

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



Generación de una mutante de la proteína viral Tax de HTLV-1 y su expresión en células HeLa

Iván Alexis Torres Durán

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

DIRECTOR

Dr. Fernando Valiente-Echeverría
Laboratorio de Virología Molecular y Celular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Carlos Santiviago Cid
Laboratorio de Microbiología
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Septiembre, 2024

A mi madre, Lina Eugenia Durán Torres,
quien dio su vida y más en la lucha contra
el HTLV-1

“Nada en la vida es para ser temido, es
sólo para ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más,
de modo que podamos temer menos”
-Marie Curie

i. Financiamiento

Esta Memoria de Título fue financiada bajo los siguientes proyectos:

- FONDECYT 1180798 & 1211547 (FV-E).
- FONDECYT 1190156 (RSR).
- Anillo inflammation in HIV/AIDS ATE220016 (InflammAIDS)(FV-E, RSR)
- ANID-ICM ICN2021 045 (FV-E, RSR).

ii. Agradecimientos

Es difícil en este momento pensar este proceso como solo esta última etapa, viene desde de los inicios de mi vida y a lo largo ha habido muchísimas personas que han estado para mí en diferentes etapas, algunos han sido transitorios y otros siguen hasta el día de hoy aquí conmigo viendo toda la transformación que ha habido a lo largo de los años.

Quisiera partir agradeciendo a mi madre, quien me dio la vida, me ha inspirado a seguir en este camino y que a pesar de que no esté presente sigue siendo parte de mi día a día, gracias por ser mi motivación desde siempre. También a mi familia, a mi papá quien siempre me ha apoyado ante cualquier adversidad y ha estado alentándome en toda esta etapa y en mi vida; a mi hermano Diego también le agradezco por estar presente y apoyándome. A mi gato, Shrödinger, quien con su compañía me ayudó a superar las diversas frustraciones y darme la alegría para superar todo.

Agradecer a mis amigos de la vida, mis hermanos Mathías, Roberto y Marcos, el EDSW, las palabras sobran ya a estas alturas, pero sin Uds. muchas cosas no podría haber superado y logrado, el cariño y la amistad trasciende con los años y estoy feliz de tenerlos en mi vida. También agradecer a Lore, Angela, Vicky y Aníbal, grandes amistades que hice en la enseñanza media y que se han mantenido en el tiempo. A la Lizy, y a su familia, por pasarme por la libreta y ser uno más de Uds. Les tengo mucho cariño y aprecio.

Le agradezco muchísimo al Dr. Fernando Valiente-Echeverría quien me acogió en el laboratorio y me brindo su guía en los diferentes proyectos en las cuales me desempeñé, y además de apoyarme en este tema sobre HTLV-1, por creer en mí y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo. Al Dr. Ricardo Soto-Rifo, aconsejarme y guiarme en estos años. A mi comisión, el Dr. Carlos Santiviago, Dr. Mario Chiong y Dr. Roberto Munita, por ayuda en la construcción de esta memoria y por sus consejos.

Al Dr. Felipe, el gran BQ, quien fue mi primer maestro en esto llamado ciencia, gracias por los años de amistad y el apoyo. A los miembros del laboratorio, Dr. Tomás, Cami, Sebas, Ceci, Dina, Josie, Vale V, Vale O, Dra. Ara, Dani, Cristian, Delia, fueron uds con quien más compartí, viéndonos día y noches, tardes de posada y de juegos, las palabras sobran para agradecer la amistad y el apoyo inmenso que me han dado en este proceso, los quiero.

Le agradezco profundamente a mi gran amigo Luis Osorio, empezamos este camino científico juntos y aunque nos distancien miles de kilómetros, la amistad y la ciencia se mantiene, gracias por ser mi inspiración y apoyarme en mis momentos más difíciles. A mis amigos de carrera, a mis autis0s, Tebo, Natra, Cami, GA, Bob, Diego y Shadow, gracias por los años, las risas , las conversaciones que pasaron y que vendrán. A mi ahijado, Mirko, que aunque no este, su recuerdo siempre quedará presente.

A la Academia Narvezzi, tanto al equipo que lo conforman como a mis alumnos. Poder tener la oportunidad de poder enseñar y entregar el conocimiento científico a las nuevas generaciones es algo que siempre quedará en mí.

También agradecer a mis familiares, a la familia Torres y a la familia Durán, a mis tios y primos, por el cariño que existe y por el apoyo que brindaron durante toda mi vida. A la familia Ampuero-Sepúlveda, por el gran apoyo y cariño que me brindaron durante años.

A Rocío, quien ha sido alguien muy importante en este último tiempo, quien me ha visto sufrir y alegrarme en todo este proceso, por acompañarme hasta tarde, incluso los domingos a hacer ciencia, gracias por aguantar y acompañarme, las palabras sobran para agradecer lo importante que has sido en este último tiempo.

A todos quienes están y no están, a todos con quienes he compartido, de alguna u otra forma han hecho que este aquí hoy en día, gracias.

iii. Índice de contenidos

i. Financiamiento	3
ii. Agradecimientos.....	4
iii. Índice de contenidos	6
iv. Índice de tablas.....	8
v. Índice de figuras	8
vi. Abreviaturas.....	9
vii. Resumen	11
viii. Abstract	13
1. Introducción.....	15
1.1 El virus linfotrópico de células T humana (HTLV)	15
1.2 Patologías asociadas a HTLV-1 y vías de transmisión	17
1.3 Estructura del HTLV-1	18
1.4 Modelo del ciclo replicativo de HTLV-1.....	20
1.5 Proteína viral Tax	23
1.6 Tax y gránulos de estrés	24
2. Propósito del estudio	26
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo General.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
3.2.1 Objetivo Específico 1.....	26
3.2.2 Objetivo Específico 2.....	26

3.2.3	Objetivo Específico 3.....	26
4.	Materiales y métodos	27
4.1	Subclonamiento	27
4.2	Partidores	27
4.3	Cultivo celular.....	28
4.4	Vectores.....	28
4.5	Transfección.....	28
4.6	Tratamiento con arsenito de sodio	28
4.7	Lisis celular y cuantificación de proteínas	28
4.8	<i>Western Blot</i>	29
4.9	Anticuerpos.....	30
4.10	Inmunofluorescencia indirecta.....	30
4.11	Conteo de células SG positivas y co-localización.....	30
5.	Resultados	32
5.1	Subclonar la región codificante de la proteína viral Tax WT en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax WT.....	32
5.1.1	Estandarización de los partidores.....	32
5.1.2	Ligación del inserto Tax WT en pEGFP-C1	33
5.2	Subclonar la región codificante de la versión mutante de la proteína viral Tax, resultante de la delección de los 22 primeros aminoácidos ($\Delta 22$) en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax $\Delta 22$	36
5.2.1	Estandarización de los partidores.....	36
5.2.2	Ligación del inserto Tax $\Delta 22$ en pEGFP-C1.....	37
5.3	Evaluar la expresión de las proteínas de fusión codificadas en cada plásmido en células HeLa y su localización subcelular ante un tratamiento con arsenito de sodio.....	40
5.3.1	Expresión de las versiones mutantes de Tax en células HeLa.....	40
5.3.2	Localización subcelular de las versiones mutantes de Tax en células HeLa .	41
6.	Discusión	45
7.	Conclusiones	47
8.	Bibliografía.....	48

iv. Índice de tablas

Tabla 1. Partidores utilizados.	27
Tabla 2. Anticuerpos utilizados.....	30

v. Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de los principales focos de infección por HTLV-1.	16
Figura 2. Estructura de la partícula viral de HTLV-1.....	18
Figura 3. Estructura del genoma proviral del HTLV-1 y las funciones de los productos génicos (proteínas).....	19
Figura 4. Ciclo replicativo del HTLV-1.....	22
Figura 5. Representación esquemática de los dominios estructurales y funcionales de Tax.....	24
Figura 6. Esquema representativo del subclonamiento para generar el plásmido pEGFP-Tax WT.....	32
Figura 7. Estandarización de temperatura de annealing para amplificar Tax WT.....	33
Figura 8. Doble digestión de la purificación de plásmidos proveniente de la transformación con el producto de ligación.....	34
Figura 9. Digestión de la purificación de plásmidos con columna del kit comercial.	35
Figura 10. Esquema representativo del subclonamiento para generar el plásmido pEGFP-Tax Δ 22.....	36
Figura 11. Estandarización de temperatura de annealing para amplificar Tax Δ 22.	37
Figura 12. PCR de colonia para el subclonamiento de Tax Δ 22.....	38
Figura 13. Doble digestión de los plásmidos generados y alineamiento de secuencias ..	39
Figura 14. Esquema representativo de la estrategia experimental.....	40
Figura 15. Expresión de las versiones WT y Δ 22 de Tax en células HeLa.....	41
Figura 16. Localización subcelular de GFP-Tax WT y GFP-Tax Δ 22 y su capacidad de inhibir SG.....	43
Figura 17. Visualización de agregados extracelulares de GFP-Tax Δ 22 en células HeLa	44

vi. Abreviaturas

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µM: Micromolar

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg: ARN genómico

ARNm: ARN mensajero

ATLL: Leucemia/linfoma de células T del adulto

BSA: Albumina de suero bovino

CA: Cápside viral

CBP: Proteína que une CREB

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dsADN: ADN de doble hebra

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

GLUT1: Transportador de glucosa 1

HAM/TSP: Paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada a HTLV-1

HBZ: Factor bZip de HTLV-1

HDAC6: Histona desacetilasa 6

Hpt: horas post transfección

HRP: Peroxidasa de rábano

HSPG: Proteoglicán sulfato de heparina

HTLV: *Human T-cell Lymphotropic Virus*

IL-2: Interleuquina 2

ISP: Instituto de Salud Pública

LTR: Repeticiones terminales largas

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

NEB: *New England Biolabs*

NP-40: Nonidet P-40

NRP-1: Receptor VEGF-165 de neuropilina-1

ORF: Marco de lectura abierto

Pb: Pares de bases
PBM: *PDZ binding motif*
PBS: *Buffer fosfato salino*
PDVF: Difluoruro de polivinilideno
PFA: Paraformaldehído
PNK: Polinucleótido quinasa
Rex: Regulador postranscripcional de la expresión viral
RexRE: Elemento que responde a Rex
ROS: Especies reactivas de oxígeno
Rpm: Revoluciones por minuto
SGs: Gránulos de estrés
ssARN+: ARN de hebra simple con polaridad positiva
SU: Subunidad de superficie
TAR: Terapia antirretroviral
Tax: *Transcriptional Activator of pX region*
TBP: *TATA binding protein*
Tm: Temperatura de fusión
TM: Subunidad de transmembrana
TRE-1: Elemento 1 que responde a Tax
TSLs: Señal de localización TSS
TSS: *Tax Speckled Structure*
WB: *Western Blot*
WT: Silvestre (*Wild type*)

vii. Resumen

El virus linfotrópico de células T humana de tipo 1 (HTLV-1) fue el primer oncoretrovirus descubierto a principios de la década de 1980. Este virus es el agente etiológico de dos patologías principales: la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL), un trastorno linfoproliferativo grave y mortal de las células T CD4⁺, y la mielopatía asociada a HTLV-1 o paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), una enfermedad inflamatoria. Ambas enfermedades presentan manifestaciones clínicas graves y un pronóstico desfavorable, sin existir hasta la fecha una terapia antirretroviral (TAR) eficaz en uso clínico.

El HTLV-1 es un virus complejo debido a la presencia de proteínas regulatorias, siendo la proteína Tax la más significativa. Tax interactúa con diversos factores celulares, alterando vías de señalización y procesos para favorecer la transcripción viral, persistencia y patogénesis. La localización subcelular de Tax está finamente regulada, resultado de una combinación elaborada de múltiples determinantes como el entorno. El estrés celular, provocado por agentes oxidantes o la propia infección viral, induce la formación de gránulos de estrés (SG) en la célula como respuesta para restaurar la homeostasis. Sin embargo, Tax, mediante su región N-terminal interacciona con dos componentes de los SG, USP10 y específicamente sus 22 primeros aminoácidos con HDAC6, desensamblando estos gránulos para favorecer la traducción de proteínas virales y aumentar los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que promueve la leucogénesis.

El propósito de esta Memoria de Título se centra en la generación de dos plásmidos: uno que codifica para la proteína Tax silvestre (WT) fusionada con GFP y otro que codifica la versión mutante, resultado de la delección de los primeros 22 aminoácidos de Tax, también fusionada con GFP. Estas construcciones se expresaron en células HeLa para evaluar sus niveles de expresión proteica y su localización subcelular bajo tratamiento con arsenito de sodio (Ars). Mediante la técnica de *Western Blot*, se observó que los niveles de expresión de la versión mutante GFP-Tax Δ 22 fueron menores en comparación con GFP-Tax WT. Sin embargo, al analizar la localización subcelular y la respuesta ante un agente estresor mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observaron diferencias entre ambas proteínas. GFP-Tax WT mostró una localización preferentemente nuclear y la formación de estructuras denominadas *Tax Speckled Structures* (TSS). Bajo tratamiento con Ars, esta proteína se translocó al citoplasma, formando focos discretos que no necesariamente co-localizan con los SG. Por otro lado, GFP-Tax Δ 22 se distribuyó preferentemente a nivel

citoplasmático y, ante el tratamiento con Ars, co-localizó con los SG, como se ha descrito previamente. Adicionalmente, se evidenció que la versión mutante de Tax se acumula a nivel extracelular o en células vecinas no transfectadas, lo que abre la posibilidad de futuros estudios sobre los mecanismos implicados en la secreción de esta proteína viral, dada su posible implicación en la progresión de HAM/TSP.

viii. Abstract

“Generation of a mutant of the HTLV-1 viral protein Tax and Its expression in HeLa cells”

The Human T-lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) was the first oncoretrovirus discovered in the early 1980s. This virus is the etiological agent of two major pathologies: Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL), a severe and fatal CD4⁺ T-cell lymphoproliferative disorder, and HTLV-1-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), an inflammatory disease. Both diseases exhibit severe clinical manifestations and an unfavorable prognosis, with no effective antiretroviral therapy (ART) currently available for clinical use.

HTLV-1 is a complex virus due to the presence of regulatory proteins, with Tax being the most significant. Tax interacts with various cellular factors, altering signaling pathways and processes to promote viral transcription, persistence, and pathogenesis. The subcellular localization of Tax is finely regulated, resulting from an intricate combination of multiple determinants, such as environmental conditions. Cellular stress, induced by oxidative agents or viral infection itself, triggers the formation of stress granules (SG) in the cell as a response to restore homeostasis. However, Tax, through its N-terminal region, interacts with two SG components, USP10, and specifically its first 22 amino acids with HDAC6, disassembling these granules to favor viral protein translation and increase intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, thereby promoting leukemogenesis.

The purpose of this work is focused on the generation of two plasmids: one encoding the wild-type (WT) Tax protein fused to GFP and another encoding the mutant version, resulting from the deletion of the first 22 amino acids of Tax, also fused to GFP. These constructs were expressed in HeLa cells to evaluate their protein expression levels and subcellular localization under sodium arsenite (Ars) treatment. Using Western Blot analysis, it was observed that the expression levels of the mutant GFP-Tax Δ 22 version were lower compared to GFP-Tax WT. However, when analyzing subcellular localization and the response to a stressor via indirect immunofluorescence (IFI), differences between the two proteins were noted. GFP-Tax WT showed predominantly nuclear localization and the formation of structures termed Tax Speckled Structures (TSS). Under Ars treatment, this protein translocated to the cytoplasm, forming discrete foci that do not necessarily co-localize with SG. On the other hand, GFP-Tax Δ 22 was distributed predominantly

cytoplasmically, and upon Ars treatment, co-localized with SG, as previously described. Additionally, it was demonstrated that the mutant version of Tax accumulates extracellularly or in neighboring non-transfected cells, opening up the possibility for future studies on the mechanisms involved in the secretion of this viral protein, given its potential implication in the progression of HAM/TSP.

1. Introducción

1.1 El virus linfotrópico de células T humana (HTLV)

El virus linfotrópico de células T humana o HTLV (por sus siglas en Inglés: *Human T-cell Lymphotropic Virus*) fue el primer retrovirus humano descubierto a principios de los años 1980 por dos grupos de investigación de forma independiente que trabajaban en Estados Unidos (Poiesz et al., 1981) y en Japón (Yoshida et al., 1982). Este descubrimiento permitió establecer la asociación entre la infección viral y cáncer humano, lo cual hasta esa fecha se sospechaba, pero no se había demostrado.

Hoy en día existen cuatro tipos conocidos de HTLV, siendo el HTLV-1 el más patogénico del grupo y tiene la distinción de ser el primer retrovirus oncogénico descubierto en humanos (Mahieux & Gessain, 2007). Posteriormente, se descubrieron otros subtipos como HTLV-2, HTLV-3 y HTLV-4, donde los dos últimos no se han asociado a enfermedad en seres humanos (Gessain & Cassar, 2012). Se estima que al menos 20 millones de personas en el mundo son portadoras de HTLV-1 (Willems et al., 2017). Este virus está presente en todos los continentes; sin embargo, su distribución se caracteriza por localizarse en grupos de alta endemicidad ubicados cercanos a otras áreas en donde el virus está ausente. De esta manera la seroprevalencia de HTLV-1 en adultos se ha estimado cercana al 1-2%, pudiendo alcanzar hasta 20-40% en personas mayores de 50 años en algunas zonas específicas (Gessain & Cassar, 2012) siendo la edad un determinante epidemiológico importante de la seroprevalencia de HTLV-1, la cual es independiente de determinantes socioeconómicos y culturales (Martinez et al., 2019). Las principales zonas con índices más altos de endemicidad se localizan en el suroeste de Japón, África Central, algunas zonas del Caribe y de América del Sur (Murphy, 2016). Por otro lado, la seroprevalencia de HTLV-1 es baja en Europa y América del Norte (< 0,1%), aunque se han detectado diferencias significativas de HTLV-1 en algunas regiones geográficas (Cartier et al., 2017) **(Figura 1)**.

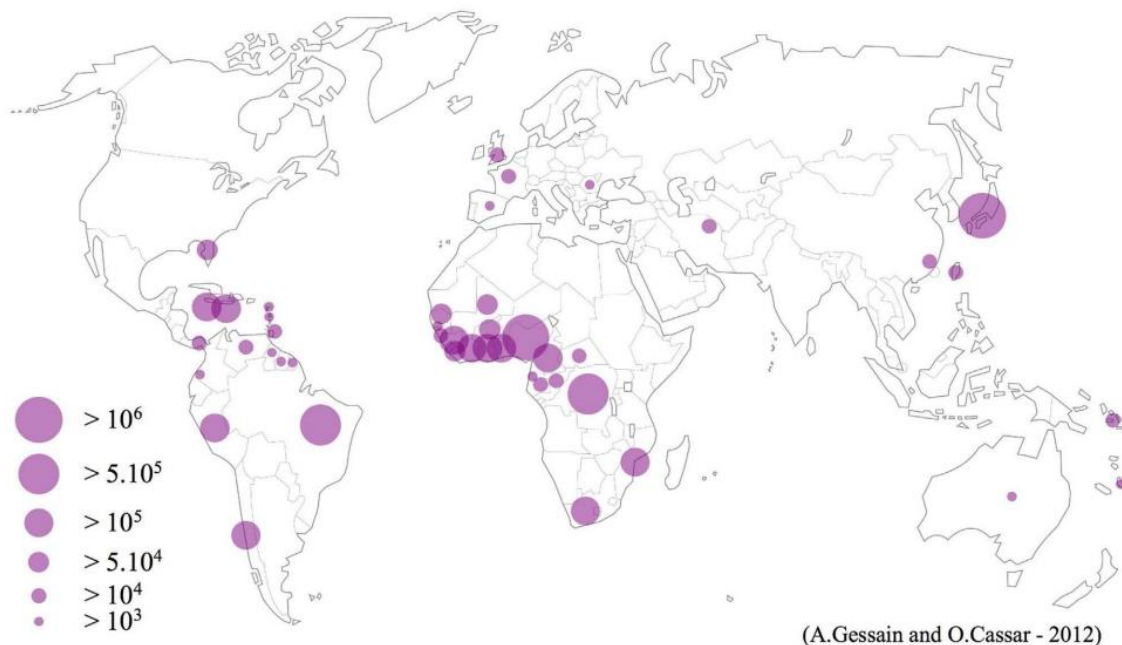


Figura 1. Distribución geográfica de los principales focos de infección por HTLV-1. Estimaciones del número de portadores infectados por HTLV-1, basadas en aproximadamente 1.500 millones de personas de áreas endémicas conocidas y datos epidemiológicos confiables obtenidos de estudios entre mujeres embarazadas y/o donantes de sangre y/o diferentes poblaciones adultas (Gessain & Cassar, 2012).

A pesar de la importancia clínica y epidemiológica de las infecciones con HTLV-1 en Chile, en la actualidad hay pocos estudios sobre población en general y en donantes de sangre chilenos. En nuestro país sólo a partir del año 2009, se estableció la obligatoriedad del tamizaje de anticuerpos contra HTLV-1/2 en los bancos de sangre y la posterior confirmación del diagnóstico debe ser enviada al Laboratorio de Referencia Nacional, ubicado en el Instituto de Salud Pública (ISP). Como consecuencia de esto es que no existe información robusta acerca de epidemiología nacional del HTLV-1/2; como tampoco una efectiva estrategia de control de la transmisión transfusional de estos virus de años previos al establecer el tamizaje (Cartier et al., 2017). De esta manera, en los últimos años, se ha fortalecido fuertemente la vigilancia epidemiológica de estas virosis en los donantes de sangre, permitiendo adicionalmente prevenir la infección por vía transfusional y fortalecer la pesquisa más oportuna de los casos de leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) y mielopatía asociada a HTLV-1 o paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) en Chile. Estudios de seroprevalencia de HTLV-1 realizado en donantes de sangre en Chile, mostró entre 2011 y 2013 una prevalencia de 1,02 por 1.000 habitantes. Adicionalmente, se determinó que existen diferencias marcadas en la distribución geográfica de los donantes

HTLV-1 positivos. La prevalencia fue de 0,51, 1,12 y 1,69 donantes HTLV-1 positivos en las zonas sur, central y norte, respectivamente (San Martín et al., 2016).

1.2 Patologías asociadas a HTLV-1 y vías de transmisión

El HTLV-1 es el agente etiológico de dos principales patologías: un trastorno linfoproliferativo grave y mortal de las células T CD4⁺ denominada leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) y por otro lado una enfermedad inflamatoria denominada mielopatía asociada a HTLV-1 o paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (Osame et al., 1986; Yoshida et al., 1984). Ambas enfermedades presentan manifestaciones clínicas graves y mal pronóstico a pesar de los esfuerzos terapéuticos. A su vez, la infección por este virus se ha relacionado a neuropatías periféricas, dermatitis infecciosa, uveítis miositis, artritis, síndrome de Sjögren y otras patologías autoinmunes (San Martín et al., 2016).

Es necesario destacar que en todas las zonas con alta endemicidad en el mundo se ha demostrado que las prevalencias del HTLV-1 aumentan gradualmente con la edad, especialmente en mujeres (Mueller, 1991). Aunque la mayoría de las personas infectadas permanecen como portadores asintomáticos y no desarrollan patologías asociadas a lo largo de su vida, un porcentaje que oscila entre el 0,3% y el 3,8% desarrolla mielopatía asociada a HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) y entre el 3% y el 5% desarrolla leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL). (Lairmore et al., 2011; Saito & Bangham, 2012; Satake et al., 2012). Además, se ha estimado que entre el 5-10% de las personas infectadas con HTLV-1 están en riesgo de desarrollar alguna patología asociada con esta infección viral (de Thé & Bomford, 1993; Gessain & Cassar, 2012).

Hay tres modos de transmisión descritos para este virus: (1) vía parenteral, ya sea por el uso de drogas endovenosas, transfusiones de sangre o el trasplante de órganos proveniente de una persona infectada, (2) vía sexual, mediante el contacto con fluidos corporales como el semen, líquido preseminal, fluidos vaginales y sangre, y (3) vía vertical o perinatal, de madre a hijo (Gonçalves et al., 2010), siendo esta última la más frecuente (Itabashi et al., 2023; Verdonck et al., 2007). La tasa de transmisión de madre a hijo varía del 5 al 27% durante la lactancia y depende directamente con la duración del amamantamiento que recibe el hijo (Nyambi et al., 1996; Takahashi et al., 1991).

Estudios han encontrado una relación entre la vía de transmisión y el tipo de patología a desarrollar. La mayoría de los casos de ATLL se atribuyen a la transmisión por vía vertical (Bartholomew et al., 1998; Carneiro-Proietti et al., 2014). Se estima que la tasa es aproximadamente del 20% (*Human T-Lymphotropic Virus Type 1*, s. f.), y si suponemos un riesgo del 5% de desarrollar ATLL, se estima que éste aumenta a un 25% en los casos de pacientes que adquirieron el virus por vía vertical. HTLV-1 es un virus latente, ya que el sistema inmunológico del hospedero no puede eliminar el virus, además persiste en el hospedero y representa una amenaza de por vida para el desarrollo de ATLL, HAM/TSP y otras enfermedades (Bangham et al., 2019; Schierhout et al., 2020). Actualmente, no existe una terapia antirretroviral (TAR) eficaz en uso clínico y la única medida disponible es la prevención de la infección y el tratamiento de los síntomas de las diversas patologías.

1.3 Estructura del HTLV-1

El HTLV es un retrovirus, perteneciente a la familia *Retroviridae* y es miembro del género *Deltaretrovirus*. Según la clasificación de Baltimore este virus pertenece al grupo VI: Virus ARN monocatenario retrotranscrito (Baltimore, 1970). Morfológicamente el HTLV es un virus envuelto esférico con un diámetro entre los 80 a 100 nm (**Figura 2**). Dentro de la partícula viral se encuentra su genoma el cual está compuesto por un dímero de hebras simples lineales de ARN de polaridad positiva (ssARN+) de aproximadamente 9 kb cada una, las cuales codifican proteínas estructurales y enzimáticas Pol, Gag, Env, Pro, las proteínas regulatorias Tax y Rex y proteínas accesorias p12, p13 y p30 (Kashanchi & Brady, 2005).

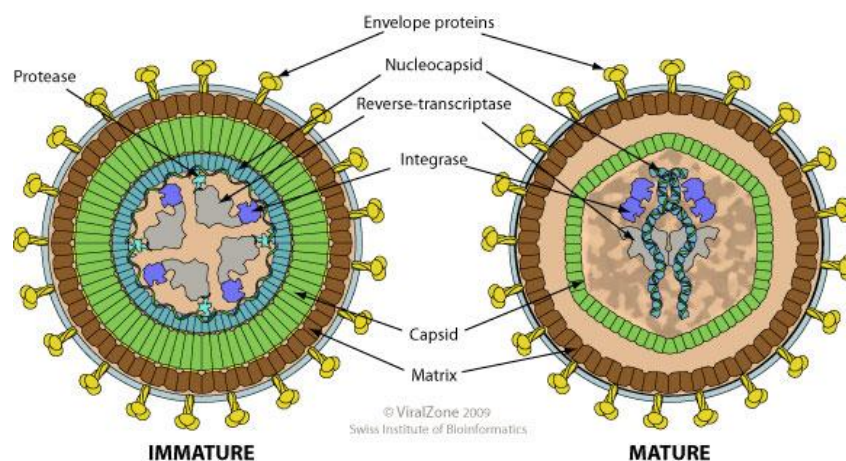


Figura 2. Estructura de la partícula viral de HTLV-1. Modelo esquemático de la partícula viral de HTLV-1 donde se indican con líneas las proteínas estructurales: proteína de envoltura, nucleocápside, cápside y matriz; y proteínas enzimáticas: transcriptasa reversa, integrasa, proteasa (Human T-cell leukemia virus type I ~ ViralZone, s. f.).

Las dos regiones de repeticiones terminales largas (LTR), localizadas en ambos extremos (5' y 3') del provirus contienen el promotor viral y otros elementos regulatorios. El HTLV-1 tiene además una mayor complejidad debido al procesamiento alternativo de los ARN mensajeros (ARNm) en la región pX, la cual contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORF). Las proteínas regulatorias Tax y Rex son codificadas por un mismo ARNm policistrónico que es procesado en dos sitios distintos. Además, la región pX genera un ARNm de la hebra antisentido para otra importante proteína regulatoria, el factor bZip de HTLV-1 (HBZ) (**Figura 3**). El equilibrio de los respectivos efectos positivos y negativos de Tax y Rex, sobre otros productos virales y proteínas celulares, determinarían la velocidad de la replicación viral. Asimismo, la proteína HBZ parece ser importante en la mantención de la latencia viral.

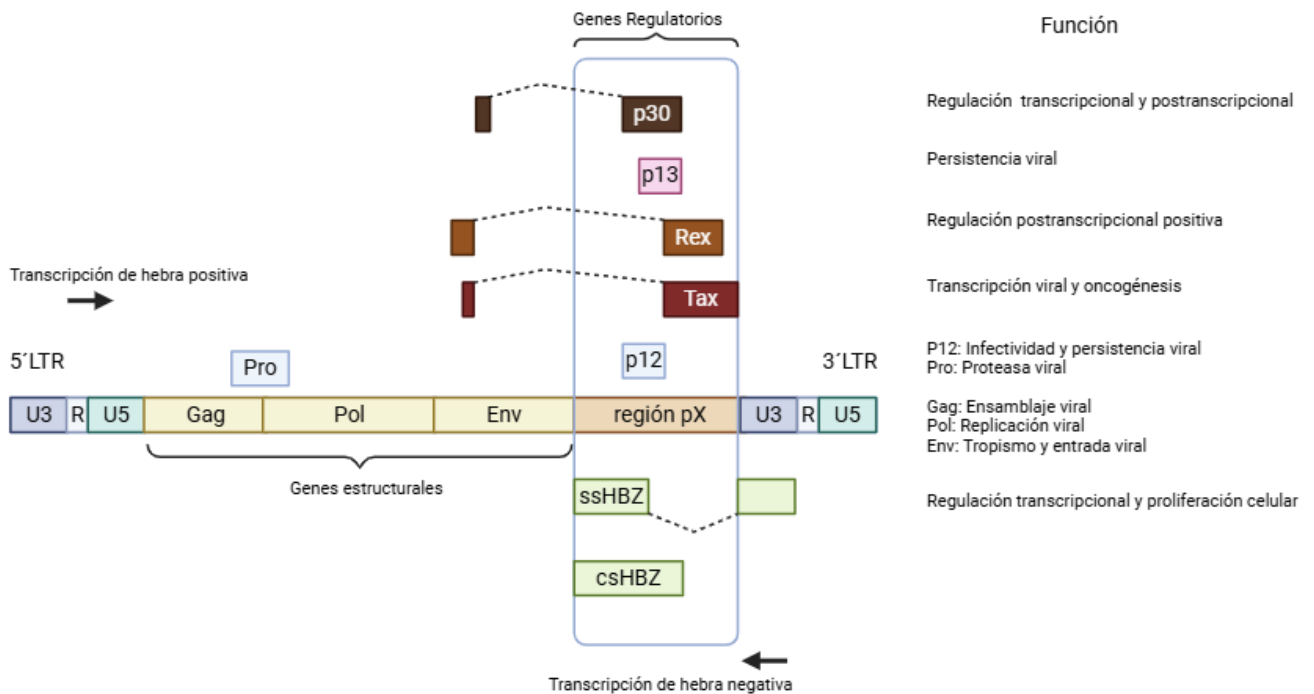


Figura 3. Estructura del genoma proviral del HTLV-1 y las funciones de los productos génicos (proteínas). En el diagrama se muestra el ADN proviral, ambos LTR regulatorios y los transcritos de ARN. El nombre de cada uno de los transcritos génicos se señala dentro de cada recuadro específico. Todos los ARNm virales, con excepción de HBZ, son transcritos a partir de la hebra sentido positivo desde el LTR 5'. Los ARNm de HBZ son transcritos a partir de la hebra negativa o con antisentido desde el LTR 3'. Las líneas punteadas indican las regiones genéticas procesadas (*splicing*) en los transcritos para generar los ARNm finales (Modificado de Cartier et al., 2017).

1.4 Modelo del ciclo replicativo de HTLV-1

El HTLV-1 infecta principalmente a linfocitos T CD4⁺, pero también es capaz de infectar otras células, tales como: linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, células endoteliales, células mieloides y fibroblastos (Ho et al., 1984; Koyanagi et al., 1993; Longo et al., 1984; Yamamoto et al., 1982; Yoshikura et al., 1984). Esta capacidad para poder infectar a varios tipos celulares se debe en parte a que la glicoproteína de la envoltura (Env) de HTLV-1 puede interactuar con tres receptores celulares que se encuentran ampliamente distribuidos en la superficie celular: el transportador de glucosa 1 (GLUT1) (Manel et al., 2003), el proteoglicán heparán sulfato (HSPG) (Jones et al., 2005) y el receptor VEGF-165 de neuropilina-1 (NRP-1) (Ghez et al., 2006). Para que ocurra la entrada viral la subunidad de superficie (SU) de la glicoproteína viral interactúa primero con HSPG y luego con NRP-1, generando un complejo proteico. Posteriormente, GLUT1 se asocia a este complejo HSPG/NRP-1 para iniciar un proceso de fusión, mediante la interacción con la subunidad de membrana (TM) de la glicoproteína de la envoltura viral (**Figura 4, paso A**). Este evento permite que el *core* de la cápside viral (CA) la cual contiene dos copias del ARN genómico viral (ARNg) y proteínas virales como la transcriptasa reversa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa viral (PR), sea liberado al citoplasma de la célula infectada (**Figura 4, paso B**).

Después de la entrada viral se produce la transcripción reversa del ARNg a ADN de doble cadena (dsADN) (Baltimore, 1970) (**Figura 4, paso C**). Luego el complejo de pre-integración (dsADN con la integrasa) transloca al núcleo (**Figura 4, paso D**) y se integra en el cromosoma de la célula hospedera formando así el provirus (**Figura 4, paso E y F**). Las repeticiones terminales largas (LTR) del provirus contiene elementos promotores y potenciadores para iniciar la transcripción de los ARN virales (**Figura 2**), con la señal de poliadenilación ubicada en el 3'LTR. Tax, una proteína no estructural y el principal activador de la transcripción viral, activa fuertemente la transcripción viral durante la fase temprana de la infección mediante el reclutamiento de múltiples factores celulares de transcripción (Kashanchi & Brady, 2005). Tres regiones repetidas conservadas de 21 bp, conocida como el elemento 1 que responde a Tax (TRE-1), unen a la proteína que se une a los elementos de respuesta al AMP cíclico (CREB) a través de la región amino terminal (Jeang et al., 1988). La proteína Tax mediante su dominio carboxilo terminal promueve el inicio de la transcripción y la elongación por parte de la ARN polimerasa (**Figura 4, paso G**), a través de la directa interacción con la proteína que se une a la región o caja TATA (TBP) (Caron

et al., 1993; Ching et al., 2004). El complejo promotor Tax-CREB atrae hacia el LTR a los co-activadores celulares multifuncionales proteína que une CREB (CBP), p300 y el factor asociado a p300/CBP (Bex et al., 1998).

La transcripción es un proceso altamente regulado y al igual que los ARNm celulares, los transcritos virales sufren de procesamiento de corte y empalme (**Figura 4, paso H**). La proteína viral Rex juega un rol fundamental en la regulación postranscripcional actuando como un regulador positivo esencial para el procesamiento y transporte de los ARNm virales (**Figura 4, paso I**), ya que interactúa con las regiones U3 y R de ARNg viral, conocido como el elemento que responde a Rex (RexRE). Durante etapas tempranas de la transcripción viral, los niveles de Rex son bajos (Green & Chen, 1990), lo cual se traduce en la exportación exclusiva hacia el citoplasma de los ARNm totalmente procesados (*tax*, *rex*, *p30*, *p12*, *p13* y *hbz*) (Hidaka et al., 1988). Una vez que Rex se acumula en el núcleo celular, produce una disminución del procesamiento de los ARNm virales. Por consecuencia, los ARNm virales son exportados desde el núcleo al citoplasma con un sólo procesamiento (*env*) o bien no procesados (*gag-pro-pol*); generando así la producción de las proteínas enzimáticas y estructurales del virus (Hidaka et al., 1988).

Una vez que los ARNm son exportados al citoplasma, la maquinaria celular de síntesis proteica comienza la traducción de las proteínas virales (**Figura 4, paso J**). Probablemente, el ARNg viral completo es traducido o transportado a la membrana plasmática, donde puede dimerizar, interactuar con la poliproteína Gag y ser empaquetado en las partículas que se están ensamblando (Butsch & Boris-Lawrie, 2002) (**Figura 4, paso K**). El ensamblaje de las partículas virales ocurre después de que Gag es trasladado desde el citoplasma a la membrana plasmática en sitios ricos en lípidos conocidos como balsas lipídicas (Lingwood et al., 2009). Las interacciones Gag-ARNg, Gag-Gag y Gag-membrana son todas requeridas para el ensamblaje y gemación de las partículas virales (Zhang et al., 2015) (**Figura 4, paso L**). Adicionalmente, la proteasa viral proteoliza la poliproteína Gag-Pol durante e inmediatamente después de la liberación de las partículas virales inmaduras (**Figura 4, paso M**) generando partículas virales maduras (Le Blanc et al., 2001), donde se forma la cápside que contiene la RT, IN y ARNg que esta recubierto por la nucleocápside. Posteriormente, las partículas virales maduras o infecciosas son capaces de infectar nuevas células blanco permisivas (Konvalinka et al., 2015) (**Figura 4, paso N**).

En general hay dos métodos distintos en la transmisión del virus entre células: infección en ausencia de contacto entre células e infección que requiere contacto entre células (Martin et al., 2016). La mayoría de los retrovirus puede infectar a su célula blanco en ausencia de contacto entre células. Sin embargo, HTLV-1 ha mostrado ser poco infeccioso en ausencia de contacto célula-célula (Fan et al., 1992), por lo que este mecanismo de transmisión juega un rol importante en la patogenia viral. Se han identificado tres tipos de transmisión célula-célula: **(1)** la sinapsis virológica (Majorovits et al., 2008), **(2)** la generación de una biopelícula viral (Pais-Correia et al., 2010) y **(3)** mediante conductos celulares (Van Prooyen et al., 2010).

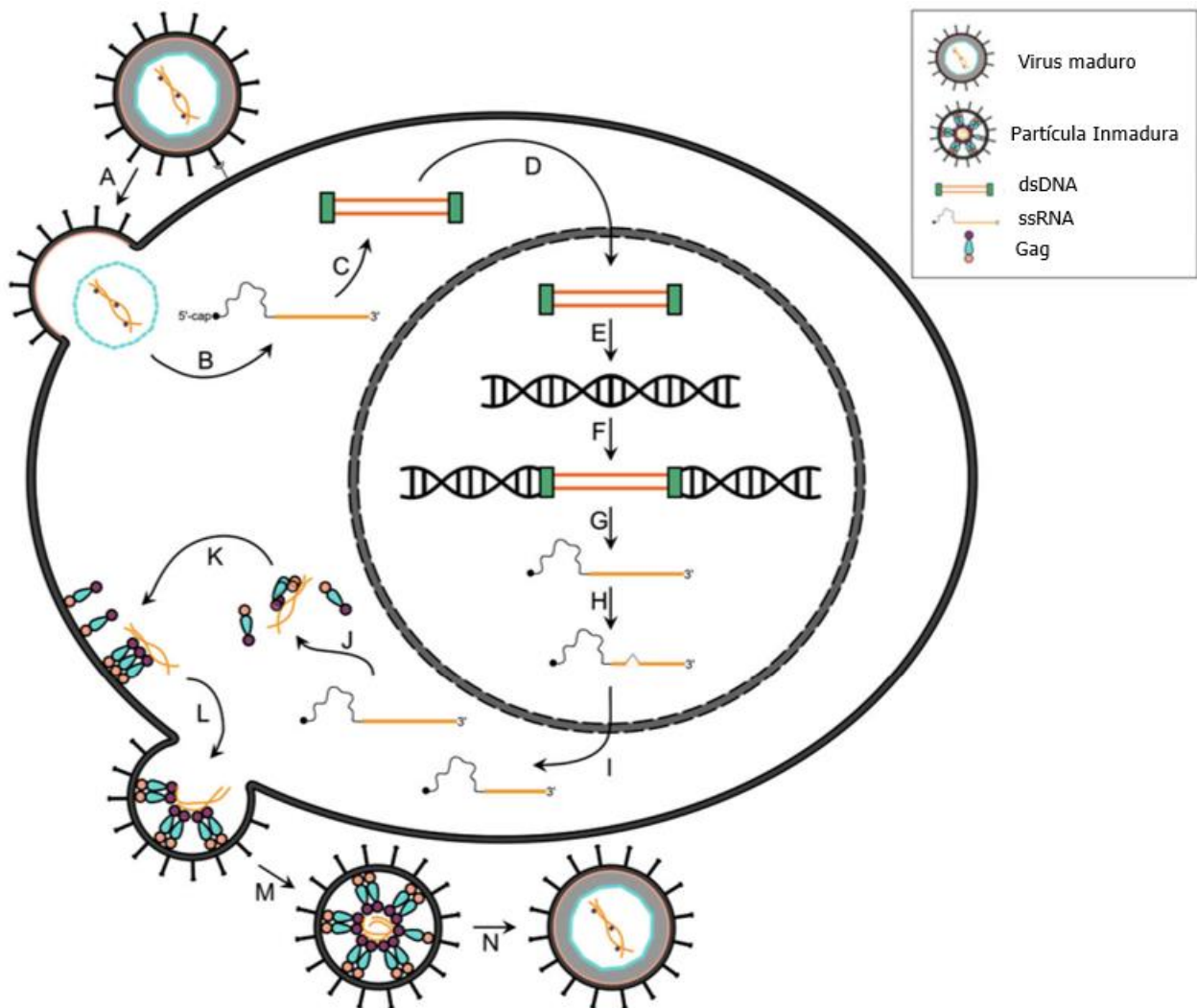


Figura 4. Ciclo replicativo del HTLV-1. Los principales pasos en el ciclo de vida del HTLV-1 se muestran de la A a la N (Modificado de Martin et al., 2016).

1.5 Proteína viral Tax

La proteína Tax (*Transcriptional Activator of pX region*), está compuesta por 353 aminoácidos (40 KDa) y contiene diversos dominios que le permiten interactuar con una variedad de factores celulares para así afectar un amplio número de funciones celulares (Kfoury et al., 2012) (**Figura 5**). Tax posee una señal de exportación nuclear (NES) (Alefantis et al., 2003; Burton et al., 2000; Chevalier et al., 2005) y una señal de localización nuclear (NLS) (Gitlin et al., 1991; Semmes & Jeang, 1992), es por esto que se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo. También se ha evidenciado que Tax forma en el núcleo estructuras denominadas *Tax Speckled Structures* (TSS) (Fryrear et al., 2009), que corresponden a complejos multiproteicos que asocian Tax con la maquinaria celular involucrada en procesos como la transcripción, el procesamiento de ARNm (Bex et al., 1997; Semmes & Jeang, 1996), reconocimiento y reparación del ADN y la activación de puntos de control (Durkin et al., 2008; Gupta et al., 2007; Haoudi et al., 2003). Para ello, Tax posee una señal de localización TSS (TSLs) entre los aminoácidos 50 y 75, que se encuentra adyacente pero separado de NLS (Fryrear et al., 2009). Además de las señales de localización que presenta Tax, ésta también posee un dominio que permite la formación de homodímero. Esto es un evento esencial para la óptima actividad transcripcional por parte de Tax (Gitlin et al., 1991; Jin & Jeang, 1997; Tie et al., 1996). Los cuatro últimos residuos de Tax (350–353) corresponden a un motivo de unión al dominio PDZ (PBM) y, de hecho, se demostró la capacidad de Tax para unirse a una variedad de proteínas que presentan el dominio PDZ (Rousset et al., 1998). Este motivo ha mostrado ser necesario para la immortalización de células T primarias mediada por la infección con HTLV-1 o el crecimiento de células T independiente de IL-2 (Tsubata et al., 2005; Xie et al., 2006).

Está bien establecido que Tax tiene diversas funciones en el ciclo replicativo viral, incluyendo un rol esencial en la activación de la transcripción viral como también en el reclutamiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia los sitios del contacto célula a célula, favoreciendo así la transmisión viral (Barnard et al., 2005). Además, ha mostrado ser suficiente para immortalizar células T *in vivo* y así jugar un importante rol en la transformación celular (Mahieux & Gessain, 2007). Está bien establecido que Tax interactúa con el factor de transcripción NF- κ B y que con ello también interfiere con la regulación del ciclo celular, las vías de apoptosis y las vías proliferativas mediante varios mecanismos (Chu et al., 1998; Harhaj & Sun, 1999; Jin et al., 1999).

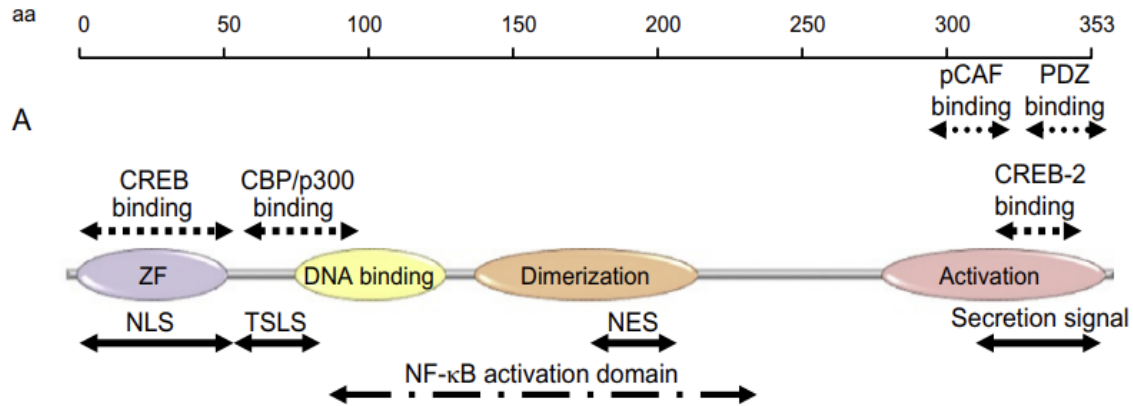


Figura 5. Representación esquemática de los dominios estructurales y funcionales de Tax. ZF: Dedos de Zinc; NLS: señal de localización nuclear; TSLs: señal de localización TSS; NES: señal de exportación nuclear (Kfoury et al., 2012).

1.6 Tax y gránulos de estrés

Debido a las diversas interacciones que tiene la proteína Tax con múltiples componentes celulares es que su localización está finamente regulada y resulta de una elaborada combinación de determinantes como el ambiente celular (Alefantis et al., 2005). Cuando las células son expuestas a condiciones estresantes, como irradiación UV, hipoxia, infección viral o estrés oxidativo, se produce una detención de la traducción celular. En este evento, la célula inhibe la traducción de ARNm *housekeeping* para favorecer aquellos que codifican proteínas que responden al estrés (Anderson & Kedersha, 2002). Para lograr esto, la célula forma estructuras ribonucleoproteicas citoplasmáticas llamadas gránulos de estrés (SGs) en respuesta a estos estímulos (Anderson & Kedersha, 2008).

Se ha demostrado que el HTLV-1 bloquea el ensamblaje de los SGs, lo que promueve la replicación viral. Este proceso está mediado por la proteína viral Tax, que migra desde el núcleo al citoplasma en respuesta a la señal de estrés. Mientras está en el citoplasma, se ha identificado que Tax interactúa con dos proteínas que son componentes de los SG: la histona desacetilasa 6 (HDAC6) (Kwon et al., 2007) y la proteasa específica de ubiquitina 10 (USP10) (Takahashi et al., 2013), lo que resulta en una inhibición de su ensamblaje. Un grupo de investigación demostró que la región N-terminal, específicamente entre los aminoácidos 2 y 22 de Tax es la responsable de la interacción con HDAC6. Sin embargo, bajo estrés oxidativo, la eliminación de esta región no impidió la formación de SG, con Tax también co-localizando en ellos, lo que sugiere que el reclutamiento de Tax a los SG está mediado por otras regiones o dominios de la proteína que son independientes de su

interacción con HDAC6 (Legros et al., 2011). Por otro lado, otro grupo de investigación reportó que Tax inhibe al menos tres funciones asociadas de la proteína USP10, incluida la formación de SG, la supresión de ROS y la inhibición de la apoptosis. En condiciones de estrés, USP10 puede prevenir la aparición de células con alteraciones de proteínas y ADN dependientes de ROS inducidas por el estrés. Por lo tanto, se sugiere que Tax, al interactuar con USP10, aumenta las alteraciones dependientes de ROS, como el daño al ADN, en las células T infectadas por HTLV-1, promoviendo así la leucemogénesis (Takahashi et al., 2013).

Aunque existen numerosos estudios que exploran la patogenicidad de la proteína Tax y su papel en diversas vías de señalización, así como en su interacción con diferentes componentes celulares, la mayoría de estos estudios se limita a la producción de proteínas recombinantes y de fusión con marcadores específicos requeridos para su propia investigación. Sin embargo, estos desarrollos no suelen estar ampliamente disponibles para otros grupos de investigación, lo que limita el progreso colaborativo del estudio de esta proteína. Por ello, en esta Memoria de Título, nos proponemos generar plásmidos que codifiquen para la proteína viral Tax fusionada a GFP, tanto en su forma WT, como en una variante resultante la delección de los primeros 22 aminoácidos de la secuencia proteica. La creación de estas construcciones permitirá estudiar de manera más eficiente los mecanismos moleculares asociados a la función de Tax, en específico en su rol en los SG, facilitando así la caracterización de su localización subcelular.

2. Propósito del estudio

Generar plásmidos que codifiquen para GFP-Tax WT y GFP-Tax Δ 22 para analizar su expresión en células HeLa y localización subcelular ante un tratamiento con arsenito de sodio

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Generar y caracterizar plásmidos que expresen la proteína viral Tax de HTLV-1 WT o la versión mutante resultante de la deleción de los 22 primeros aminoácidos, fusionada con GFP, y evaluar su expresión y localización subcelular en células HeLa.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Objetivo Específico 1

Subclonar la región codificante de la proteína viral Tax WT en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax WT.

3.2.2 Objetivo Específico 2

Subclonar la región codificante de la versión mutante de la proteína viral Tax, resultante de la deleción de los 22 primeros aminoácidos (Δ 22) en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax Δ 22.

3.2.3 Objetivo Específico 3

Evaluar la expresión de las proteínas de fusión codificadas en cada plásmido en células HeLa y su localización subcelular ante un tratamiento con arsenito de sodio.

4. Materiales y métodos

4.1 Subclonamiento

Se amplificó el marco de lectura que codifica la proteína Tax WT (de 479 a 1540 pb) o Tax Δ 22 (de 545 a 1540 bp) del plásmido pCMV4-Tax WT (plásmido Addgene n.º 23284; <http://n2t.net/addgene:23284>; RRID:Addgene_23284) mediante PCR usando el kit *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) junto con los partidores: Tax-Sall.Rev, Tax-BgIII.For y/o Tax Δ 22-BgIII.For (**Tabla 1**). Luego se realizó una electroforesis un gel de agarosa 1% a 120 V por 40 minutos en *Buffer TAE* (Tris Acetato-EDTA, Winkler) del producto de PCR o se purificó usando el kit *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System* (Promega), se usó como intercalante *SafeView* (Fermelo) y como estándar el *Ladder 1 Kb Plus* (ThermoFisher). Tanto el plásmido pEGFP-C1 como el inserto (Tax WT o Tax Δ 22) se digirieron de forma independiente usando dos enzimas (Doble digestión), *BgIII* (ThermoFisher) y *Sall* (NEB), por 1 hora y 30 minutos a 37°C. El inserto por un lado se fosforiló usando la enzima T4 PNK (NEB) por 30 minutos a 37°C. Para la ligación se usó la enzima T4 ADN Ligasa (NEB) con diferentes proporciones vector:inserto (1:1, 1:3, 1:5 y 1:7) y se incubó la reacción a 16°C toda la noche. Luego el producto de ligación se transformó en bacterias quimio-competentes *Escherichia coli* DH5 α , de las colonias resultantes de la transformación se realizó la purificación del plásmido con el E.Z.N.A.® Plasmid DNA mini kit II (BIOTEK) según las especificaciones del fabricante y se obtuvo la secuencia nucleotídica de los insertos clonados en los vectores recombinantes (Servicio prestado por la Universidad Católica de Chile).

4.2 Partidores

Los partidores utilizados en esta Memoria de Título fueron diseñados utilizando el programa SnapGene (www.snapgene.com) y se resumen en la siguiente tabla:

Partidor	Secuencia (5' → 3')	Finalidad
Tax-BgIII.For	GTGAGATCTATGGCCCACTTCCCAGG	Subclonamiento
Tax Δ 22-BgIII.For	GTGAGATCTTGTGTACAAGGCGACTGGTGC	Subclonamiento
Tax-Sall.Rev	ACTGTCGACTCAGACTTCTGTTTCGCGGAAATG	Subclonamiento
EGFP-C.For	ATGGTCCTGCTGGAGTTC	Secuenciamiento

Tabla 1. Partidores utilizados. El partidor EGFP-C.For, pertenece al servicio de la unidad de secuenciación de la Universidad Católica.

4.3 Cultivo celular

Las células HeLa se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma), 1% de *Antibiotic Antimycotic Solution* (Sigma) y 5% de L-glutamina (Sigma). Para realizar subcultivos, las células fueron lavadas con PBS 1x y luego tratadas con Tripsina-EDTA (Sigma) por 5 minutos. Finalmente, 0,5 o 1 mL se diluyeron en 5 o 10 mL de medio DMEM fresco.

4.4 Vectores

Se utilizaron los vectores pEGFP-C1 y pCMV4-Tax WT (plásmido Addgene n.º 23284; <http://n2t.net/addgene:23284>; RRID:Addgene_23284) (Béraud et al., 1994) para la generación de pEGFP-Tax y pEGFP-TaxΔ22 (Ver: subclonamiento). Para la expresión de Tax WT se usó el plásmido pEGFP-Tax y para la expresión de Tax con la delección de los 22 primeros aminoácidos se usó el plásmido: pEGFP-TaxΔ22.

4.5 Transfección

Se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos (3 x 10⁵ células/pocillo) de 12 pocillos (7 x 10⁴ células/pocillo); las células HeLa se transfectaron utilizando Lipofectamina 3000 (ThermoFisher) según las indicaciones del fabricante usando 1 µg de ADN para las placas de 6 pocillos y 0,5 µg de ADN para las placas de 12 pocillos. A las células se les realizó un cambio de medio DMEM a las 6 horas post transfección (hpt).

4.6 Tratamiento con arsenito de sodio

Los cultivos de células HeLa fueron tratadas con arsenito de sodio (Ars) por 30 minutos. A partir de un *stock* de Ars al 0,5 M, se preparó una solución a una concentración de 500 µM de Ars en DMEM suplementado fresco. A las células transfectadas, se esperó 23,5 hpt, se les removió el medio de cultivo y se agregó el nuevo medio, incubándolo por 30 minutos. Como control, se usó DMEM suplementado con un volumen de DMSO (Merck), equivalente al volumen de Ars agregado.

4.7 Lisis celular y cuantificación de proteínas

Luego de 24 hpt, se retiró el medio DMEM y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x (ThermoFisher). Posteriormente se agregaron 200 µL de *buffer* de lisis a 4°C (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 100 mM, NP-40 al 0,5%v/v, EDTA 1 mM, inhibidor de proteasas

(Roche)) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Luego se homogenizó el lisado celular y se incubó toda la noche a -20°C. Posteriormente se clarificó el lisado mediante centrifugación a 5.000 rpm por 5 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. La concentración de proteínas se evaluó mediante el *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad). La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 592 nm utilizando el lector de microplacas SYNERGY HTX multi-mode reader (BIOTEK). Se utilizó albumina de suero bobino (BSA) (GrupoBios) para generar una curva de “Absorbancia vs Concentración de proteínas”. Finalmente, para el análisis por *Western Blot*, se prepararon alícuotas con 30 µg de proteínas totales y se desnaturalizaron en *buffer* Laemmli, a 95°C durante 5 minutos.

4.8 Western Blot

Las proteínas se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE con gradiente de 5-15% de acrilamida-bisacrilamida al 40% (Bio-Rad) durante 2 horas a 120 Voltios en *running buffer* (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) en una cámara para electroforesis Bio-Rad. Posteriormente, se transfirió el resultado del SDS-PAGE a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PDVF) de 0,45 µm (Merck) previamente activada con metanol (Merck). La transferencia se realizó a 0,4 Amperes constantes durante 2 horas, a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas con *Blotting-Grade Blocker* (Bio-Rad) al 5% en TBS-T (*Tris-Buffered Saline*, 1% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó durante la noche con agitación a 4°C, con los respectivos anticuerpos primarios (**Tabla 2**) en solución de anticuerpo (BSA 5% y NaN₃ 0,02% en TBS-T). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (**Tabla 2**) a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las membranas tres veces con TBS-T y, para revelar se utilizó el sustrato *Pierce TM ECL Western blotting substrate* (Thermo Scientific) o *Immobilon Forte Western HRP substrate* (Merck). Las señales de quimioluminiscencia se detectaron en el equipo Alliance Q9 Advanced de Uvitec Cambridge.

4.9 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta Memoria de Título se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Origen	Marca	Dilución
Anti-GFP	Ratón	SantaCruz	1:3000
Anti-Beta actina	Ratón	SantaCruz	1:3000
Anti-G3BP1	Ratón	SantaCruz	1:3000 (WB); 1:250 (IFI)
Anticuerpo secundario	Origen	Marca	Dilución
Anti-Ratón HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:5000
Anti-Ratón Alexa Fluor™ 594	Burro	Invitrogen	1:500

Tabla 2. Anticuerpos utilizados

4.10 Inmunofluorescencia indirecta

Las células HeLa previamente tratadas con Ars o DMSO, se les retiró el medio DMEM y se lavó 2 veces con PBS 1x filtrado. Se fijaron las células usando paraformaldehído (PFA, ThermoFisher) al 4% por 20 minutos. Las células fueron lavadas con PBS 1x, incubadas con una solución de Glicina (Winckler) a una concentración de 0,1 M en PBS 1x por 10 minutos, lavadas con PBS 1x e incubadas con una solución de Triton X-100 (Sigma) a una concentración de 0,2 % en PBS 1x por 5 minutos, lavadas con PBS 1x y se guardaron a 4°C. Las células se lavaron brevemente en PBS 1x antes de bloquearlas en una solución de bloqueo 1x (Roche). Las células se incubaron con el anticuerpo primario de G3BP1 (**Tabla 2**) durante 1 hora a 37°C, se lavaron durante 5 minutos en PBS 1x y se incubó con el anticuerpo secundario (**Tabla 2**) durante 1 hora. Las células se lavaron durante 5 minutos en PBS 1x, se incubaron con DAPI 1x (Merck) en PBS 1x durante 1 minuto y luego se lavaron dos veces en PBS 1x y una vez en agua ultrapura (Sigma). Se dejaron secar las células y se montaron en portaobjetos usando *Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium* (Sigma). Las imágenes se obtuvieron usando el microscopio invertido modular de epifluorescencia IX73 (Olympus) y con el Microscopio confocal Nikon C2+ con objetivo de 60X (Facility Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

4.11 Conteo de células SG positivas y co-localización

Para el conteo de células SG positivas se eligieron aleatoriamente tres campos de visión diferentes de cada cubreobjetos, se contaron 20 células GFP positivas en cada campo y se

registró las que eran positivas para SG, las cuales se definieron como focos de G3BP1 que miden $>0,5 \mu\text{m}$ (Gilks et al., 2004). Para establecer co-localización mediante el coeficiente de Pearson se utilizó el software de Imaris 10.0.1 usando la superposición de los canales de GFP y G3BP1. El procesamiento de imágenes se realizó con los programas ImageJ 1.53k (NIH: <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Para graficar los resultados y hacer el análisis estadístico con prueba t de Student se usó el *software* GraphPad Prism 8.0.1.

5. Resultados

5.1 Subclonar la región codificante de la proteína viral Tax WT en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax WT.

5.1.1 Estandarización de los partidores

Con el objetivo de realizar el subclonamiento de la región codificante de Tax WT en el plásmido pEGFP-C1 para así generar un nuevo plásmido (pEGFP-Tax WT) que codifique para la proteína de fusión GFP-Tax WT (**Figura 6**), es que se buscó amplificar mediante la técnica de PCR la región codificante de la proteína viral Tax WT a partir del plásmido pCMV4-Tax WT de forma efectiva y así poder obtener la mayor cantidad de producto.

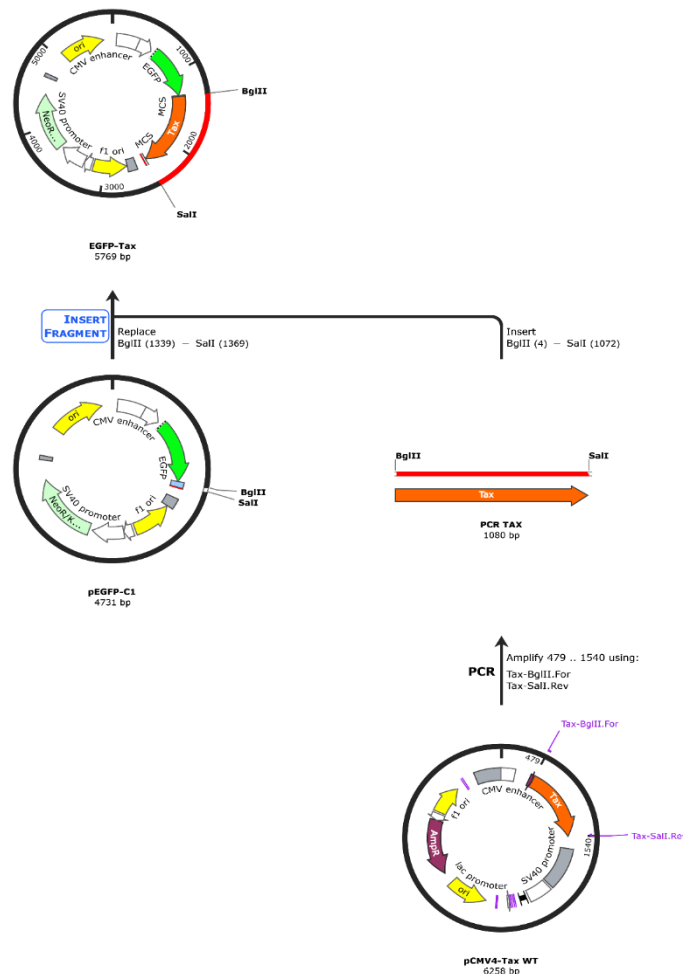


Figura 6. Esquema representativo del subclonamiento para generar el plásmido pEGFP-Tax WT. Se muestra el vector de origen del inserto (pCMV4-Tax WT), el inserto obtenido por PCR (Tax WT) y el vector a clonar (pEGFP-C1) con sus respectivos pares de bases (bp) y los sitios de corte con las enzimas *Bgl*II y *Sall*. Creado con SnapGene.

Se utilizaron los partidores Tax-BgIII.For y Tax-Sall.Rev descritos en la **Tabla 1** a diferentes temperaturas de *annealing*, de 52°C a 69°C (**Figura 7**) con el fin de encontrar la temperatura a la cual se obtenga la mayor cantidad de producto de PCR. Al visualizar el producto PCR en el gel de agarosa 1% se comprobó que los partidores amplifican un producto que está cercano a los 1000 bp y que, además, es el tamaño esperado de la región codificante para Tax WT (1074 bp). Por otro lado, se evidencia que se genera una cantidad de producto PCR similar en un amplio rango de temperatura de *annealing*, siendo los que tienen menor producción a mayores temperaturas (68°C y 69 °C). Dado lo anterior es que se utilizó en los siguientes pasos la temperatura de *annealing* teórica del partidor con menor temperatura de fusión (Tm), es decir, a 62°C correspondiente al partidor Tax-BgIII.For.

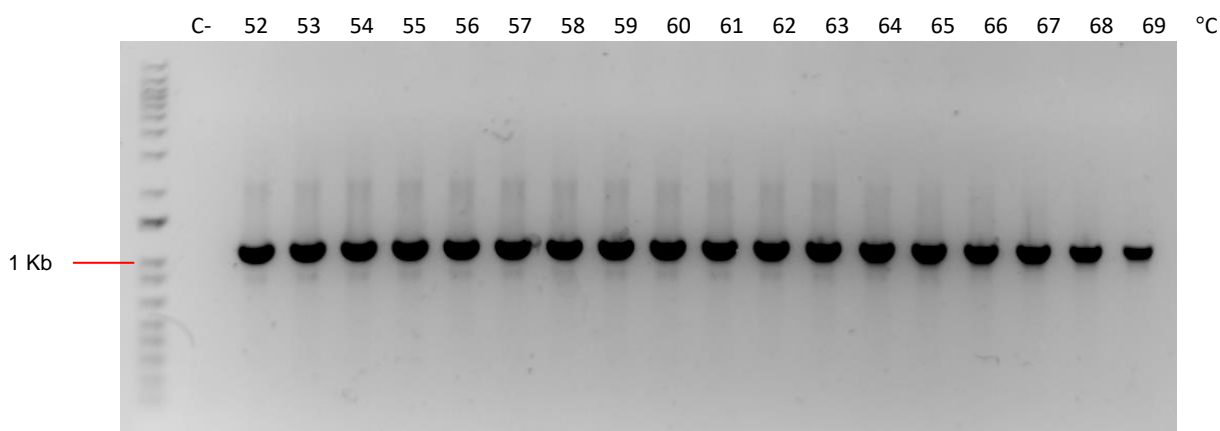


Figura 7. Estandarización de temperatura de *annealing* para amplificar Tax WT. Electroforesis de gel de agarosa al 1% con *Ladder 1 Kb Plus*. C-: control negativo, sin plásmido. Cada temperatura corresponde a la temperatura de *annealing* que se usó en la reacción de PCR.

5.1.2 Ligación del inserto Tax WT en pEGFP-C1

Una vez obtenida la temperatura a la cual amplificar Tax WT (62°C), se realizó un PCR a esa temperatura con el fin de purificar de forma directa el producto PCR usando el kit *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System*. Una vez obtenido el producto purificado y cuantificado se realizó la doble digestión con las enzimas *BgIII* y *Sall* tanto del inserto como del vector pEGFP-C1. Como la enzima T4 ADN Ligasa cataliza la unión de dos hebras de ADN entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de nucleótidos adyacentes en una configuración con extremos cohesivos o romos (Doherty & Suh, 2000), es que se procedió a fosforilar los extremos del inserto gracias a la acción de la enzima T4 PNK, la cual cataliza la transferencia y el intercambio de Pi desde la posición γ del ATP al extremo 5'-hidroxilo de polinucleótidos (Eastberg et al., 2004). Una vez fosforilado el inserto se realizó la reacción de ligación junto al vector pEGFP-C1 en diferentes proporciones vector:inserto (1:1; 1:3, 1:5

y 1:7). El producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las bacterias transformantes y posteriormente se hizo la purificación del plásmido sin kit comercial, seguido de la doble digestión con *Bgl*III y *Sal*I para confirmar la inserción (**Figura 8**).

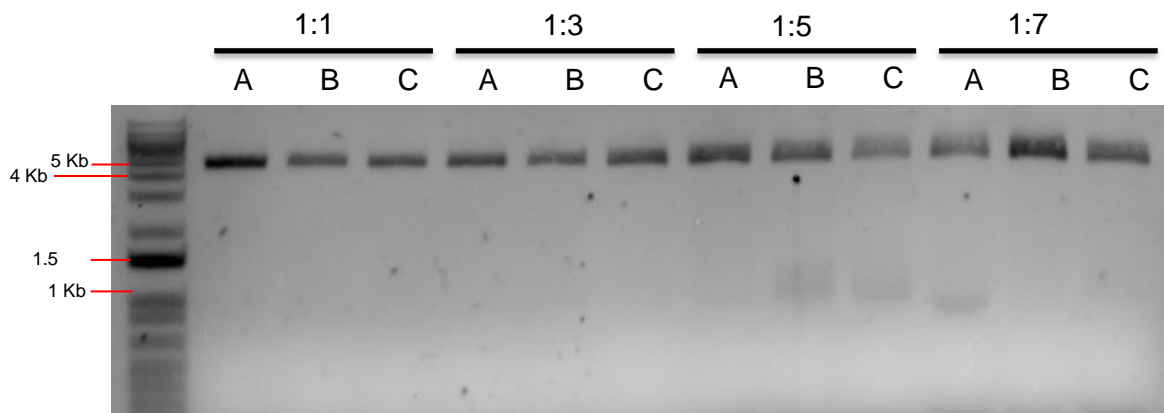


Figura 8. Doble digestión de la purificación de plásmidos proveniente de la transformación con el producto de ligación. Se seleccionaron tres colonias (A, B y C) de cada placa de diferente proporción vector:inserto y se realizó una doble digestión para luego realizar una electroforesis en gel de agarosa 1% usando el *Ladder 1 Kb Plus*.

De lo anterior, se puede evidenciar que hay unas bandas que migran a la altura de los 1kb aproximadamente en los carriles correspondiente a las muestras 1:5B, 1:5C y 1:7A. Lo cual indica que esas colonias podrían resultar positivas para el subclonamiento ya que esa banda correspondería al inserto, es decir, de la región codificante de Tax WT. Para poder visualizar de mejor forma y comprobar si hay presencia del inserto o no, se realizó nuevamente purificación de plásmido de aquellas colonias, pero esta vez con la columna del kit comercial (**Figura 9**).

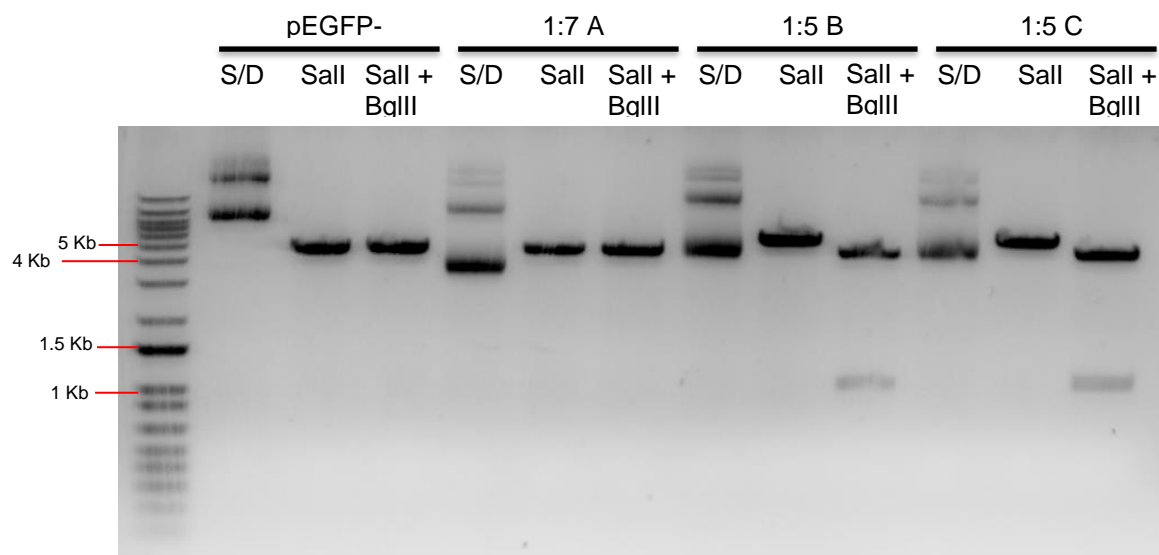


Figura 9. Digestión de la purificación de plásmidos con columna del kit comercial. Cada plásmido purificado tiene la condición: sin digerir (S/D), la cual no contiene ninguna enzima de digestión; la condición *Sall*, donde sólo se digirió con la presencia de la enzima *Sall* y la condición *Sall + BglII*, corresponde a la doble digestión con las enzimas *BglII* y *Sall*. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% usando el *Ladder 1 Kb Plus*.

Teniendo lo anterior, se comprobó que las colonias 1:5B y 1:5C son positivas para el subclonamiento, ya que, al digerir con ambas enzimas, *BglII* y *Sall*, se obtuvo una banda correspondiente al peso del inserto. Además, en la condición con una sola enzima dada por *Sall*, donde el plásmido está linealizado se observó un aumento en el tamaño o en el desplazamiento electroforético de la banda que en comparación con el vector donde se realizó el subclonamiento (pEGFP-C1) hay un aumento de tamaño de 1 kb aproximadamente lo cual correspondería a la presencia del inserto en el vector.

Finalmente, ambos plásmidos provenientes de las colonias positivas mencionadas se obtuvo la secuencia nucleotídica de los insertos clonados en los vectores recombinantes y luego se alinearon usando Blastn de NCBI, dando como resultado que el plásmido proveniente de 1:5B tiene un 98% de identidad (1057/1078) y presenta 1% de *gaps* (18/1078) con respecto a la secuencia de referencia de Tax. Por otro lado, 1:5C tiene un 99% de identidad (1067/1078) y presenta 0% *gaps* (10/1078) con respecto a la secuencia de referencia de Tax. Por consiguiente, se eligió a 1:5C para ser el plásmido pEGFP-Tax WT y con ello completar el primer objetivo específico de esta Memoria de Título (**Figura 13B**).

5.2 Subclonar la región codificante de la versión mutante de la proteína viral Tax, resultante de la delección de los 22 primeros aminoácidos ($\Delta 22$) en el plásmido pEGFP-C1 para generar la proteína de fusión GFP-Tax $\Delta 22$.

5.2.1 Estandarización de los partidores

Al igual que en el objetivo específico 1, se buscó realizar el subclonamiento de la región codificante para Tax $\Delta 22$, la cual corresponde a una delección de los 22 primeros aminoácidos de esta proteína, en el plásmido pEGFP-C1 para así generar un nuevo plásmido (pEGFP-Tax $\Delta 22$) que codifique la proteína de fusión GFP-Tax $\Delta 22$ (**Figura 10**). Es por ello que se buscó mediante la técnica de PCR amplificar la región codificante de la proteína Tax $\Delta 22$ a partir del plásmido pCMV4-Tax WT y para hacerlo de forma efectiva y obtener la mayor cantidad de producto es que se realizó una estandarización a diferentes temperaturas de *annealing*.

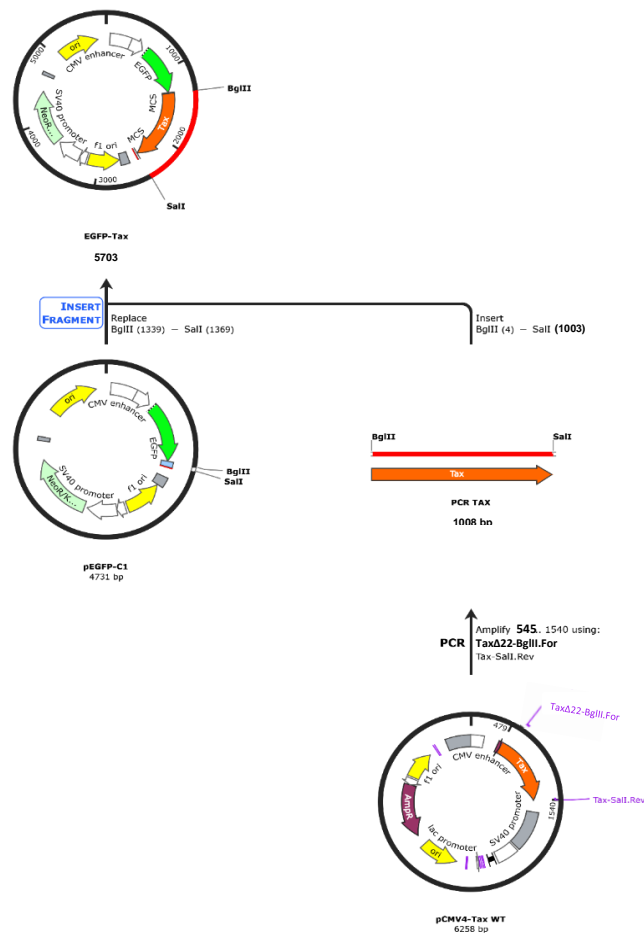


Figura 10. Esquema representativo del subclonamiento para generar el plásmido pEGFP-Tax $\Delta 22$. Se muestra el vector de origen del inserto (pCMV4-Tax WT), el inserto obtenido por PCR (Tax $\Delta 22$) y el vector a clonar (pEGFP-C1) con sus respectivos pares de bases (bp) y los sitios de corte con las enzimas *BglIII* y *Sall*. Creado con SnapGene.

Se utilizaron los partidores Tax Δ 22-BgIII.For y Tax-Sall.Rev descritos en la **Tabla 1** a diferentes temperaturas de *annealing*, de 52°C a 69°C (**Figura 11**). Al visualizar el producto de PCR en el gel de agarosa 1% se comprobó que los partidores amplifican un producto que está cercano a los 1000 bp y que, además, es el tamaño esperado de la región codificante para Tax Δ 22 (1008 bp). Por otro lado, se observa que se generó una cantidad de producto de PCR similar en un amplio rango de temperaturas. Dado lo anterior, es que se utilizó en los siguientes pasos la temperatura de *annealing* a la cual se observó el producto PCR con mayor integridad, es decir, a 60°C.

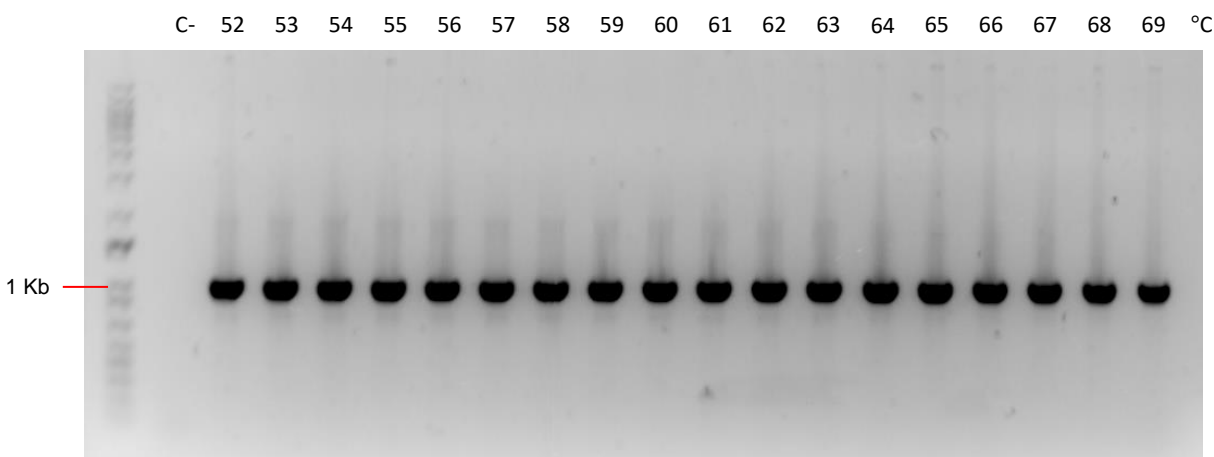


Figura 11. Estandarización de temperatura de *annealing* para amplificar Tax Δ 22. Gel agarosa 1% con *Ladder 1 Kb Plus*. C-: control negativo, sin plásmido. Cada temperatura corresponde a la temperatura de *annealing* que se usó en la reacción de PCR.

5.2.2 Ligación del inserto Tax Δ 22 en pEGFP-C1

Una vez obtenida la temperatura a la cual amplificar Tax Δ 22 (60°C), se realizó un PCR a esa temperatura con el fin de poder purificar de forma directa el producto PCR usando el kit *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System*. Una vez obtenido el producto purificado y cuantificado se realizó la doble digestión con las enzimas *BgIII* y *Sall* tanto del inserto como del vector pEGFP-C1. Al igual que para el subclonamiento del inserto de Tax WT, se fosforiló el inserto por la acción de la T4 PNK para luego ligar con la T4 ADN Ligasa en diferentes proporciones vector:inserto (1:1; 1:3, 1:5 y 1:7). El producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las bacterias transformantes y posteriormente se hizo PCR de colonia usando los partidores Tax Δ 22-BgIII.For y Sall.Rev (**Figura 12**). De todas las colonias seleccionadas dieron positivas las: 1:1A, 1:1B, 1:1E, 1:3B, 1:3E, 1:5A-E y 1:7A-E.

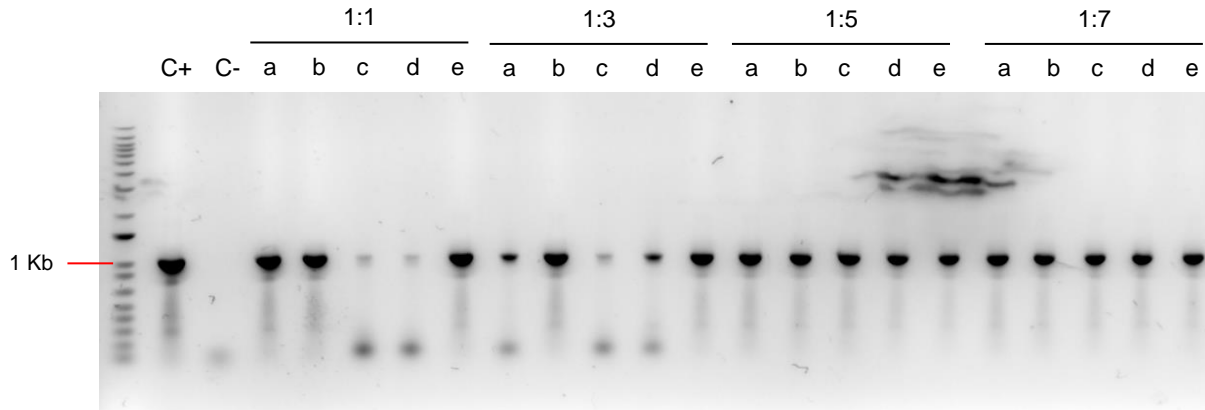


Figura 12. PCR de colonia para el subclonamiento de Tax Δ 22. Gel de agarosa 1%, *Ladder 1 Kb Plus*. C+: control positivo, se usó el plásmido pCMV4-Tax WT; C-: control negativo, sin plásmido.

Posteriormente se seleccionaron las 3 colonias de la proporción de ligación 1:7 (B, D y E) y se realizó una purificación de plásmido con columna del kit comercial para luego se obtener la secuencia nucleotídica de los insertos clonados en los vectores recombinantes usando los partidores EGFP-C.For y Tax-Sall.Rev (**Tabla 1**). Las secuencias obtenidas, se alinearon usando Blastn de NCBI. Del alineamiento proveniente de las secuencias obtenidas usando el partidor EGFP-C.For se pudo comprobar la delección de los primeros 66 nucleótidos de la región codificante de Tax que corresponderían a los 22 primeros aminoácidos en los tres plásmidos analizados (**Figura 13C**). Por otro lado, del alineamiento proveniente de las secuencias obtenidas usando el partidor Tax-Sall.Rev se pudo evaluar la similitud de secuencia que tenían los plásmidos que la secuencia descrita de Tax de HTLV-1. De esto último se obtuvo que el plásmido 1:7B tiene un porcentaje de identidad de 96% (205/214), el plásmido 1:7D uno de 99% (199/200) y el plásmido 1:7E uno de 100% (194/194). Por consiguiente, se seleccionó el plásmido 1:7E, ahora denominado pEGFP-Tax Δ 22 para los siguientes experimentos.

Finalmente, con el fin de poder visualizar y comparar los tamaños de ambos plásmidos generados en esta Memoria de Título, pEGFP-Tax WT y pEGFP-Tax Δ 22, se realizó una doble digestión con las enzimas *BglII* y *Sall* (**Figura 13A**). Se puede comparar los tamaños de los insertos (Carril 4 y 5) que tienen un tamaño aproximado de 1 kb, pero el correspondiente a la delección, Tax Δ 22 tiene mayor desplazamiento electroforético en comparación con Tax WT debido a la pérdida equivalente de 66 nucleótidos. Estos resultados, junto con el alineamiento de secuencias obtenido (**Figura 13 B y C**) demuestran

que los plásmidos generados poseen clonadas las regiones codificantes para la versión WT y la versión mutante de la delección (Tax Δ 22).

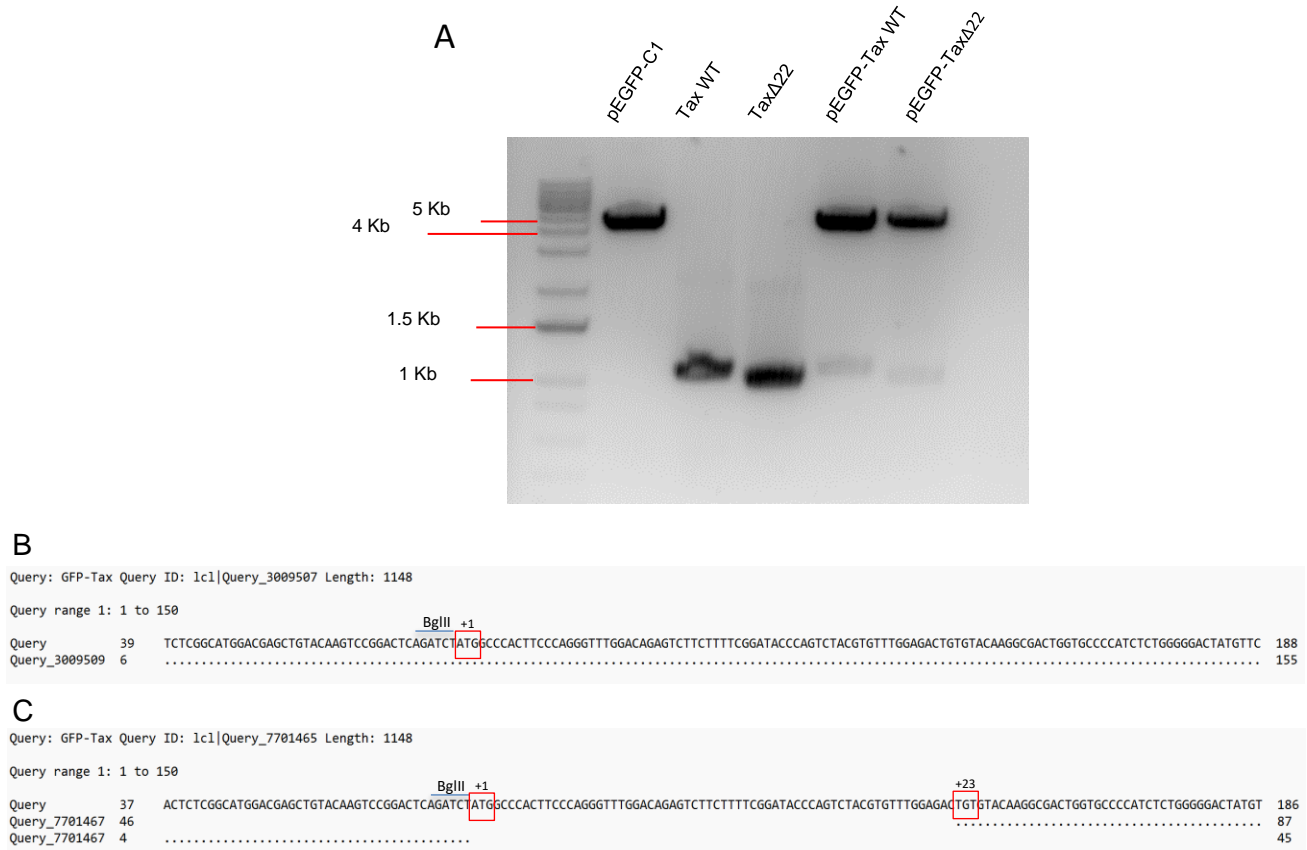


Figura 13. Doble digestión de los plásmidos generados y alineamiento de secuencias. (A) Se digirieron los plásmidos pEGFP-Tax WT y pEGFP-Tax Δ 22 con las enzimas *BglII* y *Sall*. En el carril 1 está el plásmido pEGFP-C1, carril 2 y 3 los productos PCR purificados de Tax WT y Tax Δ 22, respectivamente, y en el carril 4 y 5 los plásmidos generados en esta Memoria de Título. Gel de agarosa 1,5% y *Ladder 1 Kb Plus*. **(B y C)** Alineamiento mediante Blastn (NCBI) de la secuencia obtenidas de pEGFP-Tax WT y pEGFP-Tax Δ 22, respectivamente, usando el partidor EGFP-C.For. *BglII*, corresponde a la secuencia de corte para el enzima. +1 corresponde al codón 1 de la región codificante de Tax, y 23+ el codón 23.

5.3 Evaluar la expresión de las proteínas de fusión codificadas en cada plásmido en células HeLa y su localización subcelular ante un tratamiento con arsenito de sodio.

5.3.1 Expresión de las versiones mutantes de Tax en células HeLa

Para poder evaluar los niveles de expresión de las proteínas de fusión GFP-Tax y GFP-Tax Δ 22 se transfectaron células HeLa con ambos plásmidos de forma independiente y como control se usó el vector pEGFP-C1 que codifica para GFP (**Figura 14, ruta A**).

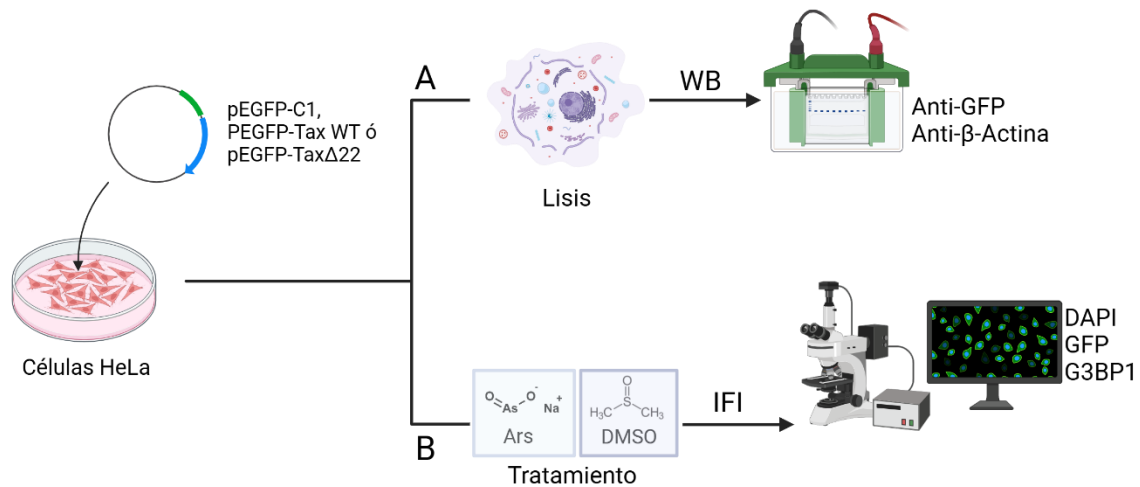


Figura 14. Esquema representativo de la estrategia experimental. (A) Las células transfectadas con los plásmidos se lisaron y se realizó WB para visualizar las proteínas GFP y β -actina. (B) Las células transfectadas con los plásmidos se trataron con Ars o DMSO para luego ser fijadas y mediante la técnica de IFI visualizar por microscopía DAPI, GFP y G3BP1. Creado con BioRender.com.

Transcurrido 24 hpt y usando la técnica de *Western Blot* se comprobó que las proteínas se expresan, además de comprobar que las construcciones al ser transfectadas en células HeLa expresan la proteína de fusión y que además el peso molecular de las proteínas de fusión correspondía al valor teórico (**Figura 15**). Tax WT tiene un peso molecular de 40 KDa, por lo que la unión con la proteína GFP la cual tiene un peso de 27 KDa, hace que la proteína resultante tenga un peso molecular de 67 KDa. Por otro lado, la delección de los primeros 22 aminoácidos de Tax hace que se reduzca su peso molecular en aproximadamente 3 KDa, por lo que al fusionarse con GFP, hace que la proteína de fusión tenga un peso molecular de aproximadamente 64 KDa. Por otro lado, se puede ver en cuanto a la intensidad de las bandas que la proteína GFP-Tax Δ 22 tiene una menor intensidad en comparación con la versión WT y con el control GFP.

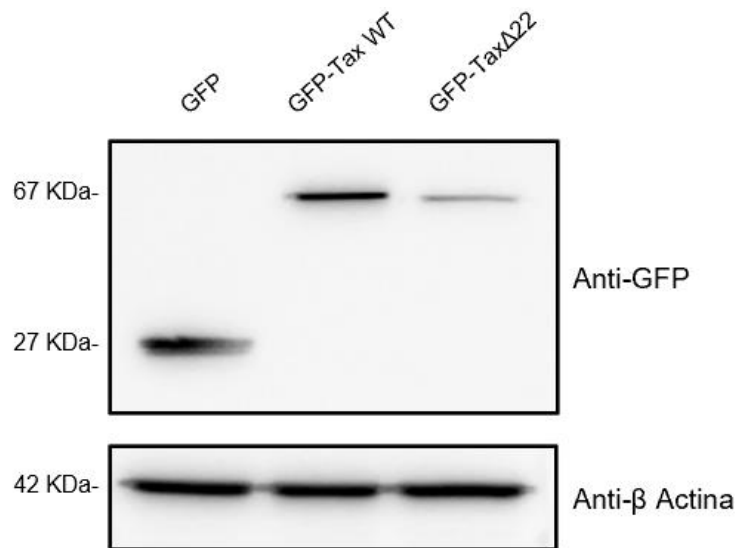
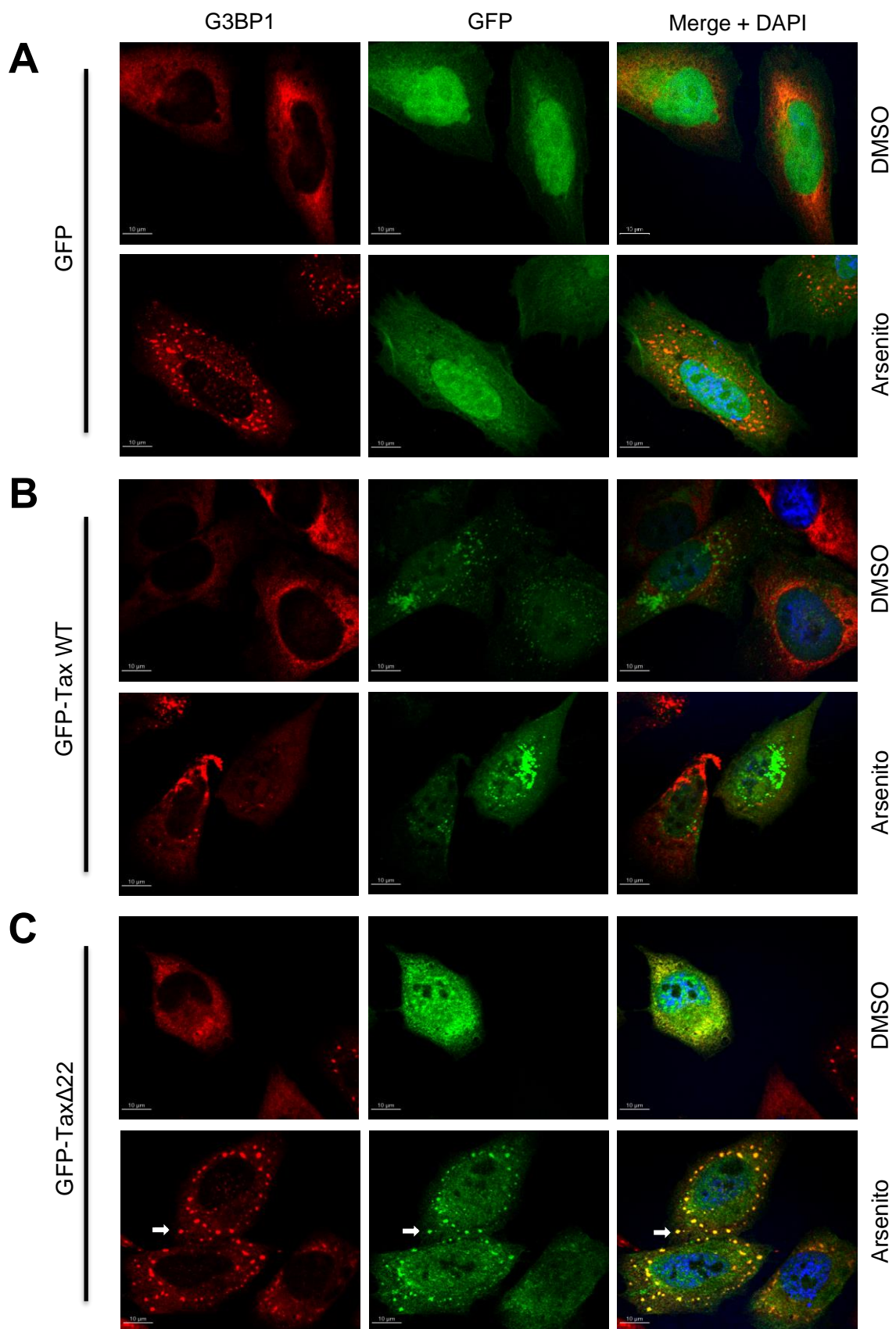


Figura 15. Expresión de las versiones WT y $\Delta 22$ de Tax en células HeLa. Se transfectaron las células HeLa con los plásmidos que codifican las proteínas de fusión GFP-Tax WT y GFP-Tax $\Delta 22$, se usó GFP como control. Se lisaron y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 5-15% a 120 V por 2 horas y se transfirió en una membrana de PDVF a 0,4 A por 2 horas. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-GFP y anti- β -actina y el anticuerpo secundario anti-ratón.

5.3.2 Localización subcelular de las versiones mutantes de Tax en células HeLa

Tax es una proteína que interactúa con múltiples factores celulares e interviene en diferentes vías de señalización para así favorecer la transcripción viral, persistencia y patogénesis (Boxus et al., 2008; Matsuoka & Jeang, 2007). Dado lo anterior, es que su localización subcelular está regulada, ya que se ha descrito que Tax se localiza preferentemente en el compartimiento nuclear formando los denominados *Tax Speckled Structures* (TSS) (Fryrear et al., 2009) formando complejos multiproteicos con la maquinaria celular involucrados en procesos como la transcripción, el procesamiento de ARNm (Bex et al., 1997; Semmes & Jeang, 1996), reconocimiento y reparación del ADN y la activación de puntos de control (Durkin et al., 2008; Gupta et al., 2007; Haoudi et al., 2003). Con el fin de evaluar la localización subcelular de la proteína GFP fusionada ya sea con la proteína viral Tax WT o la versión mutante (Tax $\Delta 22$), se realizó una microscopia usando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células HeLa transfectadas con los plásmidos que codifican dichas proteínas y se usó el plásmido pEGFP-C1 que codifica GFP como control (**Figura 14, ruta B**). Se marcó la proteína G3BP1 (*G3BP stress granule assembly factor 1*), la cual corresponde a la principal proteína ensambladora de los SG (Yang et al., 2020), que frente a un agente de tipo oxidativo como Ars, los ensambla generando estos condensados biomoleculares



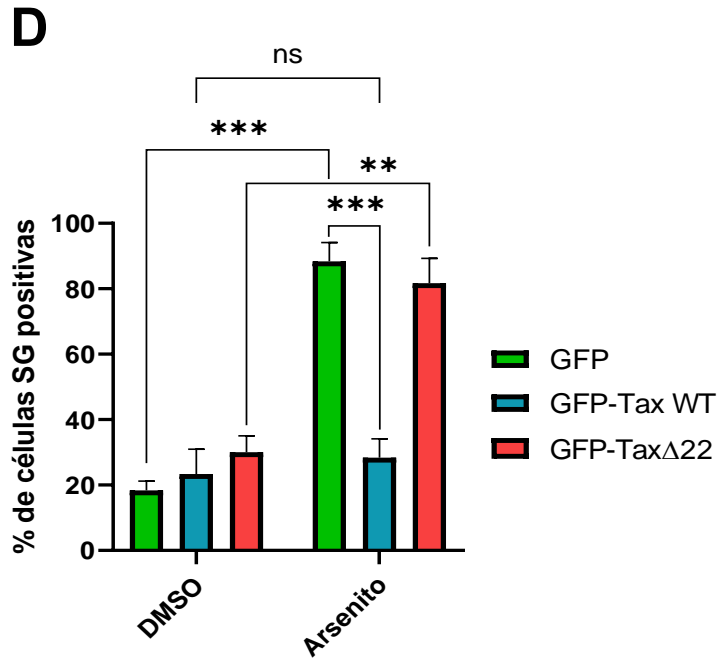


Figura 16. Localización subcelular de GFP-Tax WT y GFP-TaxΔ22 y su capacidad de inhibir SG. (A) IFI de células HeLa transfectadas con los plásmidos que codifican para la proteína GFP, GFP fusionada con la proteína viral Tax WT **(B)** o con la versión mutante TaxΔ22 **(C)**, respectivamente, cada una con o sin tratamiento con Ars. **(D)** Conteo de células GFP y SG positivas con o sin tratamiento con Ars. Se analizaron 20 células en 3 diferentes campos de visualización. El análisis estadístico se realizó con prueba t de Student (**P < 0,01, ***P < 0,001).

Las células transfectadas con el plásmido que codifica GFP (**Figura 16A**), se observa que expresan la proteína tanto con la condición con el tratamiento con DMSO y con Ars, sin cambiar su localización subcelular o co-localizar con los SG. Por otro lado, al analizar la expresión de la proteína GFP-Tax WT (**Figura 16B**) en la condición con DMSO se puede observar agregación a nivel nuclear siendo parte de los denominados TSS anteriormente mencionados. Por otra parte, cuando la proteína se encuentra a nivel citoplasmático se forman focos de GFP-Tax, tal como se ha descrito previamente (Legros et al., 2011). Sin embargo, en células HeLa tratadas con Ars se observa una traslocación a nivel de citoplasma, además de la generación de focos discretos donde la proteína Tax se estaría concentrando. El análisis de las imágenes muestra un coeficiente de Pearson de 0,17 entre G3BP1 y GFP-Tax WT en la condición de tratamiento con Ars, lo que indica que hay una baja relación de co-localización entre estas dos proteínas cuando se forman los SGs. Finalmente, al analizar las células transfectadas con pEGFP-TaxΔ22 (**Figura 16C**), se observa que la proteína trunca tiene localización a nivel nuclear y preferentemente a nivel citoplasmático, donde en células HeLa que son positivas para SGs, la proteína GFP-TaxΔ22 co-localiza en ellos (**Figura 16C, flecha blanca**), tal como se ha descrito

previamente (Legros et al., 2011). El análisis de las imágenes muestra un coeficiente de Pearson de 0,57, lo cual indica una alta relación de co-localización entre G3BP1 y GFP-Tax Δ 22. Además, a diferencia de la versión WT, no se generan focos discretos de la proteína viral en el citoplasma. Por último, se observa en células no transfectadas cercanas a células positivas para la transfección con GFP-Tax Δ 22 focos de esta proteína no descritos previamente (**Figura 17**), fenómeno no observado en el caso de GFP-Tax WT.

Finamente, el análisis del conteo de células transfectadas con los plásmidos que codifican, ya sea GFP, GFP-Tax WT o GFP-Tax Δ 22, y que además generen SG tanto en presencia o ausencia de Ars, indica que la proteína viral Tax en su versión WT inhibe la formación de SG y que la versión mutante no los inhibe, en comparación con el control GFP, tal como se ha descrito en la literatura (Legros et al., 2011) (**Figura 16D**).

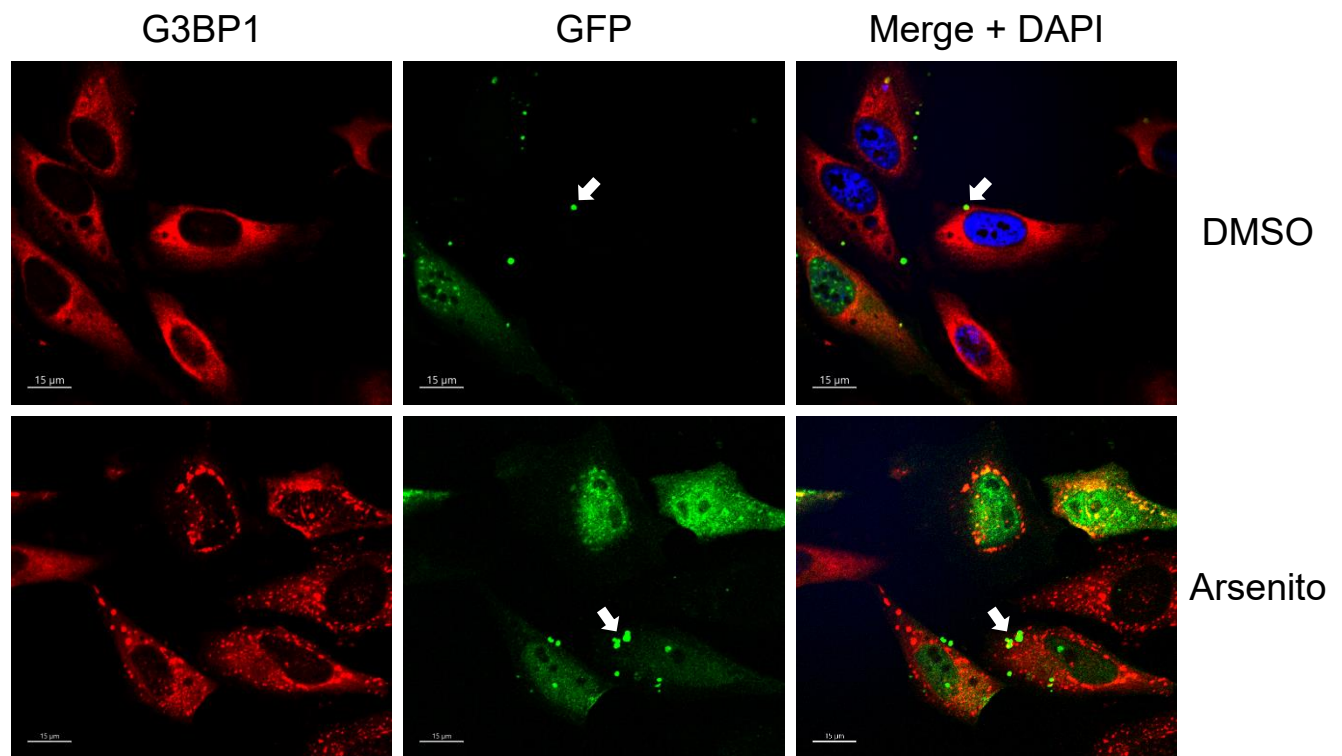


Figura 17. Visualización de agregados extracelulares de GFP-Tax Δ 22 en células HeLa. IFI de células HeLa transfectadas con el plásmido pEGFP-Tax Δ 22, con y sin tratamiento con Ars.

6. Discusión

El HTLV-1 es el agente etiológico de dos principales patologías: una leucemia rápidamente mortal denominada leucemia de células T del adulto y una enfermedad neurológica degenerativa conocida como paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al HTLV-1 (Proietti et al., 2005). HTLV-1 codifica proteínas regulatorias, de las cuales la proteína viral Tax es la más caracterizada y estudiada dada sus diversas interacciones con factores celulares para alterar vías de señalización celular y procesos con el fin de favorecer la transcripción viral, persistencia y patogénesis (Boxus et al., 2008; Matsuoka & Jeang, 2007).

En esta Memoria de Título se generaron dos plásmidos, uno que codifica la proteína viral Tax WT unida a GFP (pEGFP-Tax WT) y otro que codifica una versión mutante de la proteína Tax, la cual corresponde a la delección de los 22 primeros aminoácidos en su región N-Terminal, unida a GFP (pEGFP-Tax Δ 22). Ambas construcciones fueron exitosamente generadas, demostrado por diferentes estrategias, mediante secuenciación, mediante la verificación del tamaño del vector e inserto (**Figura 13A**) y mediante la transfección de los plásmidos en células HeLa se pudo verificar la expresión de ambas proteínas de fusión y con el tamaño molecular esperado (**Figura 15**), su localización subcelular y su capacidad para inhibir la formación de SG, previamente descrita para ambas versiones (**Figura 16**).

Al evaluar los niveles de expresión mediante *Western Blot* se observó que la proteína GFP-Tax Δ 22 tiene menores niveles de expresión en comparación con su versión WT (**Figura 15**). Por otro lado, al observar las microscopías y analizar el fenotipo obtenido se valida lo visto previamente donde GFP-Tax Δ 22 co-localiza con los SG (Legros et al., 2011) (**Figura 16C, flecha blanca**) y además se observó que hay focos de esta proteína en el perímetro de las células transfectadas pero también en células vecinas que no son GFP-Tax Δ 22 positivas pero sí que están vecinas a ellas (**Figura 17, flecha blanca**). Sin embargo, aún falta evidencia experimental para poder evaluar si es que estos agregados extracelulares corresponderían a vesículas celulares cargadas con GFP-Tax Δ 22, fenómeno no descrito previamente con esta mutante y que sugiere que la región N-terminal, en específico los 22 primeros aminoácidos de la proteína viral Tax, interaccionarían con otros factores celulares que regulan los mecanismos de secreción. De esta forma, al perder esta sección de la proteína se desregula esta función y se libera esta proteína a nivel extracelular, lo cual se condice con lo observado en la **Figura 15** donde hay un menor nivel de expresión dado que

se estaría liberando al medio extracelular. Cabe destacar que se ha descrito previamente una secreción activa de Tax a partir de los linfocitos T infectados con HTLV-1 de pacientes HAM/TSP y portadores asintomáticos (Medina et al., 2014). También se ha demostrado la capacidad *in vitro* de la proteína Tax extracelular para producir retracción de neuritas en cultivos neuronales (Medina et al., 2014). También se ha descrito que Tax extracelular tiene la capacidad de interactuar con la semaforina SEMA-4D secretada a partir de linfocitos T de HAM/TSP y portadores asintomáticos. Esta interacción afecta la vía de señalización SEMA-4D-Plexin-B1 que es clave para el crecimiento de neuritas en cultivos celulares *in vitro* (Medina et al., 2016). Estos hallazgos descritos han permitido sugerir una relación patogénica de Tax extracelular que participa como citoquina afectando a otras células del sistema inmune o nervioso. Sin embargo, los mecanismos que pudieran estar involucrados son aún desconocidos, lo cual se tiene como proyección el enfocarse en la región N-terminal de la proteína viral Tax para poder dilucidarlos y entender cómo está regulada la secreción de Tax con un enfoque clínico. Además, de poder buscar otras regiones o dominios de Tax que podrían estar involucrados en su reclutamiento de los SG, tal como las modificaciones post traduccionales, las cuales se han visto que han estado implicadas en la regulación de la localización subcelular de Tax (Carrer et al., 2012). Dado lo anterior, se valida la generación de estas versiones de la proteína viral Tax de HTLV-1, dando a lugar a una herramienta biotecnológica con potencial distribución para que se amplie la investigación sobre Tax y su rol patogénico en HTLV-1.

7. Conclusiones

Se concluye a partir de esta Memoria de Título lo siguiente:

- Las versiones de la proteína viral Tax WT y $\Delta 22$ fusionada con GFP fueron generadas con éxito, y se expresan en células HeLa.
- Las construcciones generadas cumplen con las funciones previamente descritas propias de la proteína viral, como es la formación focos discretos en el núcleo (TSS) y en el citoplasma, además de la inhibición de la formación de gránulos de estrés para la versión WT.
- En un contexto de estrés celular, se evidenció que GFP-Tax $\Delta 22$ co-localiza con los gránulos de estrés, tal como se ha descrito. Además, esta mutante presenta un fenotipo en la cual hay focos discretos a nivel extracelular, lo que lleva a enfocarse en esta región para dilucidar un mecanismo molecular para la secreción de Tax.

8. Bibliografía

Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E. W., Grant, C., & Wigdahl, B. (2003). Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21814-21822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211576200>

Alefantis, T., Jain, P., Ahuja, J., Mostoller, K., & Wigdahl, B. (2005). HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *Journal of Biomedical Science*, 12(6), 961-974. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9026-x>

Anderson, P., & Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 16), 3227-3234. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.16.3227>

Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: The Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.003>

Baltimore, D. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*, 226(5252), 1209-1211. <https://doi.org/10.1038/2261209a0>

Bangham, C. R. M., Miura, M., Kulkarni, A., & Matsuoka, M. (2019). Regulation of Latency in the Human T Cell Leukemia Virus, HTLV-1. *Annual Review of Virology*, 6(1), 365-385. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015501>

Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P., & Bangham, C. R. M. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood*, 106(3), 988-995. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2850>

Bartholomew, C., Jack, N., Edwards, J., Charles, W., Corbin, D., Cleghorn, F. R., & Blattner, W. A. (1998). HTLV-I serostatus of mothers of patients with adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of Human Virology*, 1(4), 302-305.

Béraud, C., Sun, S. C., Ganchi, P., Ballard, D. W., & Greene, W. C. (1994). Human T-cell leukemia virus type I Tax associates with and is negatively regulated by the NF-kappa B2 p100 gene product: Implications for viral latency. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(2), 1374-1382. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1374-1382.1994>

Bex, F., McDowall, A., Burny, A., & Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *Journal of Virology*, *71*(5), 3484-3497.

Bex, F., Yin, M.-J., Burny, A., & Gaynor, R. B. (1998). Differential Transcriptional Activation by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Mutants Is Mediated by Distinct Interactions with CREB Binding Protein and p300. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(4), 2392-2405.

Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., & Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*, *5*, 76. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-76>

Burton, M., Upadhyaya, C. D., Maier, B., Hope, T. J., & Semmes, O. J. (2000). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *Journal of Virology*, *74*(5), 2351-2364. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2351-2364.2000>

Butsch, M., & Boris-Lawrie, K. (2002). Destiny of Unspliced Retroviral RNA: Ribosome and/or Virion? *Journal of Virology*, *76*(7), 3089-3094. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.7.3089-3094.2002>

Carneiro-Proietti, A. B. F., Amaranto-Damasio, M. S., Leal-Horiguchi, C. F., Bastos, R. H. C., Seabra-Freitas, G., Borowiak, D. R., Ribeiro, M. A., Proietti, F. A., Ferreira, A. S. D., & Martins, M. L. (2014). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, *3 Suppl 1*(Suppl 1), S24-29. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu070>

Caron, C., Rousset, R., Béraud, C., Moncollin, V., Egly, J. M., & Jalinot, P. (1993). Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *The EMBO Journal*, *12*(11), 4269-4278. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06111.x>

Cartier, Ramírez, & Valenzuela. (2017). *Biología, clínica y patología de las infecciones por HTLV-1* (Ediciones de la sociedad de neurología, psiquiatría y neurocirugía de Chile).

Chevalier, S. A., Meertens, L., Calattini, S., Gessain, A., Kiemer, L., & Mahieux, R. (2005). Presence of a functional but dispensable Nuclear Export Signal in the HTLV-2 Tax protein. *Retrovirology*, 2(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-70>

Ching, Y.-P., Chun, A. C. S., Chin, K.-T., Zhang, Z.-Q., Jeang, K.-T., & Jin, D.-Y. (2004). Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology*, 1, 18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-18>

Chu, Z. L., DiDonato, J. A., Hawiger, J., & Ballard, D. W. (1998). The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates I κ B kinases containing IKK α and IKK β . *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 15891-15894. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15891>

Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., & Kashanchi, F. (2012). HTLV tax: A fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Frontiers in Microbiology*, 3, 406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00406>

de Thé, G., & Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: Why, how, for whom? *AIDS Research and Human Retroviruses*, 9(5), 381-386. <https://doi.org/10.1089/aid.1993.9.381>

Doherty, A. J., & Suh, S. W. (2000). Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4051-4058.

Durkin, S. S., Guo, X., Fryrear, K. A., Mihaylova, V. T., Gupta, S. K., Belgnaoui, S. M., Haoudi, A., Kupfer, G. M., & Semmes, O. J. (2008). HTLV-1 Tax Oncoprotein Subverts the Cellular DNA Damage Response via Binding to DNA-dependent Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36311-36320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804931200>

Eastberg, J. H., Pelletier, J., & Stoddard, B. L. (2004). Recognition of DNA substrates by T4 bacteriophage polynucleotide kinase. *Nucleic Acids Research*, 32(2), 653-660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh212>

Fan, N., Gavalchin, J., Paul, B., Wells, K. H., Lane, M. J., & Poiesz, B. J. (1992). Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4), 905-910. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.4.905-910.1992>

Fryrear, K. A., Durkin, S. S., Gupta, S. K., Tiedebohl, J. B., & Semmes, O. J. (2009). Dimerization and a Novel Tax Speckled Structure Localization Signal Are Required for Tax Nuclear Localization. *Journal of Virology*, 83(11), 5339-5352. <https://doi.org/10.1128/JVI.00232-09>

Gessain, A., & Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology*, 3, 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>

Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P. M., Heveker, N., Pique, C., & Hermine, O. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of Virology*, 80(14), 6844-6854. <https://doi.org/10.1128/JVI.02719-05>

Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., & Anderson, P. (2004). Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5383-5398. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-08-0715>

Gitlin, S. D., Lindholm, P. F., Marriott, S. J., & Brady, J. N. (1991). Transdominant human T-cell lymphotropic virus type I TAX1 mutant that fails to localize to the nucleus. *Journal of Virology*, 65(5), 2612-2621.

Gonçalves, D. U., Proietti, F. A., Ribas, J. G. R., Araújo, M. G., Pinheiro, S. R., Guedes, A. C., & Carneiro-Proietti, A. B. F. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 577-589. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-09>

Green, P. L., & Chen, I. S. (1990). Regulation of human T cell leukemia virus expression. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(2), 169-175. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.2.2404818>

Gupta, S. K., Guo, X., Durkin, S. S., Fryrear, K. F., Ward, M. D., & Semmes, O. J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein prevents DNA damage-induced chromatin egress of hyperphosphorylated Chk2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29431-29440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704110200>

Haoudi, A., Daniels, R. C., Wong, E., Kupfer, G., & Semmes, O. J. (2003). Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37736-37744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301649200>

Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22911-22914. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22911>

Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M., & Seiki, M. (1988). Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *The EMBO Journal*, 7(2), 519-523. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02840.x>

Ho, D. D., Rota, T. R., & Hirsch, M. S. (1984). Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23), 7588-7590. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.23.7588>

Human T-cell leukemia virus type I ~ ViralZone. (s. f.). Recuperado 1 de julio de 2024, de https://viralzone.expasy.org/60?outline=all_by_species

Human T-lymphotropic virus type 1: Technical report. (s. f.). Recuperado 30 de junio de 2024, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240020221>

Itabashi, K., Miyazawa, T., & Uchimar, K. (2023). How Can We Prevent Mother-to-Child Transmission of HTLV-1? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6961. <https://doi.org/10.3390/ijms24086961>

Jeang, K. T., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M., & Khoury, G. (1988). Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *Journal of Virology*, 62(12), 4499-4509. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.12.4499-4509.1988>

Jin, D. Y., Giordano, V., Kibler, K. V., Nakano, H., & Jeang, K. T. (1999). Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17402-17405. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17402>

Jin, D. Y., & Jeang, K. T. (1997). HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Research*, 25(2), 379-387.

Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., & Ruscetti, F. W. (2005). Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of Virology*, 79(20), 12692-12702. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005>

Kashanchi, F., & Brady, J. N. (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene*, 24(39), 5938-5951. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208973>

Kfoury, Y., Nasr, R., Journo, C., Mahieux, R., Pique, C., & Bazarbachi, A. (2012). The multifaceted oncoprotein Tax: Subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-kB activation. *Advances in Cancer Research*, 113, 85-120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394280-7.00003-8>

Konvalinka, J., Kräusslich, H.-G., & Müller, B. (2015). Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology*, 479-480, 403-417. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.021>

Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., &

Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 196(1), 25-33. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1451>

Kwon, S., Zhang, Y., & Matthias, P. (2007). The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes & Development*, 21(24), 3381-3394. <https://doi.org/10.1101/gad.461107>

Lairmore, M. D., Anupam, R., Bowden, N., Haines, R., Haynes, R. A. H., Ratner, L., & Green, P. L. (2011). Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. *Viruses*, 3(7), 1131-1165. <https://doi.org/10.3390/v3071131>

Le Blanc, I., Grange, M. P., Delamarre, L., Rosenberg, A. R., Blot, V., Pique, C., & Dokh elar, M. C. (2001). HTLV-1 structural proteins. *Virus Research*, 78(1-2), 5-16. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00278-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00278-7)

Legros, S., Boxus, M., Gatot, J. S., Van Lint, C., Kruys, V., Kettmann, R., Twizere, J. C., & Dequiedt, F. (2011). The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene*, 30(38), 4050-4062. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.120>

Lingwood, D., Kaiser, H.-J., Levental, I., & Simons, K. (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 5), 955-960. <https://doi.org/10.1042/BST0370955>

Longo, D. L., Gelmann, E. P., Cossman, J., Young, R. A., Gallo, R. C., O'Brien, S. J., & Matis, L. A. (1984). Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. *Nature*, 310(5977), 505-506. <https://doi.org/10.1038/310505a0>

Mahieux, R., & Gessain, A. (2007). Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2(4), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s11899-007-0035-x>

Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G. P., Fuller, S. D., & Bangham, C. R.

M. (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PloS One*, 3(5), e2251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002251>

Manel, N., Kim, F. J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., & Battini, J.-L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*, 115(4), 449-459. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00881-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00881-x)

Martin, J. L., Maldonado, J. O., Mueller, J. D., Zhang, W., & Mansky, L. M. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses*, 8(2), 31. <https://doi.org/10.3390/v8020031>

Martinez, M. P., Al-Saleem, J., & Green, P. L. (2019). Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, 16(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0483-0>

Matsuoka, M., & Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 270-280. <https://doi.org/10.1038/nrc2111>

Medina, F., Quintremil, S., Alberti, C., Barriga, A., Cartier, L., Puente, J., Ramírez, E., Ferreira, A., Tanaka, Y., & Valenzuela, M. A. (2014). Tax posttranslational modifications and interaction with calreticulin in MT-2 cells and human peripheral blood mononuclear cells of human T cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30(4), 370-379. <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0036>

Medina, F., Quintremil, S., Alberti, C., Godoy, F., Pando, M. E., Bustamante, A., Barriga, A., Cartier, L., Puente, J., Tanaka, Y., Valenzuela, M. A., & Ramírez, E. (2016). Tax secretion from peripheral blood mononuclear cells and tax detection in plasma of patients with human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic carriers. *Journal of Medical Virology*, 88(3), 521-531. <https://doi.org/10.1002/jmv.24342>

Mueller, N. (1991). The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes & Control: CCC*, 2(1), 37-52. <https://doi.org/10.1007/BF00052359>

Murphy, E. L. (2016). Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, 23(1), 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2015.12.001>

Nyambi, P. N., Ville, Y., Louwagie, J., Bedjabaga, I., Glowaczower, E., Peeters, M., Kerouedan, D., Dazza, M.-C., Larouzé, B., van der Groen, G., & Delaporte, E. (1996). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II (HTLV-I/II) in Gabon: A Prospective Follow-up of 4 Years. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 12(2), 187.

Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., & Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet (London, England)*, 1(8488), 1031-1032. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91298-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91298-5)

Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., & Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature Medicine*, 16(1), 83-89. <https://doi.org/10.1038/nm.2065>

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Reitz, M. S., Kalyanaraman, V. S., & Gallo, R. C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature*, 294(5838), 268-271. <https://doi.org/10.1038/294268a0>

Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B. F., Catalan-Soares, B. C., & Murphy, E. L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, 24(39), 6058-6068. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208968>

Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F., & Jalinot, P. (1998). The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene*, 16(5), 643-654. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201567>

Saito, M., & Bangham, C. R. M. (2012). Immunopathogenesis of human T-cell leukemia virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Recent perspectives.

Leukemia Research and Treatment, 2012, 259045. <https://doi.org/10.1155/2012/259045>

San Martín, H., Balanda, M., Vergara, N., Valenzuela, M. A., Cartier, L., Ayala, S., & Ramírez, E. (2016). Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and 2 Seroprevalence among first-time blood donors in Chile, 2011-2013. *Journal of Medical Virology*, 88(6), 1067-1075. <https://doi.org/10.1002/jmv.24428>

Satake, M., Yamaguchi, K., & Tadokoro, K. (2012). Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *Journal of Medical Virology*, 84(2), 327-335. <https://doi.org/10.1002/jmv.23181>

Schierhout, G., McGregor, S., Gessain, A., Einsiedel, L., Martinello, M., & Kaldor, J. (2020). Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(1), 133-143. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30402-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30402-5)

Semmes, O. J., & Jeang, K. T. (1992). Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: Regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *Journal of Virology*, 66(12), 7183-7192.

Semmes, O. J., & Jeang, K. T. (1996). Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *Journal of Virology*, 70(9), 6347-6357. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.6347-6357.1996>

Takahashi, K., Takezaki, T., Oki, T., Kawakami, K., Yashiki, S., Fujiyoshi, T., Usuku, K., Mueller, N., Osame, M., & Miyata, K. (1991). Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. The Mother-to-Child Transmission Study Group. *International Journal of Cancer*, 49(5), 673-677. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910490508>

Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Matsuki, H., Yoshita, M., Tanaka, Y., & Fujii, M. (2013). HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood*, 122(5), 715-725. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-493718>

Tie, F., Adya, N., Greene, W. C., & Giam, C. Z. (1996). Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. *Journal of Virology*, 70(12), 8368-8374.

Tsubata, C., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., & Fujii, M. (2005). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line. *Retrovirology*, 2, 46. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-46>

Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., & Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48), 20738-20743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009635107>

Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., & Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: Recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(4), 266-281. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70081-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70081-6)

Willems, L., Hasegawa, H., Accolla, R., Bangham, C., Bazarbachi, A., Bertazzoni, U., Carneiro-Proietti, A. B. de F., Cheng, H., Chieco-Bianchi, L., Ciminale, V., Coelho-Dos-Reis, J., Esparza, J., Gallo, R. C., Gessain, A., Gotuzzo, E., Hall, W., Harford, J., Hermine, O., Jacobson, S., ... Yamano, Y. (2017). Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Research*, 137, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.015>

Xie, L., Yamamoto, B., Haoudi, A., Semmes, O. J., & Green, P. L. (2006). PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood*, 107(5), 1980-1988. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1333>

Yamamoto, N., Matsumoto, T., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., & Hinuma, Y. (1982). Unique cell lines harbouring both Epstein-Barr virus and adult T-cell leukaemia virus, established from leukaemia patients. *Nature*, 299(5881), 367-369. <https://doi.org/10.1038/299367a0>

Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R. M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., Yang, Z., Wu, J., Li, Y., Pan, Q., Yu, J., Martin, E. W., Mittag, T., Kim, H. J., & Taylor, J. P. (2020). G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules. *Cell*, *181*(2), 325-345.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>

Yoshida, M., Miyoshi, I., & Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(6), 2031-2035. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2031>

Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K., & Takatsuki, K. (1984). Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(8), 2534-2537. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.8.2534>

Yoshikura, H., Nishida, J., Yoshida, M., Kitamura, Y., Takaku, F., & Ikeda, S. (1984). Isolation of HTLV derived from Japanese adult T-cell leukemia patients in human diploid fibroblast strain IMR90 and the biological characters of the infected cells. *International Journal of Cancer*, *33*(6), 745-749. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910330606>

Zhang, W., Cao, S., Martin, J. L., Mueller, J. D., & Mansky, L. M. (2015). Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS biophysics*, *2*(3), 343-369. <https://doi.org/10.3934/biophy.2015.3.343>