jurkat, Cos-7 y HEK293T.

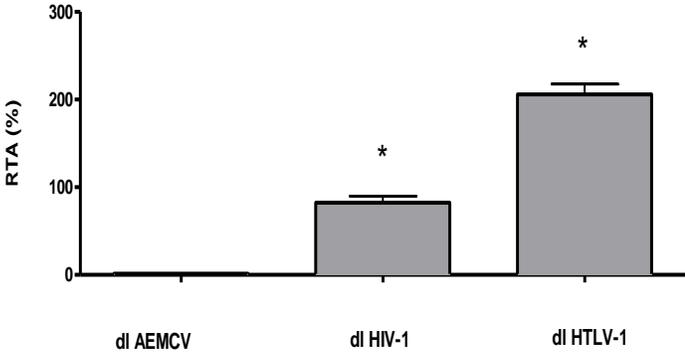
Sin embargo, antes de iniciar estos estudios nos pareció pertinente confirmar y validar el uso de las células Cos-7 y HEK293T. Por ello, se decidió caracterizar la actividad de los elementos IRESs retrovirales de HIV-1 y HTLV-1 en los contextos de ambas líneas celulares. Considerando que la caracterización del elemento IRES de MMTV se demostró previamente en líneas HEK293T (Fig. 5, 6 y 7), sólo se caracterizó este elemento en el contexto de células Cos-7.

Para evaluar las actividades de los IRESs, células Cos-7 y HEK293T se transfectaron con 400 ng de los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV los cuales poseen la secuencia de los elementos IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV respectivamente (Fig. 16A), junto con 50 ng del plásmido pcDNA 3.1 *LacZ*. Como control en el experimento se utilizó el vector bicistrónico dl  $\Delta$ EMCV descrito previamente. Transcurridas 24 horas las células se lisaron y se determinaron las actividades enzimáticas

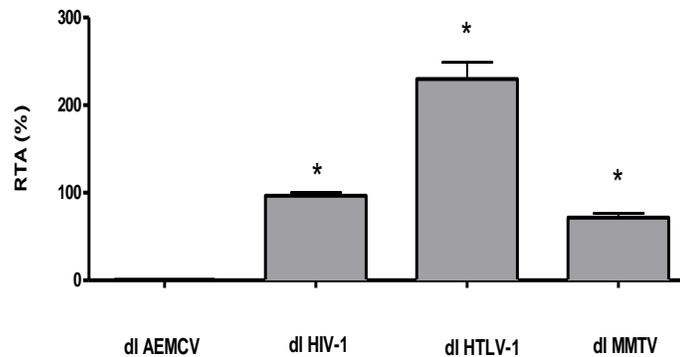
de RLuc y FLuc. Los resultados se expresaron en RTA (%) donde la actividad del IRES de HIV-1 fue considerada arbitrariamente como el 100 % (Fig. 16B,C).



**B**



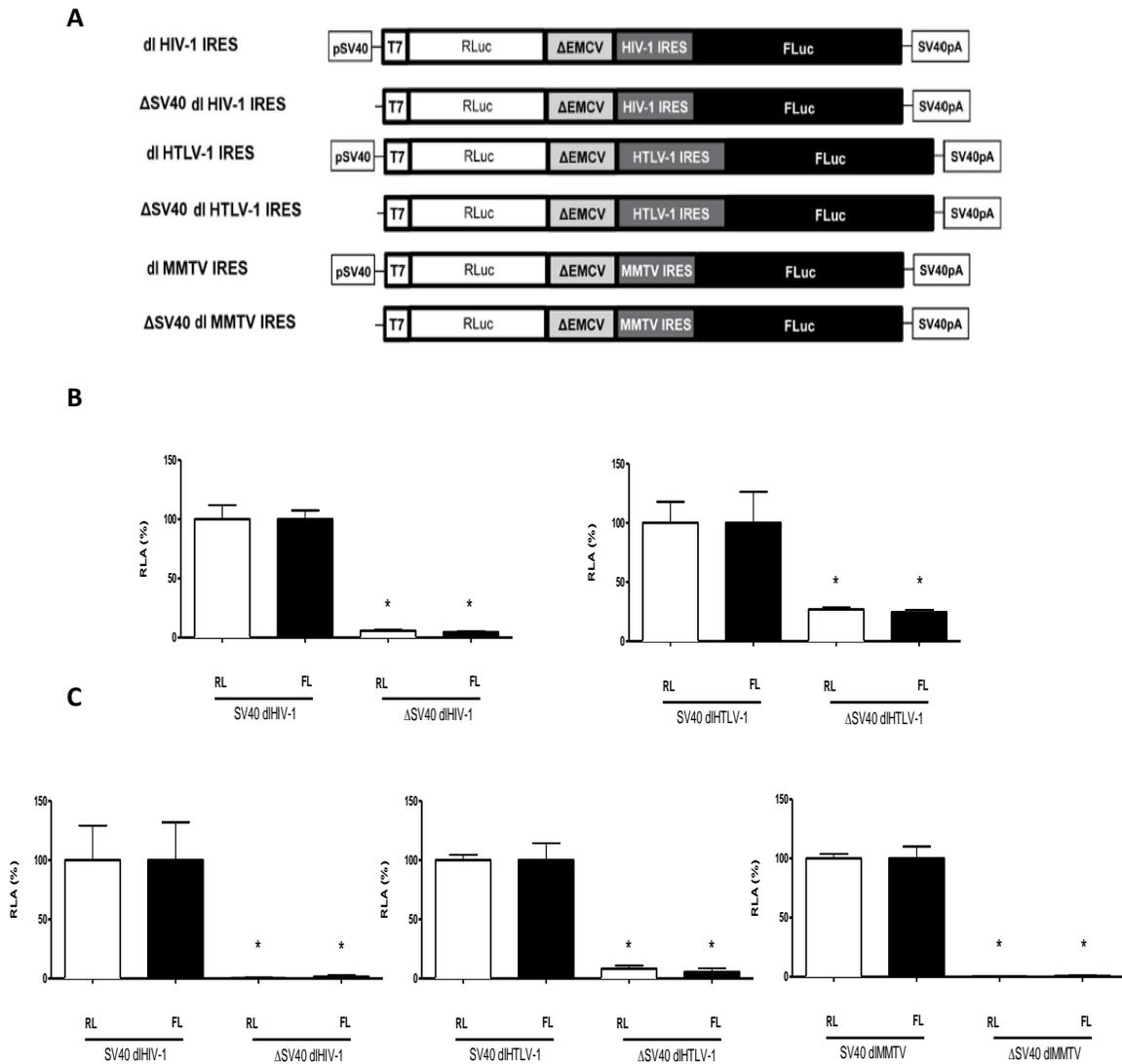
C



**Figura 16. Los elementos IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV son activos en células HEK293T y Cos-7.** (A) Representación esquemática de las construcciones bicistrónicas (dl) utilizadas. Los vectores descritos en A se transfectaron en células HEK293T (B) o Cos-7 (C), en conjunto con el vector pcDNA3.1 *LacZ*. Los valores de actividad se expresaron como RTA (%) relativo a la actividad de HIV-1 la cual fue llevada arbitrariamente al 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Dunnet. \*,  $p < 0.05$ .

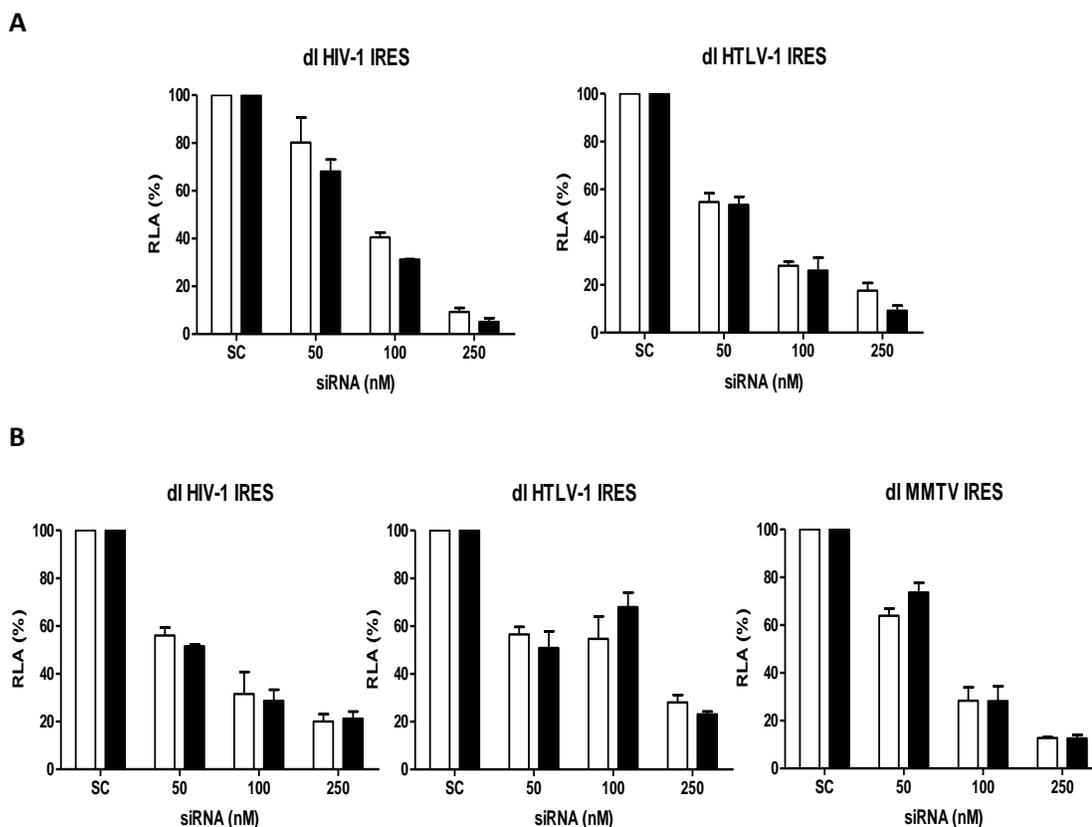
Los resultados sugieren que los elementos IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV son funcionales en el contexto de células Cos-7 y HEK293T.

Con el propósito de evaluar si la actividad de los reporteros se podía deber a la presencia de un promotor críptico, las células Cos-7 y HEK293T se transfectaron con los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1, dl MMTV o con los vectores  $\Delta$ SV40 dl HIV-1,  $\Delta$ SV40 dl HTLV-1 y  $\Delta$ SV40 dl MMTV (Fig. 17A) en un experimento similar al realizado en la sección 3.1 (Fig. 5). Transcurridas 24 horas, las células se lisaron y las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc fueron determinadas. Los resultados se graficaron como RLA (%) y las actividades obtenidas desde los vectores dl HIV-1, dl HTLV-1 y dl MMTV fueron consideradas cada una como 100 % (Fig. 17B y 17C).



**Figura 17. La expresión de FLuc desde las construcciones dl HIV-1, dl HTLV-1 y MMTV no se debe a la presencia de un promotor críptico. (A)** Representación esquemática de los vectores bicistronicos, con y sin promotor SV40 ( $\Delta$ SV40). Células HEK293T **(B)** o Cos-7 **(C)** se transfectaron con los vectores descritos en A, junto al vector pcDNA3.1 *LacZ*. Las actividades de RLuc (barras blancas) y FLuc (barras negras) fueron medidas y normalizadas con la actividad  $\beta$ -Galactosidasa. Las actividades luciferasa de cada reportero se expresaron como RLA (%) y se llevaron al 100 % con respecto a las actividades obtenidas con los vectores SV40. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que en ausencia del promotor SV40 las actividades RLuc y FLuc obtenidas desde el vector  $\Delta$ SV40 dl HIV-1 en células HEK293T es despreciable, al igual como ocurre en el contexto de células Cos-7. En esta línea celular es posible observar el mismo fenómeno para el vector  $\Delta$ SV40 dl MMTV. Por ello, se descarta la presencia de un promotor críptico en los plásmidos utilizados y se confirma que los RNAs codificados por ellos presentan elementos IRES. En el caso de las actividades RLuc y FLuc obtenidas desde el vector  $\Delta$ SV40 dl HTLV-1, se observa que en el contexto de células HEK293T aproximadamente un 25 % de la actividad FLuc podría ser explicada por la presencia de un promotor críptico presente en el plásmido utilizado, mientras que el 75 % restante de la actividad de FLuc puede ser explicada por la funcionalidad del elemento IRES de HTLV-1. Con el objetivo de complementar estos resultados se realizó un ensayo de silenciamiento utilizando un siRNA contra la región codificante para RLuc como se describió previamente en la sección 3.1. Posterior a la transfección las células se lisaron y las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron como se describió previamente en la sección 2.9 de materiales y métodos. Los resultados se presentan como RLA (%) donde las actividades RLuc y FLuc obtenidas en presencia del siRNA-SC se llevaron a 100 % (Fig. 18A y 18B).

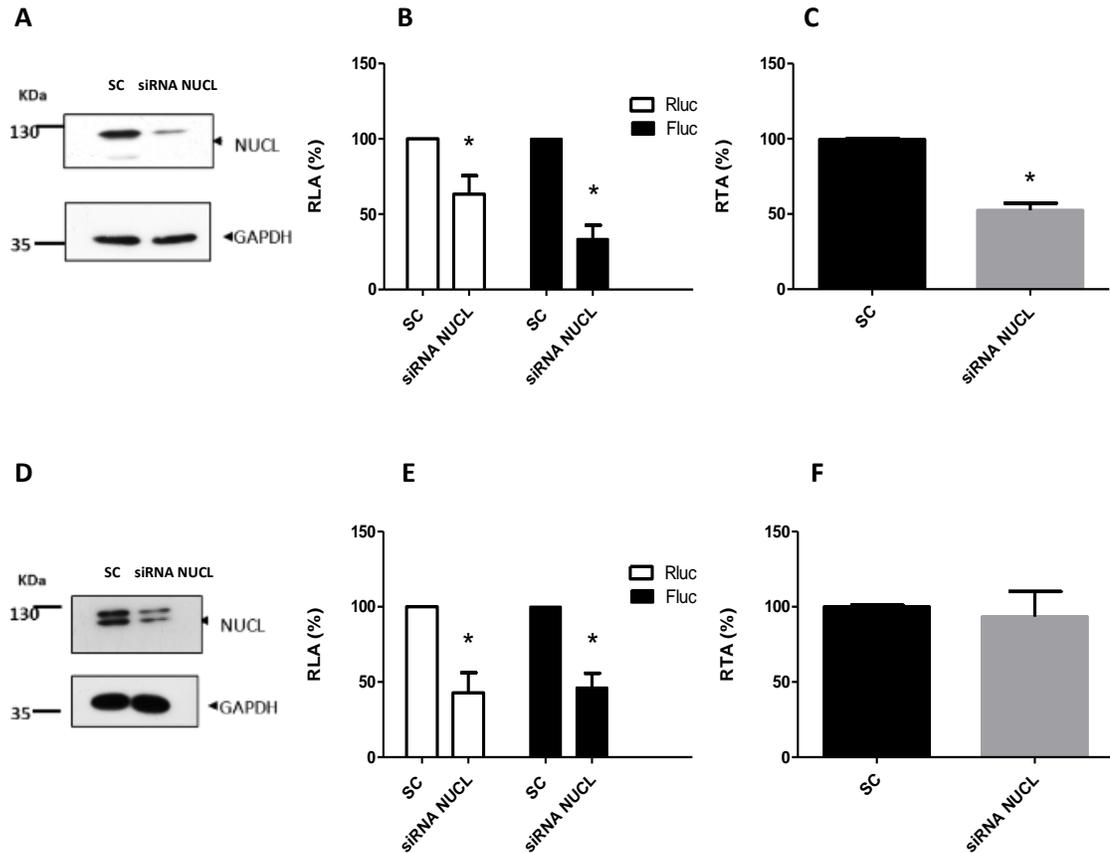


**Figura 18. La actividad del IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV no se explica por la generación de variantes de *splicing*.** Células HEK293T (A) o Cos-7 (B) se transfectoron con los vectores dl HIV-1, dl HTLV-1 y dl MMTV en conjunto con un siRNA control (SC), o con cantidades crecientes de un siRNA diseñado contra la región codificante de RLuc. Las actividades de RLuc y FLuc se graficaron como RLA (%), considerando las actividades de RLuc y FLuc en presencia del siRNA control como 100 %.

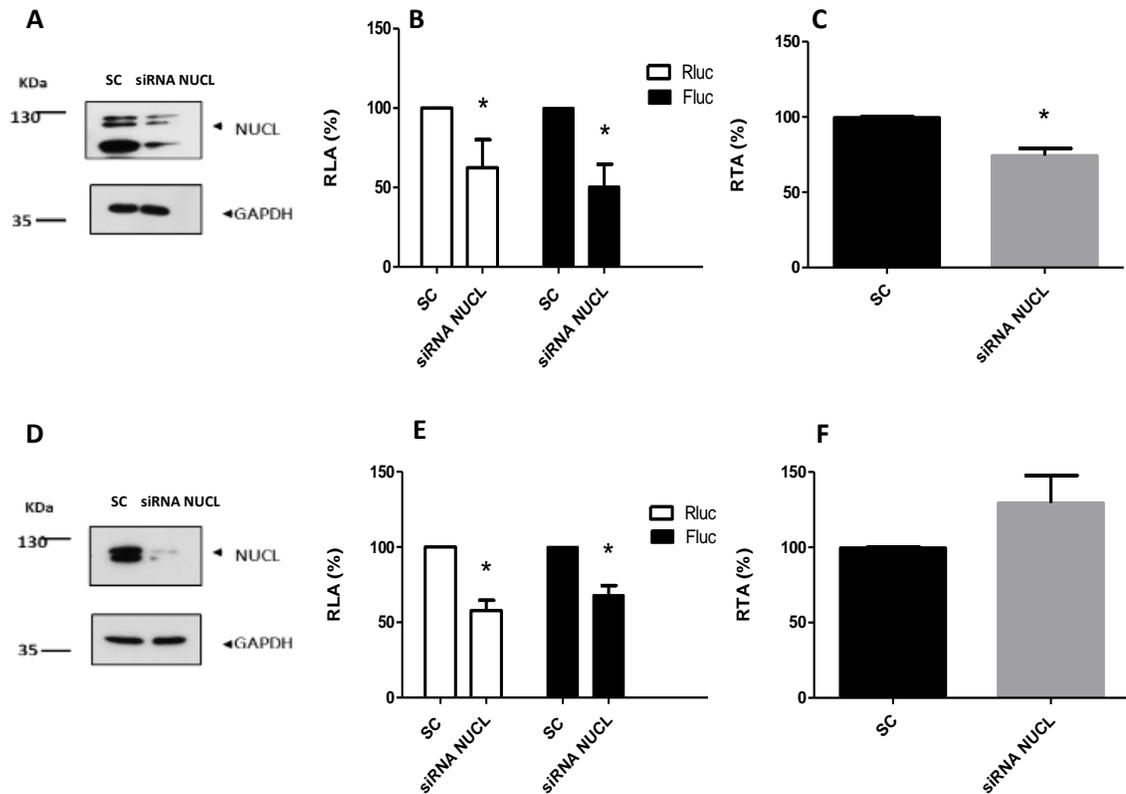
Los resultados muestran que las actividades RLuc y FLuc disminuyen de manera concentración-dependiente con respecto al siRNA-RLuc utilizado, en todas las condiciones experimentales evaluadas, confirmando que ambas proteínas reporteras están codificadas en el mismo transcrito.

### **3.9 El silenciamiento de la expresión de nucleolina no impacta de manera específica la actividad de los IRESs retrovirales.**

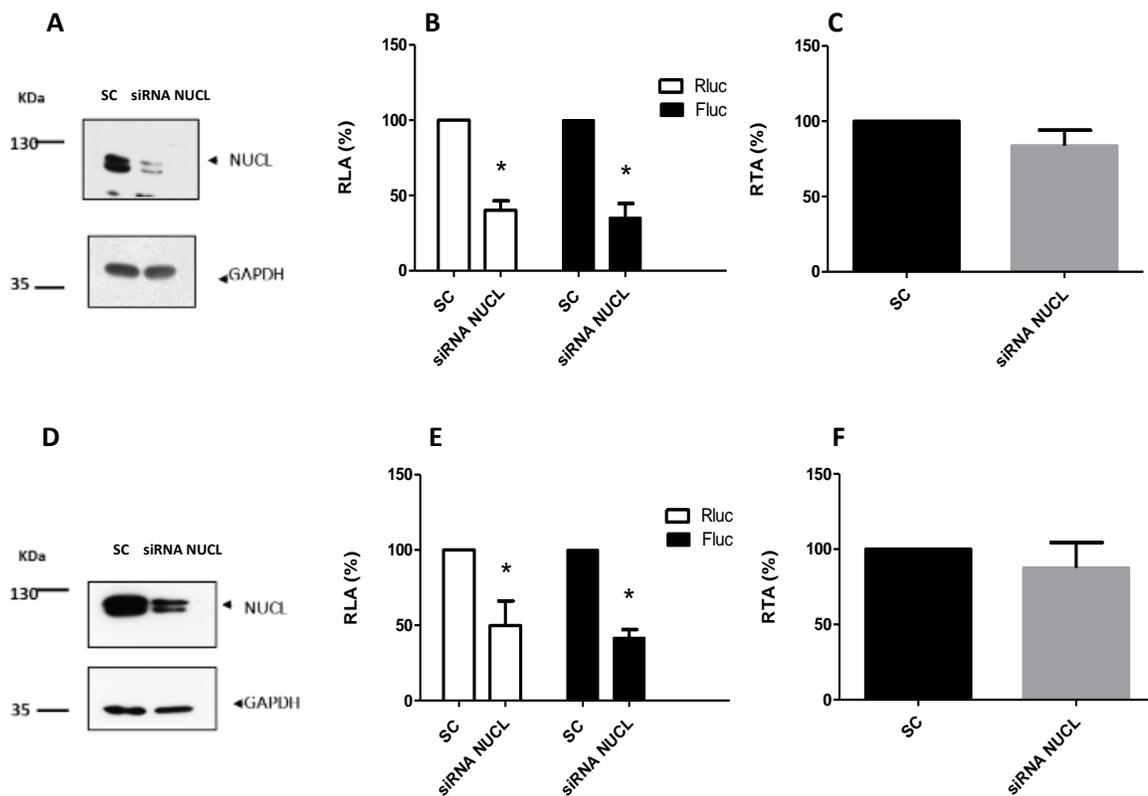
Para evaluar la participación de nucleolina en la traducción de los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV, células Cos-7 y HEK293T se co-transfectaron con los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV en conjunto con el vector vacío pSP64-poly(A) y con 100 nM del siRNA-SC o de un siRNA contra el mRNA de nucleolina. Posterior a la transfección, las células se lisaron y se determinó el correcto silenciamiento de la proteína nucleolina mediante un ensayo de western blot (Fig. 19A,D) (Fig. 20A,D) (Fig. 21A,D). Las actividades de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RLA (%) y RTA (%) donde las actividades obtenidas en presencia del siRNA-SC se llevaron a un 100 % (Fig. 19B,C,E,F) (Fig. 20B,C,E,F) (Fig. 21B,C,E,F).



**Figura 19. El silenciamiento de la expresión de nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistrónico dl HIV-1.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), se transfectaron con 100 nM de un siRNA control (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína nucleolina (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína nucleolina sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .



**Figura 20. El silenciamiento de la expresión nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistrónico dl HTLV-1.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), fueron transfectadas con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína nucleolina (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína nucleolina sobre la traducción se muestra RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .



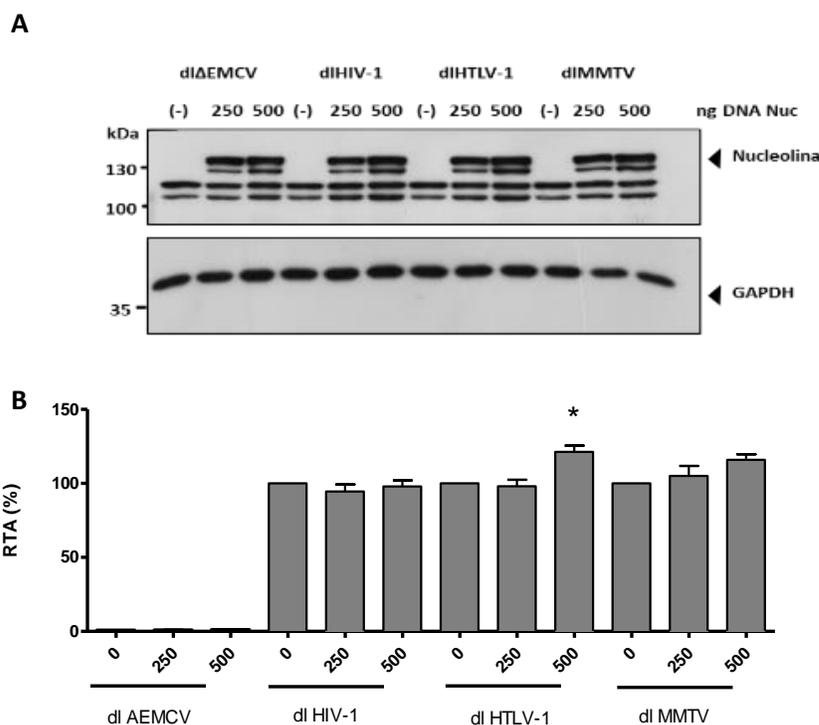
**Figura 21. El silenciamiento de la expresión de nucleolina impacta la actividad de ambos cistrones en el contexto del vector bicistónico dl MMTV.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), fueron transfectadas con 100 nM de un siRNA control (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína nucleolina (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína nucleolina sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que el silenciamiento parcial de nucleolina en células Cos-7 y HEK293T afecta a ambos cistrones de manera equivalente, lo que sugiere fuertemente que la concentración intracelular de la proteína impacta sobre la estabilidad o síntesis del mRNA. Los resultados sugieren además que el impacto del silenciamiento

de nucleolina sobre la expresión de RLuc y FLuc no es ejercida a nivel traduccional.

### **3.10 La sobreexpresión de nucleolina solo incrementa la actividad del elemento IRES de HTLV-1 a altas concentraciones.**

Posteriormente, se decidió evaluar el impacto de la sobreexpresión de nucleolina sobre el inicio de la traducción mediada por los IRESs de HIV-1, HTLV-1, y MMTV. Para ello, células HEK293T se co-transfectaron con los vectores dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV, con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector pTCN-NCL que codifica para nucleolina. Posterior a la transfección las células se lisaron y la sobreexpresión de nucleolina se verificó mediante un ensayo de western blot (Fig. 22A). Luego, se determinó la actividad de RLuc y FLuc y los resultados se presentan como RTA (%) donde las actividades obtenidas en ausencia del vector pTCN-NCL fueron llevadas al 100 % (Fig. 22B).

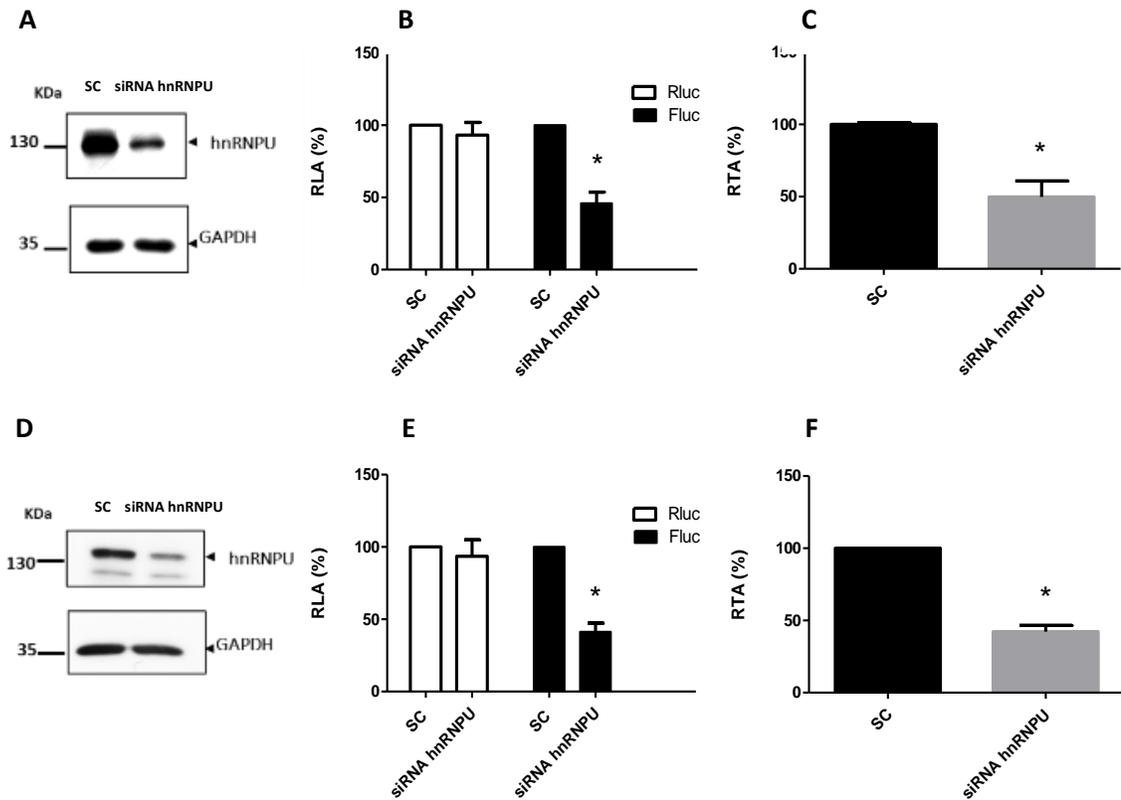


**Figura 22. La sobreexpresión de Nucleolina no afecta la actividad de los IRESs retrovirales.** (A) Células HEK293T se co-transfectaron con 100 ng de los vectores bicistronicos dl  $\Delta$ EMCV, dlHIV-1, dlHTLV-1 y dl MMTV junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia (-) o presencia de 250 y 500 ng de un vector que permite la expresión de nucleolina. (B) Las actividades de los reporteros RLuc y FLuc fueron medidas y normalizadas respecto a la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los valores de actividad luciferasa se expresaron como RTA (%) relativo a la actividad de cada vector bicistronico en ausencia del plásmido que permite la expresión de nucleolina. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Tukey. \*,  $p < 0.05$ .

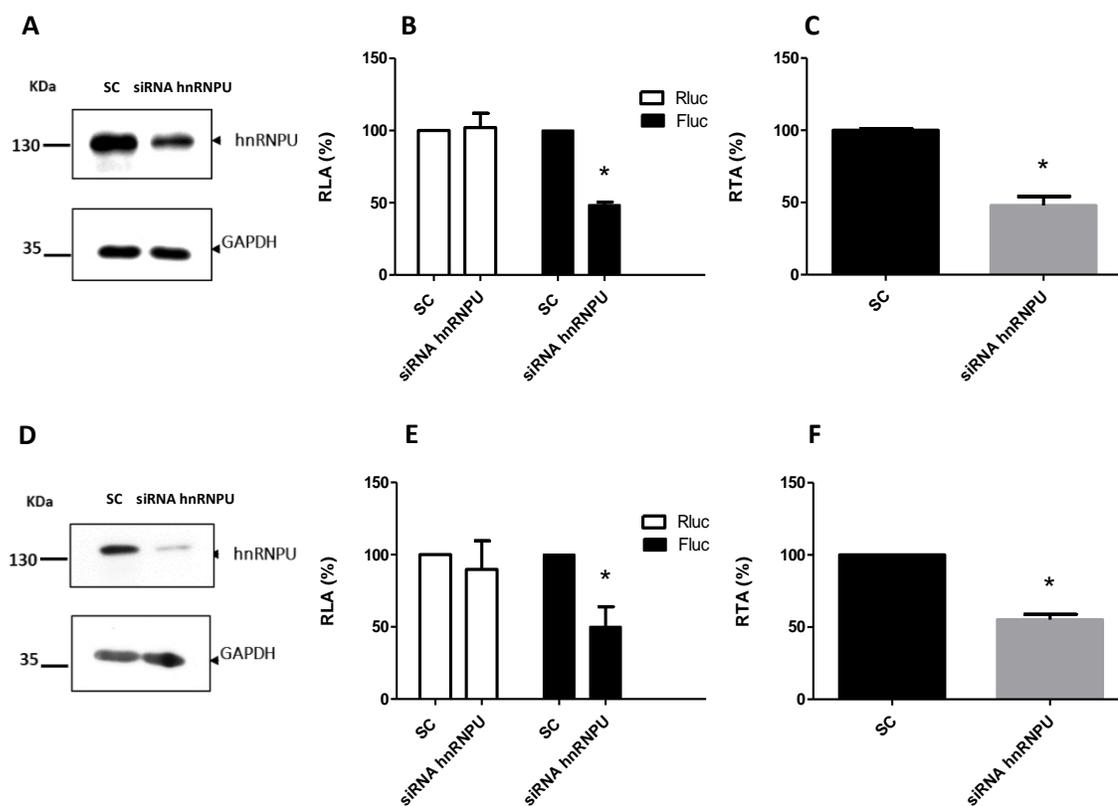
En acuerdo con los resultados presentados previamente, la sobreexpresión de nucleolina en el contexto de células HEK293T no impacta la traducción IRES-dependiente de HIV-1 y MMTV. En el caso de HTLV-1 solo se observa un incremento relativo en la actividad del elemento cuando las células son transfectadas con 500 ng del vector pTCN-NCL.

### **3.11 El silenciamiento de la expresión de hnRNPU afecta el inicio de la traducción IRES retroviral.**

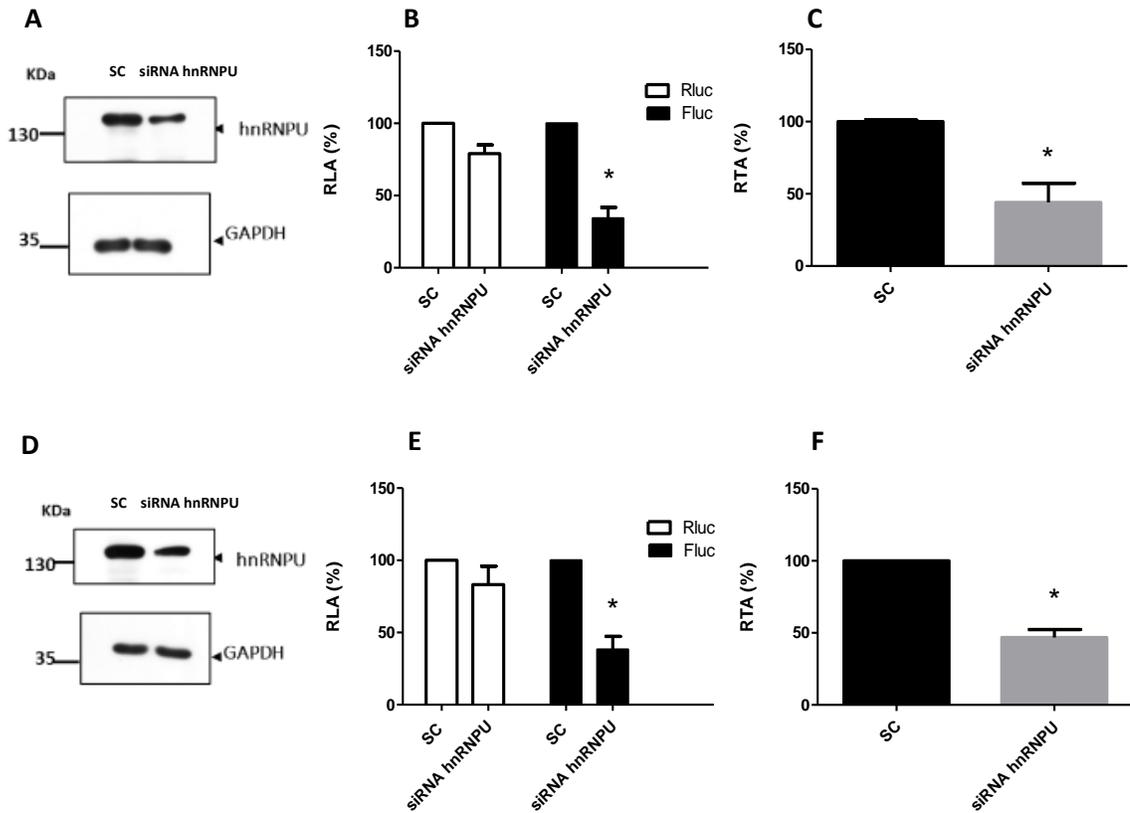
Luego se procedió a evaluar el impacto de la proteína hnRNPU en el inicio de la traducción mediada por los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Para ello, se realizaron ensayos de silenciamiento en la expresión endógena de la proteína utilizando la estrategia de siRNA. En estos ensayos, células Cos-7 y HEK293T se co-transfectaron con los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV en conjunto con el vector vacío pSP64-poly(A) y con 100 nM del siRNA-SC o un siRNA contra el mRNA de hnRNPU. El silenciamiento en la expresión endógena de hnRNPU se evaluó mediante un ensayo de western blot (Fig. 23A,D) (Fig. 24A,D) (Fig. 25A,D). Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RLA (%) y RTA (%) donde las actividades RLuc y FLuc obtenidas en presencia del siRNA-SC fueron llevadas a un 100 % (Fig. 23B,C,E,F) (Fig. 24B,C,E,F) (Fig. 25B,C,E,F).



**Figura 23. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1 requiere de la proteína hnRNPU.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), se transfectaron con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNPU (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNPU sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .



**Figura 24. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HTLV-1 requiere de la proteína hnRNPU.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), se transflectaron con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNPU (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNPU sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

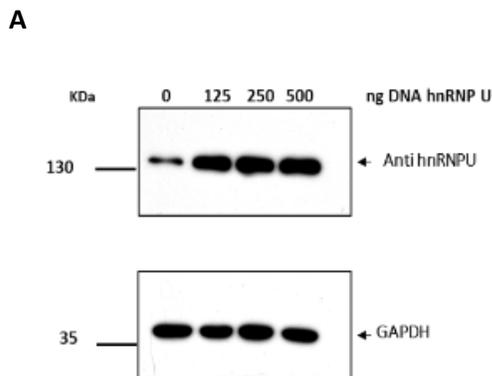


**Figura 25. El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína hnRNPU.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior), se transfectoron con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNPU (A,D). El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNPU sobre la traducción se muestra como RLA (%) (B,E) o RTA (%) (C,F), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que el silenciamiento parcial de hnRNPU impacta negativamente sobre el inicio de la traducción mediada por los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV sin alterar la actividad cap-dependiente.

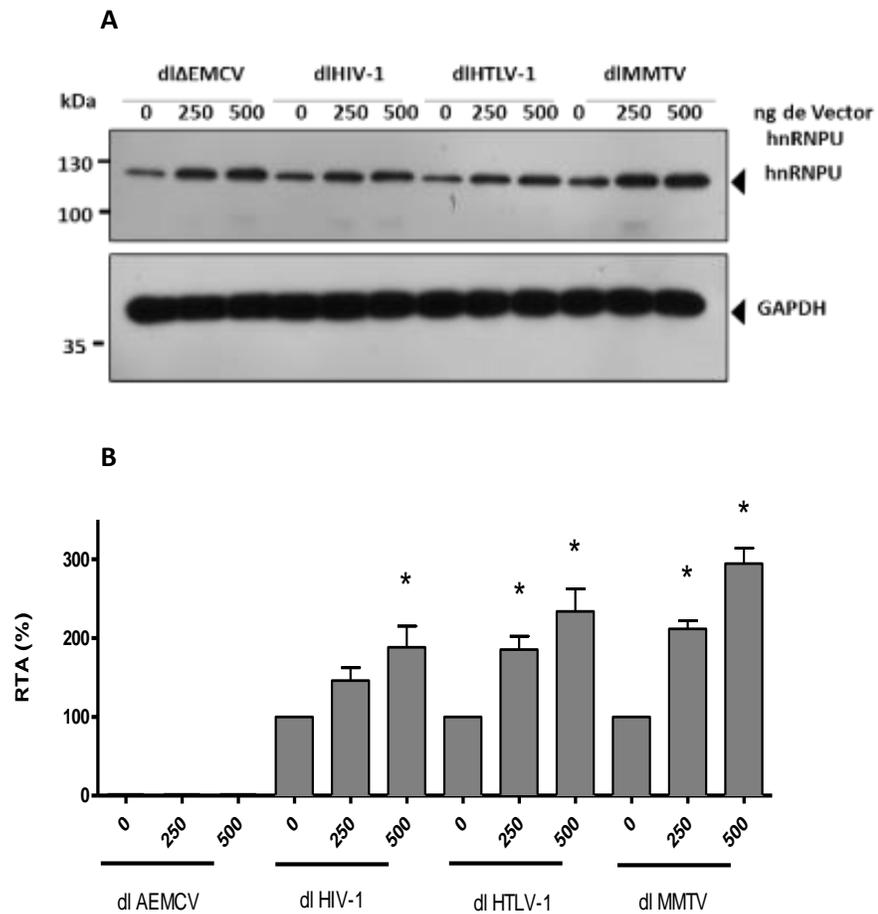
### 3.12 La sobreexpresión de hnRNPU estimula el inicio de la traducción IRES retroviral.

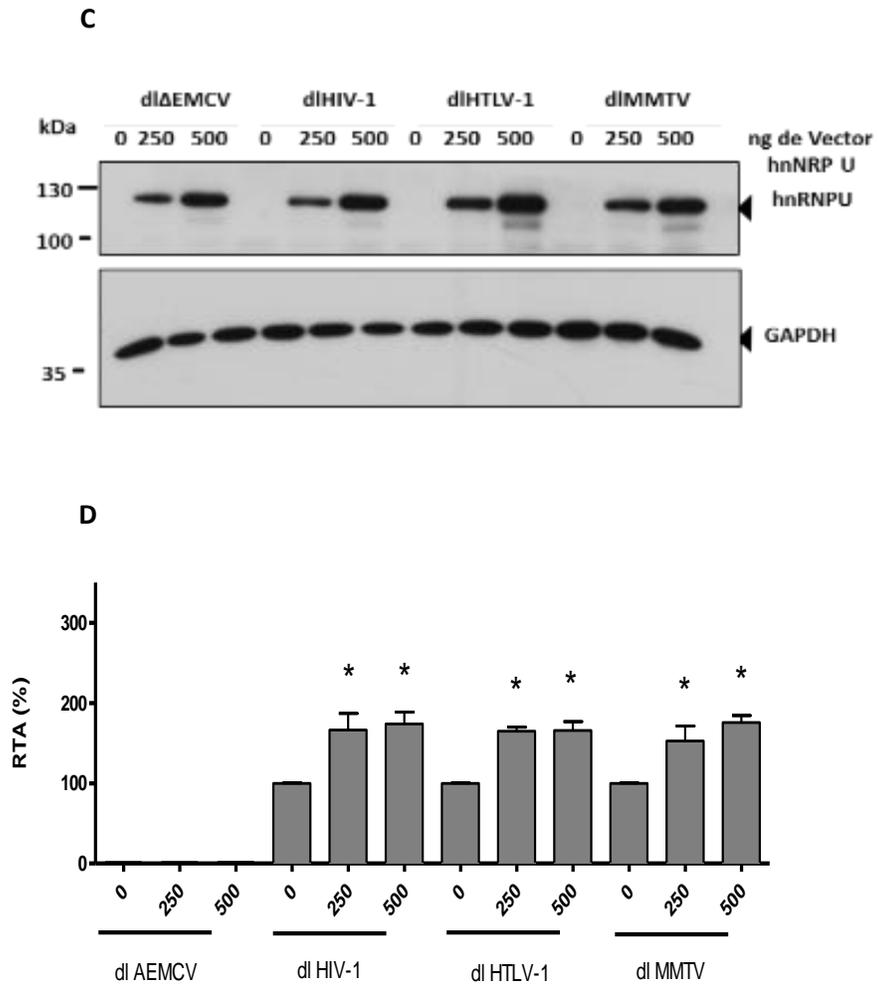
Luego se evaluó el impacto de la sobreexpresión de la proteína hnRNPU sobre el inicio de la traducción mediada por los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Para ello, se generó la construcción pcDNA4/HisMax/hnNRPU la cual permite expresar la proteína hnNRPU fusionada a un *tag* de histidina en células eucariontes. La sobreexpresión de la proteína se visualizó por western blot utilizando un anticuerpo anti-His o anti-hnRNPU (Fig. 26).



**Figura 26. Sobreexpresión de la proteína hnNRPU en células HEK293T.** La transfección del vector pcDNA4/HisMax/hnNRPU permite expresar la proteína hnRNPU en el contexto de células eucariontes e identificarla utilizando un anticuerpo primario anti-His o anti- hnRNPU.

Células HEK293T y Cos-7 se co-transfectaron con los vectores dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector pcDNA4/HisMax/hnRNP. Posterior a la transfección, las células se lisaron y se realizó un ensayo de western blot para evaluar la sobreexpresión de hnRNP en ambos contextos celulares utilizando un anticuerpo anti-hnRNP (Fig. 27A,C). Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RTA (%) relativo a las actividades RLuc y FLuc obtenidas en ausencia del vector pcDNA4/HisMax/hnRNP, las cuales se llevaron al 100 % (Fig. 27B,D).





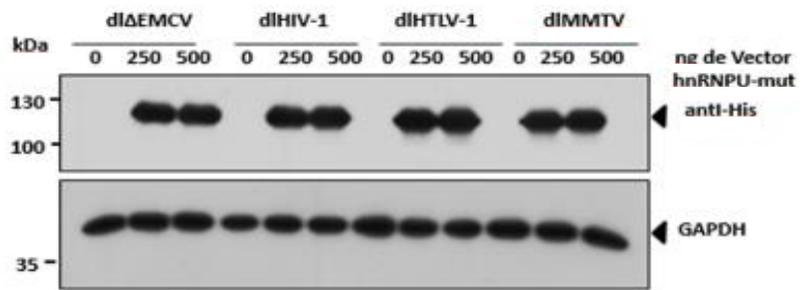
**Figura 27. La sobreexpresión de hnRNPU estimula la actividad de los elementos IRESs retrovirales.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior) se co-transfectaron con 100 ng de los vectores bicistrónicos dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 y dl MMTV junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia o presencia de 250 y 500 ng del vector pcDNA4/HisMax/hnRNPU (A,C). El efecto de la expresión de hnRNPU se muestra cómo RTA (%) (B,D), relativo a la actividad de cada vector bicistrónico en ausencia del plásmido que permite la expresión de hnRNPU. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Tukey. \*,  $p < 0.05$ .

La sobreexpresión de hnRNP<sub>U</sub> en el contexto de células HEK293T y Cos-7 induce un incremento en la actividad del IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

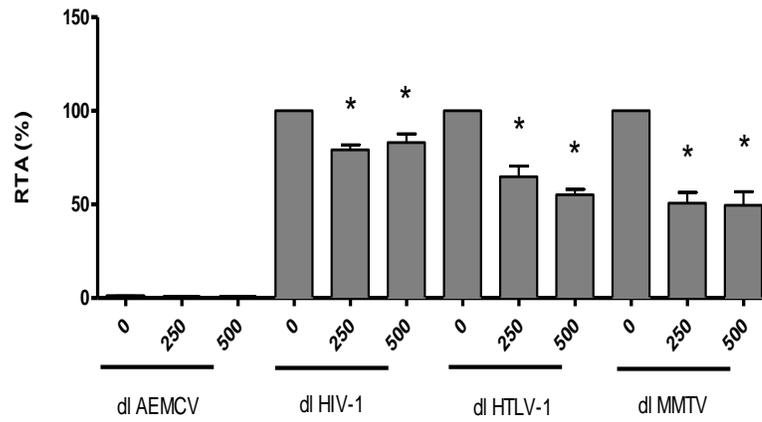
### **3.13 La expresión de la proteína hnRNP<sub>U</sub>mut impacta de manera negativa la actividad de los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV en células HEK293T.**

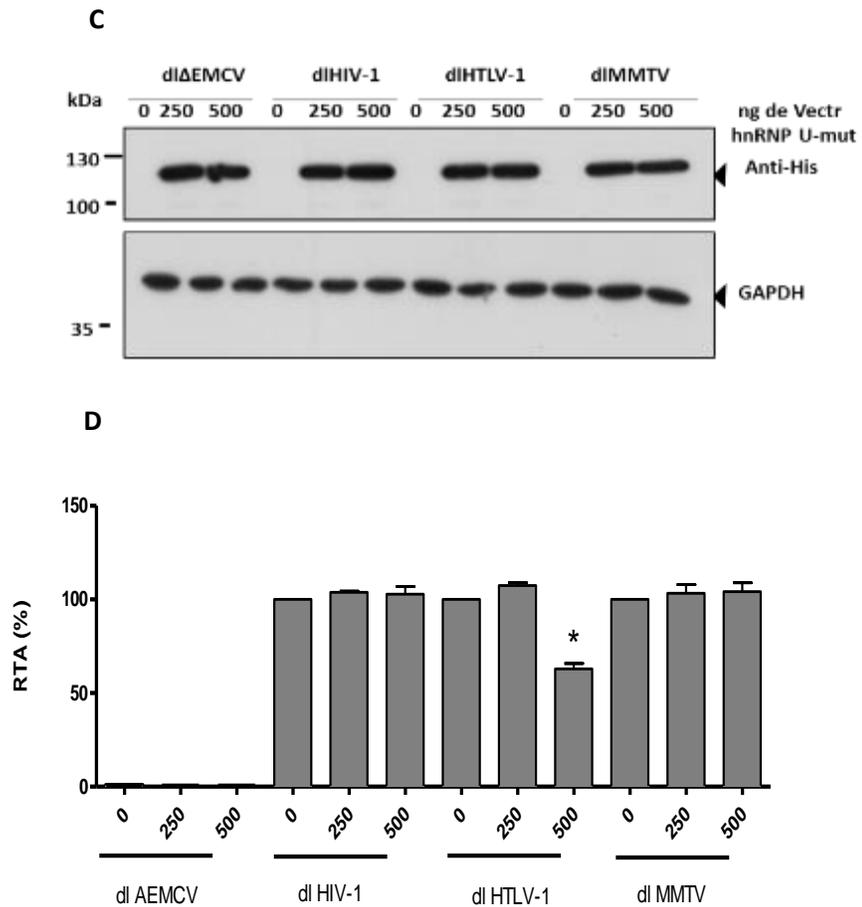
La proteína hnRNP<sub>U</sub> posee un motivo de unión a RNA del tipo RGG. Se decidió determinar el rol del motivo RGG en el efecto ejercido por hnRNP<sub>U</sub> sobre la traducción mediada por los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Para ello, se elaboró la construcción pcDNA4/HisMax/hnRNP<sub>U</sub>mut la cual permite expresar la proteína hnRNP<sub>U</sub> sin el motivo RGG (hnRNP<sub>U</sub>mut) fusionada a un *tag* de histidina. Luego, células HEK293T y Cos-7 se co-transfectaron con los vectores dl ΔEMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector pcDNA4/HisMax/hnRNP<sub>U</sub>mut. La expresión de la proteína hnRNP<sub>U</sub>mut en ambos contextos celulares se confirmó con ensayos de western blot (Fig. 28A,C). La mutación en el motivo RGG de la proteína impide el reconocimiento de la misma a través del anticuerpo anti-hnRNP<sub>U</sub> por esta razón la detección de la proteína se realizó utilizando un anticuerpo anti-His. Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RTA (%) donde las actividades de RLuc y FLuc obtenidas en ausencia del vector pcDNA4/HisMax/hnRNP<sub>U</sub>mut, fueron llevadas al 100 % (Fig. 28B,D).

**A**



**B**





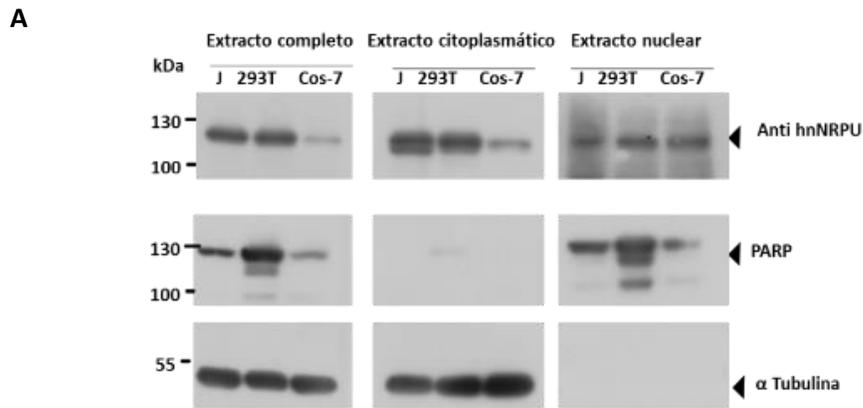
**Figura 28. La expresión de la proteína hnRNP<sub>U</sub>mut impacta de manera negativa la actividad de los IRESs retrovirales.** Células HEK293T (panel superior) o Cos-7 (panel inferior) se co-transfectaron con 100 ng de los vectores bicistrónicos dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1, dl HTLV-1 y dl MMTV junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia o presencia de 250 y 500 ng del vector pcDNA4/HisMax/hnRNP<sub>U</sub>mut (A,C). El efecto de la expresión de hnRNP<sub>U</sub>mut se muestra cómo RTA (%) (B,D), relativo a la actividad de cada vector bicistrónico en ausencia del plásmido que permite la expresión de hnRNP<sub>U</sub>. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Tukey. \*,  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que la sobreexpresión de hnRNPUmut en el contexto de células HEK293T impacta de manera negativa la actividad de los elementos IRES retrovirales. Esto refuerza la noción de que en células HEK293T hnRNPU es requerida para la actividad IRES. En células Cos-7 la expresión de hnRNPUmut no impacta de manera importante la actividad de los IRESs de HIV-1 y MMTV. Sólo el elemento IRES de HTLV-1 se ve afectado por la expresión de esta proteína.

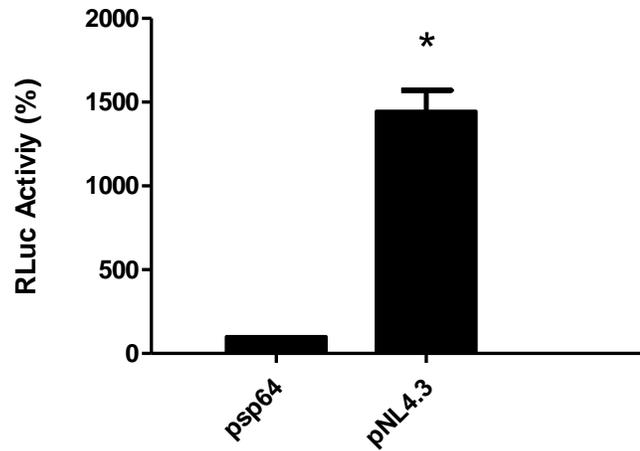
### **3.14 Localización de la proteína hnRNPU en células.**

La proteína hnRNPU migra entre el núcleo y citoplasma (Zhao *et al.*, 2012). Interesantemente, los resultados obtenidos por GRNA/espectrometría de masas nos permitieron identificar esta proteína unida a la región 5'UTR de los gRNAs de HIV-1 y HTLV-1 solo desde los extractos nucleares. Por ello, se decidió evaluar la localización de hnRNPU en las distintas líneas celulares utilizadas en este trabajo. Para ello, se prepararon extractos citoplasmáticos, nucleares y completos desde células Jurkat, Cos-7 y HEK293T utilizando la estrategia experimental descrita previamente en la sección 2.5.2 de materiales y métodos. Posteriormente, los extractos obtenidos se utilizaron en un ensayo de western blot para detectar la localización de hnRNPU. En el experimento, las proteínas PARP y  $\alpha$ -tubulina fueron utilizadas como marcador de núcleo y citoplasma respectivamente (Fig. 29A). Los resultados del ensayo de western blot, revelan que hnRNPU estaría principalmente en la fracción citoplasmática y en menor proporción en la fracción nuclear de cada línea celular. Considerando estos resultados, se evaluó la localización de hnRNPU en células HEK293T y su distribución en el contexto de una infección viral mediante

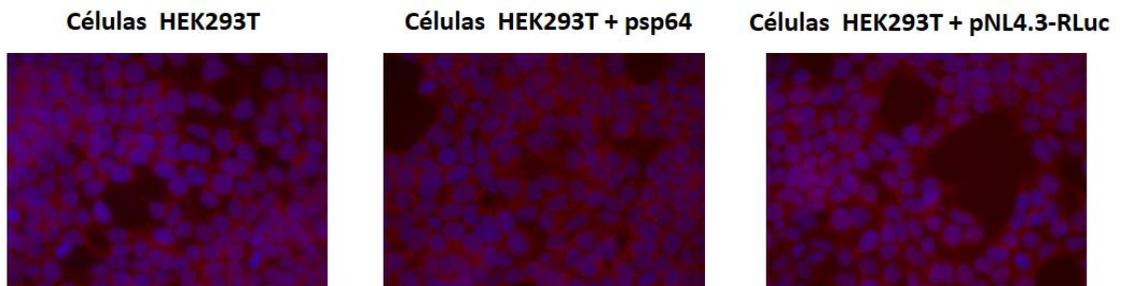
ensayos de inmunofluorescencia. En el experimento, células HEK293T se crecieron sobre un *cover* de vidrio hasta el 60 % de confluencia y se transfectaron con el vector psp64 o con el vector pNL4.3-RLuc el cual permite la expresión de HIV-1/RLuc que posee incorporado en la región codificante de la proteína Gag, la región codificante para la proteína RLuc (Soto-Rifo *et al.*, 2012). La transfección de este vector en el contexto de células HEK293T permite evaluar la traducción del gRNA de HIV-1 a través de la determinación de la actividad de RLuc (Fig. 29B). Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia permiten confirmar que la localización de hnRNPU en células HEK293T, visualizada como las marcas fluorescentes rojas, es de preferencia citoplasmática. Más aún, cuando las células son transfectadas con el vector psp64 o pNL4.3-RLuc, no se observa un cambio en la localización de la proteína (Fig. 29C).



**B**



**C**



**Figura 29. Localización celular de la proteína hnRNPU.** (A) Extractos completos, citoplasmáticos y nucleares obtenido de células Jurkat (panel izquierdo), Cos-7 (panel central) y HEK293T (panel derecho) analizados por western blot para evaluar la localización de la proteína hnRNPU. (B) Actividad RLuc en células HEK293T transfectadas con el vector psp64 o con el vector pNL4.3-RLuc (C) Evaluación por inmunofluorescencia de la localización de hnRNPU (rojo) en células HEK293T en ausencia (panel izquierdo) o en presencia del vector psp64 (panel central) y del clon infeccioso pNL4.3-RLuc (panel derecho). El análisis estadístico fue realizado mediante t-test no paramétrico. \*,  $p < 0.05$ .

## 4. DISCUSIÓN

Los mecanismos moleculares que determinan el reconocimiento de los IRES por parte de la maquinaria de inicio de la traducción celular no son del todo claros. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el funcionamiento de estos elementos depende, en algunos casos, de su capacidad de interactuar con ITAFs (King, Cobbold and Willis, 2010). Se ha propuesto que los ITAFs favorecerían la estructuración de los IRESs lo que permitiría el reclutamiento de la maquinaria de inicio de la traducción (López-Lastra, Rivas and Barría, 2005). Desde la caracterización inicial de estos elementos en picornavirus (Jang *et al.*, 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988), se ha descrito la presencia de IRESs en mRNAs provenientes de distintas familias virales incluyendo a los *Retroviridae* (Buck *et al.*, 2001; Brasey *et al.*, 2003; Balvay *et al.*, 2007; Vallejos *et al.*, 2009; de Breyne *et al.*, 2012; Ohlmann, Mengardi and López-Lastra, 2014; Olivares *et al.*, 2014)

En la actualidad, la utilización de construcciones bicistrónicas (Fig.1) es la metodología principal para la identificación y caracterización de un IRES. En estudios realizados con IRESs celulares, se ha descrito que la actividad de estos elementos puede variar significativamente si los experimentos para evaluar su función se realizan a partir de transfecciones de DNA o RNA bicistrónico (Semler and Waterman, 2008). Resultados similares a los observados con los IRESs celulares se obtienen bajo estas mismas condiciones experimentales con los IRESs retrovirales (Olivares, 2014). En este trabajo,

se demostró mediante ensayos de transfección de vectores bicistrónicos que los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 son funcionales en el contexto de células HeLa. Sin embargo, cuando se transfectan los mRNAs bicistrónicos sintetizados *in vitro* a partir de estos mismos vectores, se observa una pérdida de la actividad de ambos elementos (Olivares, 2014).

Se ha propuesto que esta diferencia en la actividad se debe a que tanto los IRESs celulares como retrovirales requieren un paso previo por el núcleo, condición que no se cumple al realizar transfecciones de mRNAs. En este contexto, se postula que durante la síntesis de los gRNAs retrovirales en el núcleo, distintas proteínas celulares se asociarían a estos formando complejos ribonucleoproteicos (RNP), los cuales posteriormente viajarían asociados al gRNA durante el proceso de transporte hacia el citoplasma (Cochrane, McNally and Mouland, 2006; Semler and Waterman, 2008).

Considerando estos antecedentes, se postula que la pérdida en la actividad traduccional de los elementos IRES de HIV-1 y HTLV-1 en los ensayos de transfección de mRNA se debe a la ausencia de ITAFs nucleares que son requeridos para modular la actividad traduccional de ambos elementos retrovirales.

Debido a esto, este trabajo de tesis se centró en la búsqueda de ITAFs que modulen la actividad de IRESs retrovirales haciendo énfasis en la búsqueda de proteínas cuya función biológica es preferentemente ejercida en el núcleo. Como criterio de selección se focalizó en proteínas celulares que participan en el metabolismo nuclear del RNA.

#### 4.1 El elemento MMTV IRES es funcional en células HEK293T

Nuestra primera aproximación experimental consistió en revalidar la función del elemento MMTV IRES en el contexto de células HEK293T. Para ello, realizamos transfecciones de DNA utilizando un vector bicistrónico que posee la secuencia del elemento IRES de MMTV clonado en la región intercistronica (Fig. 4A). En este contexto, la expresión del primer cistron (correspondiente a la síntesis de la proteína reportera RLuc) ocurre de manera cap-dependiente mientras que la expresión del segundo cistron (correspondiente a la síntesis de la proteína reportera FLuc) ocurre sólo si el elemento IRES de MMTV es capaz de reclutar la maquinaria de inicio de la traducción. Los resultados obtenidos, nos permiten demostrar que en el contexto de células HEK293T el IRES de MMTV es funcional (Fig. 4B). A pesar de esto, la utilización de vectores bicistrónicos ha sido previamente cuestionada por algunos autores, los cuales plantean que las actividades de los elementos IRESs podrían corresponder a artefactos originados por la presencia de un promotor críptico río arriba de la región codificante de la proteína FLuc o debido a eventos de *splicing alternativo*. Ambas posibilidades se descartaron de manera experimental (Fig. 5 y 6), demostrando que el elemento IRES de MMTV es funcional en el contexto de células HEK293T.

#### **4.2 La proteína PTB1 es un ITAF para el IRES de MMTV.**

La proteína PTB1, también conocida como hnRNPI, es una proteína involucrada en diferentes procesos dentro de la célula. Se ha demostrado que esta proteína participa en eventos de *splicing*, localización, estabilidad y procesamiento del extremo 3' de algunos mRNAs (Romanelli, Diani and Lievens, 2013). Estructuralmente, PTB1 se caracteriza por poseer 4 motivos RRM de unión a RNA, una señal de localización nuclear y una señal de exporte nuclear (Oberstrass, 2005; Auweter and Allain, 2008), lo que permite el tránsito de ésta proteína entre el núcleo y el citoplasma. Diversos trabajos han descrito que PTB1 funciona como un ITAF para distintos IRES virales como es el caso del IRES del virus de la hepatitis C (HCV), el IRES del virus polio (PV) y el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (Gosert *et al.*, 2000; Kafasla *et al.*, 2009, 2010). Considerando el análisis de secuencia de la región 5'UTR de MMTV y la identificación de distintos sitios putativos de unión a la proteína PTB (Fig. 7) nos pareció pertinente evaluar la participación de esta proteína en la traducción mediada por el IRES de MMTV. Para ello, realizamos un ensayo de silenciamiento con el fin de disminuir la expresión endógena de la proteína. Los resultados obtenidos demuestran que la disminución en la expresión de PTB impacta negativamente la actividad del elemento IRES de MMTV sin afectar el inicio de la traducción cap-dependiente (Fig. 8A, B). Estos resultados nos permiten establecer que PTB1 puede funcionar como un ITAF para este elemento y que es necesaria para iniciar la traducción IRES-dependiente de MMTV.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de la proteína sobre el inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV. Para esto, se transfectó el vector

bicistrónico de MMTV junto con el vector pcDNA4/HisMax/PTB1. Los resultados obtenidos demuestran que el aumento en la expresión de PTB1 (Fig. 9A), resulta en una estimulación de la actividad del elemento IRES (Fig. 9B). La estimulación traduccional del IRES de MMTV es similar a la obtenida con el IRES de HCV, utilizado en el experimento como control positivo. Esta observación es interesante ya que una diferencia entre el mRNA de MMTV y HCV es que este último no transita por el núcleo de la célula, a diferencia de lo que ocurre con el gRNA de MMTV. Considerando esta observación y que PTB1 es capaz de translocar entre el núcleo y el citoplasma, los resultados obtenidos no nos permiten determinar en qué compartimento celular ocurre la asociación entre PTB1 y el IRES de MMTV. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de la sobreexpresión de PTB1 permiten confirmar que la proteína no estimula la traducción IRES-dependiente de HIV-1, en acuerdo con lo que se ha descrito en trabajos previos (Waysbort *et al.*, 2001). Estos resultados, en conjunto, demuestran que PTB1 actúa selectivamente como un ITAF entre los IRES retrovirales y en el caso particular de este trabajo podemos concluir que PTB1 actúa como un ITAF para el IRES de MMTV.

A continuación, y considerando la presencia de múltiples sitios putativos de unión para la proteína PTB1 en la región 5'UTR de MMTV (Fig. 7), se procedió a evaluar la capacidad de interacción de PTB1 con la región 5'UTR de MMTV. Diversos trabajos han demostrado que la interacción de ésta proteína con su mRNA blanco puede ocurrir a través de dos mecanismos distintos. El primero de ellos comprende la asociación de un factor celular al IRES el que provocaría un cambio conformacional en la estructura del elemento y permitiría el posterior reclutamiento de PTB1. El segundo mecanismo comprende una

interacción directa de la proteína con el mRNA (Niepmann *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2003). Se demostró a través de ensayos de UV-CLIP que la proteína PTB1 interactúa con la región 5'UTR de MMTV (Fig. 10). Los resultados obtenidos por UV-CLIP demuestran que la interacción RNA/proteína es específica entre la región 5'UTR de MMTV y PTB1 (Fig. 10A) y que dicha interacción supera incluso a la observada con el control positivo (Fig. 10B). Estos resultados nos permiten determinar que PTB1 se une a la región 5'UTR de MMTV, sin embargo, no nos permiten determinar con exactitud el lugar específico de interacción.

Luego, evaluamos si los motivos RRM de PTB1 son necesarios para estimular la actividad del elemento IRES de MMTV. Para ello, se realizaron mutaciones agrupadas en los motivos RRM1/RRM2 y RRM3/ RRM4 las cuales anulan la capacidad de PTB1 de unirse a sus secuencias blanco. La selección de estas mutaciones se basó además en que los motivos RRM3 y RRM4 interactúan formando una estructura coordinada en la proteína la que permite la unión de estos motivos a los trectos de pirimidina induciendo la formación de loops en el RNA (Oberstrass, 2005; Lamichhane *et al.*, 2010). Al co-transfectar la construcción bicistrónica de MMTV en conjunto con los vectores que permiten la expresión de las proteínas mutantes o *wild type* (Fig. 11A), se observa que las mutaciones introducidas en los motivos RRM1/RRM2 y RRM3/RRM4 resultan en una inhibición de la traducción IRES-dependiente de MMTV en comparación a la actividad observada en presencia de la proteína *wild type* (Fig. 11C), indicando por lo tanto que los motivos RRM son necesarios para estimular la actividad del elemento. Estos resultados sin embargo no nos permiten determinar la participación individual de cada motivo.

Trabajos realizados previamente han demostrado que la regulación de PTB1 sobre un elemento IRES puede requerir sólo de algunos RRM. Por ejemplo, en el caso del IRES de PV, se ha descrito que el RRM3 de PTB1 no se encuentra en contacto directo con el RNA y por lo tanto mutaciones en este motivo no afectan considerablemente la actividad del IRES (Kafasla *et al.*, 2011).

#### **4.3 Identificación de proteínas que interactúan con la región 5'UTR del gRNA de HIV-1 y HTLV-1.**

Una vez determinado que PTB1 funciona como un ITAF para el IRES de MMTV, quisimos extender la búsqueda de factores celulares que interactúan con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1. Para ello, se realizó un ensayo de GRNA, el cual, como se describió en la sección 2.7 de materiales y métodos, permite aislar complejos RNPs a partir de fracciones nucleares o citoplasmáticas obtenidas desde la línea celular Jurkat (Fig. 14). La identificación de los componentes presentes en los complejos que se forman sobre la región 5'UTR de HIV-1 o HTLV-1, fue realizada por espectrometría de masas, lo que nos permitió obtener una lista de proteínas. Esta lista, fue luego comparada con las proteínas que se asocian al RNA 3BoxB (control de interacción inespecífico) y por ende sólo se seleccionaron aquellos factores que interactúan de manera específica con la región 5'UTR de HIV-1 o HTLV-1. Posteriormente, comparamos nuestros resultados con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Vallejos *et al.*, 2011), y aún, cuando en este trabajo las fracciones utilizadas no fueron obtenidas desde un contexto celular adecuado, las proteínas identificadas fueron utilizadas como un patrón de comparación para seleccionar

aquellos factores con mayor probabilidad de interacción. De esta manera, se realizó un análisis sustractivo en el cual sólo se seleccionaron las proteínas que estaban presentes en ambas listas (Tablas 1,2,3 y 4), entre las que se encontraban nucleolina y hnRNPU. Ambas proteínas participan en eventos nucleares asociados al metabolismo del RNA (Tajrishi, Tuteja and Tuteja, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2017), por lo cual fueron evaluadas en este trabajo de tesis como posibles ITAFs de los IRES retrovirales.

#### **4.4 Actividad de los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 en células Cos-7 y HEK293T.**

Las líneas celulares que utilizamos en estos estudios fueron HEK293T y Cos-7 ya que ambas son de fácil transfección y han sido previamente utilizadas para el estudio de elementos IRESs (Vallejos *et al.*, 2009; Carvajal *et al.*, 2012; Olivares *et al.*, 2014; Cáceres *et al.*, 2016). Además, la expresión de nucleolina y hnRNPU se detecta en las líneas celulares Jurkat, Cos-7 y HEK293T (Fig. 15). Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la expresión de nucleolina en los tres contextos celulares y bajo las mismas condiciones experimentales es similar (Fig. 15A). Sin embargo, al analizar la expresión de hnRNPU logramos observar que esta es similar entre las células HEK293T y Jurkat pero se observa una baja detección en el contexto de las células Cos-7 (Fig. 15B). Este resultado podría explicarse debido a que cada línea celular tiene distintos orígenes y/o a la expresión diferencial de proteínas según el tipo de tejido. A pesar de esta diferencia decidimos utilizar la línea celular Cos-7 ya que nos pareció interesante comparar la participación de hnRNPU en un contexto de mayor y menor expresión.

A continuación, y considerando nuestro nuevo *background* celular, re-validamos el funcionamiento de los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 en el contexto de células HEK293T y Cos-7. Consideramos además incluir en el estudio el elemento IRES de MMTV a modo de diversificar los elementos IRES retrovirales sobre los cuales evaluamos la participación de las proteínas nucleolina y hnRNPU. En este contexto, la revalidación de los elementos IRESs de HIV-1 y HTLV-1 se realizó en ambas líneas celulares, mientras que el elemento IRES de MMTV solo se caracterizó en la línea celular Cos-7 considerando que había sido previamente revalidado en células HEK293T (Fig. 4, 5 y 6). Es así como se validó que los elementos IRES de HIV-1 y HTLV-1 son funcionales en células HEK293T y Cos-7 (Fig. 16, 17 y 18) mientras que el elemento IRES de MMTV además de ser funcional en células HEK293T también lo es en células Cos-7 (Fig. 16, 17 y 18).

Luego se procedió a evaluar la participación de las proteínas nucleolina y hnRNPU en el inicio de la traducción IRES retroviral.

#### **4.5 La proteína nucleolina no es un ITAF para los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.**

Nucleolina ha sido descrito como una proteína ubicua ya que es posible encontrarla distribuida dentro de la célula en el nucléolo, citoplasma y membrana plasmática (Salveti *et al.*, 2016) y porque además participa en distintos procesos celulares como: regulación de la expresión génica, transcripción, proliferación, crecimiento celular y metabolismo del RNA (Salveti *et al.*, 2016). Se ha descrito que la participación de nucleolina en estos

procesos se debe a su capacidad de interactuar con DNA, RNA y proteínas (Salveti *et al.*, 2016).

Diversos estudios han sugerido además que nucleolina podría estar involucrada en distintos eventos asociados a una infección viral. En este contexto, una infección con adenovirus o PV resulta en una relocalización y acumulación de la proteína en el citoplasma de la célula (Jia *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión ectópica de la proteína en bajas concentraciones estimula el inicio de la traducción IRES-dependiente de PV (Izumi *et al.*, 2001).

Considerando estos antecedentes y los resultados obtenidos por espectrometría de masas, los cuales nos permitieron aislar esta proteína desde los complejos RNPs formados sobre el 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1, decidimos evaluar la participación de nucleolina en el inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Sin embargo, y a pesar de lo anticipado los resultados muestran que nucleolina no es un ITAF para los IRESs retrovirales evaluados (Fig.19, 20 y 21) ya que la disminución en la expresión de la proteína afecta la actividad de RLuc como de FLuc. Esto podría deberse a que una disminución en la expresión de nucleolina podría afectar los distintos procesos en los que ésta participa como: transcripción, ensamblaje de ribosomas y estabilidad de los mRNAs (Jia *et al.*, 2017). Este trabajo no incluyó experimentos destinados a dilucidar esta observación. En acuerdo con esta observación, la sobreexpresión de la de nucleolina no afecta el inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1 y MMTV (Fig. 22B). Sin embargo, en el caso del HTLV-1 IRES se observa un incremento en la actividad del elemento, el cual sólo ocurre cuando se transfectan 500 ng del vector pTCN-NCL (Fig.

22B.), es decir, nucleolina puede incrementar la actividad del IRES de HTLV-1 pero sólo cuando se encuentra en altas concentraciones en la célula.

#### **4.6 La proteína hnRNPU es un ITAF para los IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.**

La proteína hnRNPU también conocida como SAF-A, pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneo nucleares y fue identificada en este trabajo por espectrometría de masas como uno de los factores nucleares asociados al 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1. HnRNPU posee dentro de la célula una localización preferentemente nuclear, pero puede deslocalizarse entre el núcleo y citoplasma (Zhao *et al.*, 2012). Entre sus características estructurales destaca la presencia de un motivo rico en glicinas y argininas denominada RGG que le confiere la capacidad de interactuar con el RNA (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). Se ha descrito, que esta proteína además tiene la capacidad de interactuar con DNA y proteínas y por tanto participa en procesos celulares como transcripción, procesamiento del RNA y estabilización de algunos mRNAs (Göhring and Fackelmayer, 1997; Yugami *et al.*, 2007; Ameyar-Zazoua *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que hnRNPU interactúa con la proteína viral Rev del virus HIV-1 *in vitro* (Hadian *et al.*, 2009). Durante el ciclo replicativo de HIV-1, la proteína Rev participa en el proceso de transporte de los mRNAs virales parcialmente procesados o no procesados, entre los que se encuentra el gRNA de HIV-1 (Frankel and Young, 1998).

El primer ensayo que se realizó consistió en silenciar la expresión de la proteína

utilizando la estrategia de siRNA. Los resultados obtenidos demuestran que un silenciamiento parcial en la expresión de hnRNPU es suficiente para afectar negativamente el inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1, HTLV-1 y MMTV en el contexto de células HEK293T y Cos-7 (Fig. 23,24,25). Como se observa en los resultados, la baja expresión de la proteína no compromete el inicio de la traducción cap-dependiente por lo que se puede sugerir que el efecto es específico sobre la actividad de los elementos IRESs. Por otra parte, la sobreexpresión de la proteína resulta en una estimulación de la actividad de los elementos IRESs retrovirales de manera concentración dependiente en ambos contextos celulares (Fig. 27B,D). Por cuanto hnRNPU es un ITAF para los IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

Para extender el estudio de la proteína hnRNPU decidimos evaluar la participación del motivo RGG en el inicio de la traducción IRES retroviral. Para ello, células HEK293T y Cos-7 se transfectaron con concentraciones crecientes del vector pcDNA4/HisMax/hnNRPUmut en conjunto con los vectores bicistrónicos dl HIV-1, dl HTLV-1 o dl MMTV. Los resultados obtenidos permitieron determinar que en el contexto de células HEK293T, la expresión de la proteína hnNRPUmut impacta de manera negativa el inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1, HTLV-1 y MMTV (Fig. 28B). Por otra parte, en el contexto de células Cos-7 sólo el inicio de la traducción IRES-dependiente de HTLV-1 se ve comprometido (Fig. 28D), lo que sugiere que la interacción hnRNPU/RNA es importante para modular la actividad de algunos IRESs retrovirales de manera contexto celular dependiente. Esta diferencia podría deberse a la expresión diferencial de proteínas entre distintos contextos celulares lo que sugiere que el

ensamblaje de complejos RNPs sobre los mRNAs puede variar según el *background* proteico de la célula. Más aún, y considerando que hnRNPU interactúa con otras proteínas dentro de la célula, los resultados nos permiten sugerir que la expresión de hnRNPUmut podría alterar la formación de los complejos RNPs sobre los IRESs, lo que resulta en una disminución de la actividad de estos elementos.

A la fecha existen pocos antecedentes de la participación de hnRNPU en el inicio de la traducción IRES-dependiente viral. En el año 2004 Lu y cols. identificaron proteínas celulares asociadas al 5'UTR de HCV entre las que se encontraba la proteína hnRNPU. En esta investigación se planteó que la proteína puede ser un nuevo factor celular involucrado en la regulación de la traducción IRES-dependiente de HCV. Más aún, los autores proponen que hnRNPU asociada al mRNA de HCV podría actuar de forma similar a lo que ocurre con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Durante la infección viral con VSV, hnRNPU se une al RNA *leader* viral en el núcleo de la célula y luego colocaliza con el virus en el citoplasma. Además, es posible encontrarla empaquetada en viriones purificados, lo que sugiere un rol importante de hnRNPU en el ciclo replicativo de VSV (Gupta, Drazba and Banerjee, 1998).

Considerando estos antecedentes evaluamos la localización de hnRNPU durante la infección viral con HIV-1. En este contexto, la primera aproximación experimental que utilizamos consistió en identificar mediante western blot la presencia de la proteína en extractos completos, citoplasmático y nuclear provenientes de células Jurkat, HEK293T y Cos-7 con el objetivo de evaluar su distribución en las distintas fracciones. Los resultados obtenidos permiten identificar la proteína en todas las fracciones evaluadas

siendo ésta más abundante en la fracción citoplasmática (Fig. 29A). A continuación, y como una forma de corroborar nuestros resultados, evaluamos la distribución de la proteína en células HEK293T por inmunofluorescencia. Al igual que lo observado por western blot, hnRNPU se encuentra mayoritariamente localizada en el citoplasma de la célula (Fig. 29C, panel izquierdo). Más aún, posterior a la transfección con el clon infeccioso pNL4.3-RLuc no se observa un cambio en la distribución de la proteína (Fig. 29C, panel derecho).

Estos resultados sugieren que si bien la proteína posee una localización mayoritariamente citoplasmática, es probablemente la fracción que se encuentra confinada en el núcleo la necesaria para modular la actividad del elemento IRES de HIV-1, ya que la proteína localizada en el citoplasma no es capaz de asociarse al 5'UTR de HIV-1 como se demuestra a través de los ensayos de GRNA acoplados a espectrometría de masas, mientras que sólo la proteína localizada en la fracción nuclear es capaz de asociarse al RNA.

## CONCLUSIONES

- 1.-La proteína PTB1 se une a la región 5'UTR de MMTV y actúa como un ITAF para el IRES de MMTV.
- 2.-Los motivos de unión a RNA RRM de PTB1 son necesarios para estimular la actividad del elemento IRES de MMTV.
- 3.-La proteína nucleolina interactúa con la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1, sin embargo, no actúa como un ITAF para los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.
- 4.- La proteína hnRNPU se une a la región 5'UTR de HIV-1 y HTLV-1 y actúa como un ITAF para los IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

## BIBLIOGRAFÍA

Ali, N. and Siddiqui, a (1995) 'Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation.', *Journal of virology*, 69(10), pp. 6367–6375.

Ameyar-Zazoua, M. *et al.* (2009) 'Physical and functional interaction between heterochromatin protein 1 $\alpha$  and the RNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U', *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), pp. 27974–27979. doi: 10.1074/jbc.M109.037929.

Auweter, S. D. and Allain, F. H. T. (2008) 'Structure-function relationships of the polypyrimidine tract binding protein', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(4), pp. 516–527. doi: 10.1007/s00018-007-7378-2.

Baird, S. D. *et al.* (2006) 'Searching for IRES', (613), pp. 1755–1785. doi: 10.1261/rna.157806.RNA.

Balvay, L. *et al.* (2007) 'Translational control of retroviruses.', *Nature reviews. Microbiology*, 5(2), pp. 128–140. doi: 10.1038/nrmicro1599.

Baranick, B. T. *et al.* (2008) 'Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

*United States of America*, 105(12), pp. 4733–4738. doi: 10.1073/pnas.0710650105.

Barría, M. I. *et al.* (2009) ‘Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in cap-independent translation’, *Nucleic Acids Research*, 37(3), pp. 957–971. doi: 10.1093/nar/gkn1022.

Basavapathruni, A. and Anderson, K. S. (2007) ‘Reverse transcription of the HIV-1 pandemic.’, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(14), pp. 3795–808. doi: 10.1096/fj.07-8697rev.

Bériault, V. *et al.* (2004) ‘A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), pp. 44141–44153. doi: 10.1074/jbc.M404691200.

Boeras, I., Sakalian, M. and West, J. T. (2012) ‘Translation of MMTV Gag requires nuclear events involving splicing motifs in addition to the viral Rem protein and RmRE.’, *Retrovirology*, 9, p. 8. doi: 10.1186/1742-4690-9-8.

Brasey, A. *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), pp. 3939–49. doi: 10.1128/JVI.77.7.3939.

de Breyne, S. *et al.* (2012) ‘Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs’, *Virus Research*, 171, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.006.

Buck, C. B. *et al.* (2001) 'The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site', *Journal of Virology*, 75(1), pp. 181–191. doi: 10.1128/JVI.75.1.181.

Cáceres, C. J. *et al.* (2016) 'Targeting deoxyhypusine hydroxylase activity impairs cap-independent translation initiation driven by the 5'untranslated region of the HIV-1, HTLV-1, and MMTV mRNAs', *Antiviral Research*, 134, pp. 192–206. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.09.006.

Carvajal, F. *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), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0035031.

Cochrane, A. W., McNally, M. T. and Mouland, A. J. (2006) 'The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity', *Retrovirology*, 3, p. 18. doi: 10.1186/1742-4690-3-18.

Czaplinski, K. *et al.* (2005) 'Identification of 40LoVe, a xenopus hnRNP D family protein involved in localizing a TGF- $\beta$ -related mRNA during oogenesis', *Developmental Cell*, 8(4), pp. 505–515. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.012.

Emerman, M. (1996) 'HIV-1, Vpr and the cell cycle.', *Current biology: CB*, 6(9), pp. 1096–103. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00676-0.

Frankel, a D. and Young, J. a (1998) 'HIV-1: fifteen proteins and an RNA.', *Annual*

*review of biochemistry*, 67, pp. 1–25. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.1.

Gallie, D. R. (1991) ‘The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency.’, *Genes & Development*, 5(11), pp. 2108–2116. doi: 10.1101/gad.5.11.2108.

Gebauer, F. and Hentze, M. W. (2004) ‘Molecular mechanisms of translational control’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), pp. 827–835. doi: 10.1038/nrm1488.

Gendron, K. *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), pp. 902–912. doi: 10.1093/nar/gkq885.

Göhring, F. and Fackelmayer, F. O. (1997) ‘The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: A chemical cross-linking study’, *Biochemistry*, 36(27), pp. 8276–8283. doi: 10.1021/bi970480f.

Gosert, R. *et al.* (2000) ‘Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites In vivo’, *Mol Cell Biol*, 20(5), pp. 1583–1595. doi: 10.1128/MCB.20.5.1583-1595.2000.

Grover, R., Ray, P. S. and Das, S. (2008) ‘Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms’, *Cell Cycle*, 7(14), pp. 2189–2198. doi: 10.4161/cc.7.14.6271.

Gupta, A. K., Drazba, J. A. and Banerjee, A. K. (1998) 'Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle U with the leader RNA sequence of vesicular stomatitis virus', *J Virol*, 72(11), pp. 8532–8540. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765391>.

Hadian, K. *et al.* (2009) 'Identification of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-recognition region in the HIV rev protein', *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), pp. 33384–33391. doi: 10.1074/jbc.M109.021659.

Han, S. P., Tang, Y. H. and Smith, R. (2010) 'Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives', *Biochemical Journal*, 430(3), pp. 379–392. doi: 10.1042/BJ20100396.

Hellen, C. U. T. and Sarnow, P. (2001) *Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules*, *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.891101.

Hunt, S. L. and Jackson, R. J. (1999) 'Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA.', *RNA (New York, N.Y.)*, 5(3), pp. 344–59. doi: 10.1017/S1355838299981414.

Izumi, R. E. *et al.* (2001) 'Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation', *Virus Research*, 76(1), pp. 17–29. doi: 10.1016/S0168-1702(01)00240-4.

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), pp. 2636–43.

Jerry, P. & S. N. (1988) ‘Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA’, *Nature*, 334, pp. 320–325.

Jia, W. *et al.* (2017) ‘New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL)’, *Life Sciences*. Elsevier Inc, 186, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.lfs.2017.07.025.

Kafasla, P. *et al.* (2009) ‘Polypyrimidine Tract Binding Protein Stabilizes the Encephalomyocarditis Virus IRES Structure via Binding Multiple Sites in a Unique Orientation’, *Molecular Cell*, 34(5), pp. 556–568. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.015.

Kafasla, P. *et al.* (2010) ‘Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding’, *The EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 29(21), pp. 3710–3722. doi: 10.1038/emboj.2010.231.

Kafasla, P. *et al.* (2011) ‘Activation of picornaviral IRESs by PTB shows differential dependence on each PTB RNA-binding domain’, *Rna*, 17(6), pp. 1120–1131. doi: 10.1261/rna.2549411.

Kiledjian, M. and Dreyfuss, G. (1992) ‘Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box.’, *The EMBO journal*, 11(7), pp. 2655–2664.

King, H. A., Cobbold, L. C. and Willis, A. E. (2010) ‘The role of IRES *trans* -acting

factors in regulating translation initiation', *Biochemical Society Transactions*, 38(6), pp. 1581–1586. doi: 10.1042/BST0381581.

Knipe, M. D. & Howley, M. P. (2001) 'Fields Virology', in Lippincott Williams & Wilkins (ed.), pp. 1872–1875.

Knipe, M. D. & Howley, M. P. (2001) 'Fields Virology', in Lippincott Williams & Wilkins (ed.), pp. 1971–1973.

LaFemina, R. L. *et al.* (1992) 'Requirement of active human immunodeficiency virus type 1 integrase enzyme for productive infection of human T-lymphoid cells.', *Journal of virology*, 66(12), pp. 7414–9.

Lamichhane, R. *et al.* (2010) 'RNA looping by PTB: Evidence using FRET and NMR spectroscopy for a role in splicing repression.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp. 4105–4110. doi: 10.1073/pnas.0907072107.

Lemp, N. A. *et al.* (2012) 'Cryptic transcripts from a ubiquitous plasmid origin of replication confound tests for cis-regulatory function', *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. 7280–7290. doi: 10.1093/nar/gks451.

Liu, J. *et al.* (2011) 'Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 6(2), pp. 308–321. doi: 10.1007/s11481-011-9265-8.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data

Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

López-Lastra, M., Rivas, A. and Barría, M. I. (2005) 'Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation', *Biological Research*, 38(2–3), pp. 121–146. doi: 10.4067/S0716-97602005000200003.

Martínez-Salas, E. *et al.* (2015) 'Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions', *Virus Research*. Elsevier B.V., 206, pp. 62–73. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.012.

Martínez-Salas, E., Piñeiro, D. and Fernández, N. (2012) 'Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs.', *Comparative and functional genomics*, 2012, p. 391546. doi: 10.1155/2012/391546.

Mitchell, S. A. *et al.* (2003) 'The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr', *Molecular Cell*, 11(3), pp. 757–771. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00093-5.

Mitchell, S. A. *et al.* (2005) 'Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry', *Genes and Development*, 19(13), pp. 1556–1571. doi: 10.1101/gad.339105.

Monette, A. *et al.* (2009) 'Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import. Implications for HIV-1 gene expression', *Journal of Biological*

*Chemistry*, 284(45), pp. 31350–31362. doi: 10.1074/jbc.M109.048736.

Niepmann, M. *et al.* (1997) ‘Functional Involvement of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Translation Initiation Complexes With the Internal Ribosome Entry Site of Foot and Mouth Disease Virus’, *Journal-of-Virology*. Nov 1997; 71 (11) : 8330-8339., 71(11), pp. 8330–8339.

Oberstrass, F. C. (2005) ‘Structure of PTB Bound to RNA: Specific Binding and Implications for Splicing Regulation’, *Science*, 309(5743), pp. 2054–2057. doi: 10.1126/science.1114066.

Ohlmann, T. *et al.* (2002) ‘In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system’, *Journal of Molecular Biology*, 318(1), pp. 9–20. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00070-0.

Ohlmann, T., Mengardi, C. and López-Lastra, M. (2014) ‘Translation initiation of the HIV-1 mRNA.’, *Translation (Austin, Tex.)*, 2(2), p. e960242. doi: 10.4161/2169074X.2014.960242.

Olivares, E. (2014) *Estudio del mecanismo de inicio de la traducción del RNA mensajero completo del virus de la leucemia de linfocitos T humano de tipo 1 (HTLV-1)*. Universidad de Santiago de Chile.

Olivares, E. *et al.* (2014) ‘The 5’ Untranslated Region of the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 mRNA Enables Cap-Independent Translation Initiation’, *Journal of Virology*, 88(11), pp. 5936–5955. doi: 10.1128/JVI.00279-14.

Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) 'Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA', *Nature*, 334(6180), pp. 320–325. doi: 10.1038/334320a0.

Perales, C. and Carrasco, L. (2003) 'Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease : effects on translation', 533, pp. 1–6.

Pestova, T. V *et al.* (2001) 'Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), pp. 7029–36. doi: 10.1073/pnas.111145798.

Pino, C. (2011) *La proteína PTB1 es un factor trans-activador del IRES del virus del tumor mamario murino*. Universidad Andrés Bello.

Pyronnet, S. and Sonenberg, N. (2001) 'Cell-cycle-dependent translational control', *Current Opinion in Genetics and Development*, pp. 13–18. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00150-7.

Ricci, E. P. *et al.* (2008) 'Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation.', *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 4), pp. 690–3. doi: 10.1042/BST0360690.

Rivas-Aravena, A. *et al.* (2009) 'The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites.', *Virology*. Elsevier Inc., 392(2), pp. 178–85. doi: 10.1016/j.virol.2009.06.050.

Romanelli, M. G., Diani, E. and Lievens, P. M. J. (2013) 'New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), pp. 22906–22932. doi: 10.3390/ijms141122906.

Salveti, A. *et al.* (2016) 'Nuclear functions of nucleolin through global proteomics and interactomic approaches', *Journal of Proteome Research*, 15(5), pp. 1659–1669. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00126.

Sawicka, K. *et al.* (2008) 'Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein', *Biochemical Society Transactions*, 36(4), pp. 641–647. doi: 10.1042/BST0360641.

Schepens, B. *et al.* (2007) 'A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis', *The EMBO Journal*, 26(1), pp. 158–169. doi: 10.1038/sj.emboj.7601468.

Semler, B. L. and Waterman, M. L. (2008) 'IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes', *Trends in Microbiology*, 16(1), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.tim.2007.11.001.

Serin, G. *et al.* (1996) 'Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA', *Biochimie*, 78(6), pp. 530–538. doi: 10.1016/0300-9084(96)84759-6.

Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2009) 'Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets', *Cell*. Elsevier Inc., 136(4), pp. 731–745. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042.

Soto-Rifo, R. *et al.* (2012) ‘Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation’, *Nucleic Acids Research*, 40(6), pp. 2653–2667. doi: 10.1093/nar/gkr1093.

Stoneley, M. and Willis, A. E. (2004) ‘Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression’, *Oncogene*, 23(18), pp. 3200–3207. doi: 10.1038/sj.onc.1207551.

Sundquist, W. I. and Kräusslich, H.-G. (2012) ‘HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation.’, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), p. a006924. doi: 10.1101/cshperspect.a006924.

Tajrishi, M. M., Tuteja, R. and Tuteja, N. (2011) ‘Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus’, *Communicative and Integrative Biology*, 4(3), pp. 267–275. doi: 10.4161/cib.4.3.14884.

Vagner, S. *et al.* (1995) ‘Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor’, *Journal of Biological Chemistry*, pp. 20376–20383. doi: 10.1074/jbc.270.35.20376.

Vallejos, M. *et al.* (2009) ‘The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation’, *Nucleic Acids Research*, 38(2), pp. 618–632. doi: 10.1093/nar/gkp890.

Vallejos, M. *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), pp. 6186–200. doi: 10.1093/nar/gkr189.

Vallejos, M. (2011) *Estudio estructural y funcional de la región 5'UTR del mRNA completo de HIV-1*. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Ventoso, I. *et al.* (2001) 'HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), pp. 12966–12971. doi: 10.1073/pnas.231343498.

Vera-Otarola, J. *et al.* (2010) 'The 3' untranslated region of the Andes hantavirus small mRNA functionally replaces the poly(A) tail and stimulates cap-dependent translation initiation from the viral mRNA.', *Journal of virology*, 84(19), pp. 10420–4. doi: 10.1128/JVI.01270-10.

Vera-Otarola, J. *et al.* (2012) 'The Andes Hantavirus NSs Protein Is Expressed from the Viral Small mRNA by a Leaky Scanning Mechanism', *Journal of Virology*, 86(4), pp. 2176–2187. doi: 10.1128/JVI.06223-11.

Wang, F. *et al.* (2014) 'Mouse mammary tumor virus-like virus infection and the risk of human breast cancer: A meta-analysis', *American Journal of Translational Research*, 6(3), pp. 248–266.

Waysbort, A. *et al.* (2001) 'Pyrimidine tract binding protein and La autoantigen interact differently with the 5' untranslated regions of lentiviruses and oncoretrovirus mRNAs', *FEBS Letters*, 490(1–2), pp. 54–58. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02137-8.

Wilson, J. E. *et al.* (2000) ‘Naturally Occurring Dicistronic Cricket Paralysis Virus RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites’, *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), pp. 4990–4999. doi: 10.1128/MCB.20.14.4990-4999.2000.

Yasunaga, J. and Matsuoka, M. (2011) ‘Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis’, *International Journal of Hematology*, 94(5), pp. 435–442. doi: 10.1007/s12185-011-0937-1.

Ye, J. *et al.* (2015) ‘hnRNP U protein is required for normal pre-mRNA splicing and postnatal heart development and function’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), pp. E3020–E3029. doi: 10.1073/pnas.1508461112.

Yugami, M. *et al.* (2007) ‘hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA’, *FEBS Letters*, 581(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.062.

Zhao, W. *et al.* (2012) ‘Nuclear to Cytoplasmic Translocation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U Enhances TLR-Induced Proinflammatory Cytokine Production by Stabilizing mRNAs in Macrophages’, *The Journal of Immunology*, 188(7), pp. 3179–3187. doi: 10.4049/jimmunol.1101175.