



Pontificia Universidad
Católica de Chile

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**“LA RIBONUCLEOPROTEÍNA HETEROGÉNEA NUCLEAR K
(hnRNP K) ES UN FACTOR QUE ACTUA EN TRANS (ITAF)
SOBRE LOS SITIOS INTERNOS DE ENTRADA AL
RIBOSOMA (IRESeS) DE HIV-1, HTLV-1 Y MMTV”**

POR

VALERIA ALEJANDRA OLGUIN ARANEDA

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la pontificia Universidad Católica de
Chile para optar a grado académico de Doctor en Ciencias Médicas

Profesor Guía:

Dr. Marcelo López-Lastra

Enero 2020

Santiago, Chile

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Dirección de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

“LA RIBONUCLEOPROTEÍNA HETEROGÉNEA NUCLEAR K (hNRNP K) ES UN FACTOR QUE ACTUA EN TRANS SOBRE LOS SITIOS INTERNOS DE ENTRADA AL RIBOSOMA (IRESES) DE HIV-1, HTLV-1 Y MMTV”

Aprobación Defensa Pública:

SRTA. VALERIA ALEJANDRA OLGUÍN ARANEDA

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota

(.....)

Dr. Mauricio Cuello
Director de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Felipe Heusser
Decano
Facultad de Medicina, PUC

Dra. Andrea Leiva
Sub-Jefe
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Jorge Carvajal
Jefe
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Marcelo López-Lastra
Director de Tesis
Escuela de Medicina, PUC.

Dr. Ricardo Soto-Rifo
Profesor Evaluador Externo
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Rafael Medina
Profesor Evaluador Interno
Escuela de Medicina

Santiago, 15 de enero de 2020

“Gracias por su amor incondicional, esto es para ustedes; mi familia”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a Dios por dar propósito a todo lo que emprendo, por otorgarme, salud, amor y fuerza.

Quisiera agradecer a mi familia, a mi padres; Julio y “Michi”. A ti papito, me toca agradecerte hacia el cielo, por supuesto que quisiera compartir todos mis logros contigo pero tu legado si está en mí. Gracias mamá por tu amor que desborda, tu apoyo incondicional, tu esfuerzo admirable. A mis hermanas; Ivette, Andrea, Natalia y mis sobrinos bellos. Con ustedes todo se disfruta más, gracias por los momentos de alegrías, consejos, consuelos. Esto también es de ustedes.

A Jonathan, por tu comprensión, detalles, paciencia y barra constante. Gracias amor, a ti también debo gran parte de este trabajo.

Me gustaría agradecer al Dr. López, por la posibilidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza y todas las herramientas entregadas, por su paciencia y dedicación en las correcciones de mis presentaciones, de mis escritos y por encaminar mi trabajo. Gracias por todo el apoyo profesional durante mi estadía en el laboratorio.

Quisiera agradecer a los miembros y ex miembros del laboratorio de Virología Molecular por los gratos momentos, por su calidad como personas y profesionales, fue un gusto compartir este tiempo con ustedes y les deseo el mayor de los éxitos en sus caminos profesionales.

Al respecto, agradezco especialmente a quienes dedicaron esfuerzos en corregir mis unidades, proyecto de tesis, avances y escritos finales, gracias Aldo Barrera, Jennifer Angulo, Joaquín Cáceres y Jorge Vera. Agradezco también a Karlita, por su apoyo y paciencia con todas las molestias del día a día, por su buena disposición, amabilidad y profesionalismo en su trabajo.

También quiero agradecer a mis amistades, quienes son una parte importante de mi vida, hace muchos años ya y lo fueron también durante este proceso; a la nona, la Mayo, la Clau, La Nati. Así como también a mis compañeros de doctorado con quienes compartí tantos buenos momentos, el tiempo pasa tan rápido y hoy cada uno está embarcándose en una nueva etapa. Se merecen lo mejor para sus vidas, éxito chicos!

Finalmente, gracias a CONICYT (Beca doctorado nacional 21150955, convocatoria 2015), quien me otorgó financiamiento para la realización de mi doctorado, así como financiamiento para asistencias a congresos y gastos de operación.

INDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos.....	2
Lista de figuras.....	6
Abreviaturas	8
Resumen	12
Abstract	15
Introducción.....	17
Inicio de la traducción en eucariontes	17
Inicio de la traducción dependiente de sitios internos de entrada al ribosoma.	19
Ciclo replicativo retroviral.....	23
Inicio de la traducción del mRNA genómico retroviral	26
Factores que actúan en “trans” sobre IRES.....	27
Hipótesis	33

Objetivo General.....	34
Objetivos específicos	35
Materiales y métodos	36
Cultivo celular.....	36
Vectores.....	37
Extractos Celulares: Localización de la proteína hnRNP K.....	37
Inmunofluorescencia indirecta	39
Transecciones siRNAs y co-transecciones si-RNAs/DNA	40
Transecciones de DNA	41
Ensayos de Luciferasa	42
Ensayos de unión: crosslinking e inmunoprecipitación (UV-CLIP).....	42
Ensayos de Coimmunoprecipitación (CO-IP).....	43
Ensayos de ligación por proximidad (PLA)	45

Detección de proteínas mediante western blot.....	45
Análisis Estadístico.....	47
Resultados	48
Localización de la proteína hnRNP K endógena en células	48
Localización de la proteína hnRNP K endógena en células donde HIV-1 replica	50
El silenciamiento de la expresión de hnRNP K endógena afecta la traducción de Gag en un clon molecular de HIV-1.....	52
La proteína hnRNP K se une a la región 5'UTR de HIV-1 en células HEK293T.....	54
El silenciamiento de la expresión de hnRNP K impacta negativamente sobre la actividad del IRES de HIV-1.....	52
La sobreexpresión de hnRNP K estimula el inicio de la traducción IRES dependiente de HIV-1	56
La expresión de hnRNP K no afecta la actividad de promotor críptico o de <i>splicing</i> alternativo sobre el dl HIV-1	62

El silenciamiento de la expresión de hnRNP K impacta negativamente sobre la actividad del IRES de HTLV-1 y de MMTV	65
La sobreexpresión de hnRNP K estimula el inicio de la traducción IRES dependiente de HTLV-1 y MMTV.	69
La co-expresión de hnRNP K con otros ITAFs de HIV-1 impacta positivamente sobre la actividad IRES de HIV-1.	71
La co-expresión de hnRNP K con otros ITAFs impacta positivamente sobre la actividad IRES de HTLV-1 y MMTV.	75
la Proteína HuR interfiere con la modulación positiva de hnRNP K sobre la traducción mediada por el IRES de HIV-1	78
Interacción de hnRNP K con hnRNPA1, hnRNP U y HuR en células HEK293T.....	82
Discusión.....	89
Conclusiones	100
Referencias	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de un mensajero bicistrónico..	21
Figura 2: Esquema de las etapas del ciclo replicativo retroviral.....	25
Figura 3: Localización celular hnRNP K en diferentes líneas celulares... ..	49
Figura 4: Localización subcelular de hnRNP K durante la replicación de HIV-1	51
Figura 5: Silenciamiento de la expresión de hnRNP K afecta la traducción del clon molecular de HIV-1.....	53
Figura 6: La proteína hnRNP K interactúa con la región 5'UTR de HIV-1 en células HEK293T... ..	55
Figura 7: El inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1 requiere de la proteína hnRNP K... ..	58
Figura 8: La sobreexpresión de hnRNP K estimula la actividad del IRES de HIV-1.....	60
Figura 9: La expresión de hnRNP K no induce actividad de promotor críptico o de <i>splicing</i> alternativo en dHIV-1-IRES. ..	64
Figura 10: El inicio de la traducción IRES-dependiente de HTLV-1 requiere de la proteína hnRNP K.	66
Figura 11: El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína hnRNP K... ..	67

Figura 12: La sobreexpresión de hnRNP K estimula la actividad de los elementos IRESes de HTLV-1 y MMTV.	70
Figura 13: La coexpresión de hnRNP K, A1 y U estimula la actividad IRES de HIV-1.....	73
Figura 14: La coexpresión de hnRNP K, A1 y U estimula la actividad IRES de HTLV-1 y MMTV..	77
Figura 15: HuR inhibe la actividad estimuladora de hnRNP K sobre el IRES de HIV-1 en células HEK293T.	80
Figura 16: hnRNP K interactúa con hnRNP A1 en células HEK293T	83
Figura 17: hnRNP K interactúa con hnRNP U en células HEK293T.....	85
Figura 18: hnRNP K interactúa con HuR en células HEK293T	86
Figura 19: Modelo propuesto. Proteínas de unión a RNA asisten a mRNAs retrovirales permitiendo la conformación de un IRES funcional.	95

ABREVIATURAS

4E-BPs: Proteínas de unión a eIF4E

5'UTR: Región 5' no traducida

ATP: Adenosina trifosfato

Cap: 7 metilguanosina

CCR5: Receptor 5 de quimioquinas de tipo CC

CXCR4: Receptor 4 de quimioquinas de tipo CXC

DDX3: Polipéptido 3 caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)

dl: Vector dual luciferasa

DMEM: Medio *Eagle* modificado por *Dulbecco*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAsa: Desoxirribonucleasa

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eIF: Factor de inicio de la traducción eucarionte

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis

FLuc: Luciferasa de luciérnaga

gRNA: RNA genómico

HEK293T: Células embrionarias de riñón humano

HeLa: Células desde cáncer cervico-uterino humano

HIV-1: Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

HLV-1: Virus de la leucemia de linfocitos t humano de tipo 1

hnRNP: Ribonucleoproteína nuclear humana

HuR: Proteína tipo ELAV (visión anormal letal embrionario) humana

IN: Integrasa

IRES: Sitio interno de entrada del ribosoma

ITAF: Factor transactivador de IRES

kDa: Kilo daltons

LTR: Repetición terminal larga (*Long terminal repeat*)

MMTV: Virus del tumor mamario murino

mRNA: RNA mensajero

NP-40: Nonidet P-40

PBS 1X : Tampón boro fosfato 1X

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PR: Proteasa

PTB: Proteína de unión al tracto de polipirimidinas

PV: Virus Polio

RLA: Actividad luferasa relativa

RLuc: Luciferasa de *Renilla*

RNA pol II: RNA polimerasa II

RNA: Ácido ribonucleico

RNAsa: Ribonucleasa

RNP: Complejo ribonucleoproteico

RRL: Lisado de reticulocitos de conejo

RRM: Motivo de reconocimiento de RNA

RT: Retrotranscriptasa

RTA: Actividad traduccional relativa

SC: Silenciador negativo o *scramble*

siRNA: RNA interferente

SFB: Suero fetal bovino

Splicing: Procesamiento de corte y empalme del mRNA

TBS: Buffer tris salino

tRNAi: RNA de transferencia iniciador

Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano Clorhidrato

UV-CLIP: UV crosslinking e inmunoprecipitación

Δ EMCV: Región 5'UTR del virus de la encefalomiocarditis sin actividad IRES

RESUMEN

Los RNAs genómicos (gRNAs) de los retrovirus poseen sitios internos de entrada al ribosoma (IRESes) en su región 5' UTR que promueven el inicio de la traducción cap-independiente. En la actualidad, se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales los IRESes retrovirales reclutan la maquinaria traduccional del hospedero. No obstante, existe evidencia reportada que sugiere que la actividad IRES es regulada por factores celulares, denominados de manera genérica factores que actúan en trans sobre IRES (ITAFs). La proteína ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hnRNP K) ha sido identificada como una proteína de unión a la región 5'UTR de HIV-1. La localización celular de hnRNP K es preferentemente nuclear, sin embargo, la proteína se deslocaliza desde el núcleo al citoplasma durante la replicación de HIV-1. Esta observación sugiere que hnRNP K podría ejercer un rol citoplasmático durante la replicación de HIV-1. Con el fin de establecer un posible rol de hnRNP K en la traducción de algunos gRNAs retrovirales, se procedió a confirmar mediante un ensayo de UV-CLIP/q-RT-PCR la interacción entre la región 5' UTR de los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV con hnRNP K. Posteriormente, se evaluó el rol de hnRNP K en el inicio de la traducción mediada por los elementos IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Nuestros resultados muestran que el

silenciamiento parcial de hnRNP K tiene un impacto negativo sobre el inicio de la traducción mediado por los IRESes de HIV-1, HTLV-1 Y MMTV. En acuerdo con estos resultados, la sobreexpresión de hnRNP K estimula la actividad de los IRESes estudiados. Esta actividad estimuladora incrementada aún más al expresar hnRNP K en asociación con otros ITAFs ya descritos para IRESes retrovirales como son hnRNP A1 y hnRNP U. Esta observación sugiere la formación de complejos ribonucleoproteicos (RNPs) entre estas proteínas y el mRNA viral. Se procedió a evaluar el impacto de HuR, un inhibidor de la actividad del IRES de HIV-1, cuando expresado en combinación con hnRNP K. Los resultados muestran que HuR inhibe el efecto estimulador de hnRNP K sobre la actividad de los IRESes de HIV-1 y HTLV-1, pero no de MMTV. Resultados de ensayos de co-inmunoprecipitación y de ligación por proximidad (PLA) no cuantitativa indican que la proteína hnRNP K interactúa con hnRNP A1, hnRNP U y HuR. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren el rol de hnRNP K como un ITAF para los elementos IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Así también, se valida a hnRNP A1 como activador de la traducción mediada por los IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Adicionalmente, los resultados de este trabajo apoyan un modelo en el cual, proteínas nucleares forman complejos proteicos, que interactúan con los mRNAs virales, siendo deslocalizados hacia el citoplasma para modular la traducción IRES dependiente de los gRNAs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. El conocimiento ganado en este

trabajo otorga un mayor entendimiento del proceso de iniciación de la traducción mediado por los elementos IRESes de mRNAs retrovirales, y a largo alcance, este conocimiento podría ser útil en el desarrollo de nuevas estrategias antivirales dirigidas específicamente a la traducción del mRNA retroviral.

ABSTRACT

The genomic RNAs (gRNAs) of many retroviruses harbor internal ribosome entry sites (IRESs) within their 5' UTR. These retroviral IRESs promote cap-independent translation initiation. At present, the molecular mechanisms through which retroviral IRESs recruit the hosts' translation machinery remain unknown. However, previously published results indicate that IRES activity is regulated by cellular factors, generically referred to as IRES transacting factors (ITAFs). The hnRNP K was previously described as an RNA binding protein that interacts with the 5' UTR of the HIV-1 gRNA. Our results shows that this protein, that normally exhibits a nuclear localization, is delocalized from the nucleus to the cytoplasm during the replication of HIV-1. This observation suggests that hnRNP K may have a cytoplasmic role during HIV-1 replication. The interaction between the 5' UTR of the genomic mRNAs of HIV-1, HTLV-1 and MMTV, and hnRNP K was confirmed by a UV-CLIP / RT-qPCR assay. Later, the role of hnRNP K as a modulator of IRES mediated translation initiation was evaluated. Our results shows that the partial silencing of hnRNP K negatively impacts on IRES-mediated translation initiation of the HIV-1, HTLV-1 and MMTV IRESs. In agreement with these results, the overexpression of hnRNP K stimulates the activity of the studied IRES elements. This stimulatory activity of hnRNP K is further increases when the

protein is expressed in association with other known ITAFs for retroviral IRESs, such as hnRNP A1 and hnRNP U. When hnRNP K was co-expressed with HuR, an inhibitor of the IRES activity of HIV-1, we observed that HuR inhibits the stimulatory effect of hnRNP K over the IRES activity of HIV-1 and HTLV-1, but not MMTV. Results of co-immunoprecipitation assays and Proximity Ligation Assay (PLA) confirm that the hnRNP K protein interacts with hnRNP A1, hnRNP U, and HuR. The results obtained in this thesis identify hnRNP K as an ITAF for the HIV-1, HTLV-1, and MMTV IRESs. Likewise, hnRNPA1 is validated as an activator of the HIV-1, HTLV-1 and MMTV IRESs. Further, the results of this work support a model in which nuclear proteins interact with IRESs forming RNPs that delocalize towards the cytoplasm to modulate IRES-dependent translation of HIV-1, HTLV-1 and MMTV gRNAs. The knowledge gained in this work gives a greater understanding about the mechanism of ribosomal recruitment mediated by the IRESs elements of retroviral mRNAs, and in the long term, this knowledge could prove useful in the development of new antiviral strategies specifically aimed at the translation of retroviral mRNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inicio de la traducción en eucariontes.

En eucariontes el proceso de traducción del RNA mensajero (mRNA) se puede dividir en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. De estas, la etapa de la iniciación corresponde a la más regulada y es considerada como la etapa limitante del proceso [1]. El inicio canónico de la síntesis de proteínas requiere del reconocimiento de la estructura 5'cap (m^7GpppG), modificación presente en todos los mRNAs eucarióticos, por parte de factores eucarióticos de inicio (eIF) que conforman el complejo eIF4F [2,3]. Este complejo es constituido por los factores de inicio eIF4E,

eIF4A, y eIF4G [2,3]. La proteína eIF4E reconoce y se une a la estructura 5'cap, siendo por tanto, indispensable para el inicio de la traducción cap-dependiente o canónico. La proteína eIF4A es una helicasa dependiente de ATP miembro de la familia DEA(D/H)-box que participa en la desestructuración de la región 5'no traducida (5'UTR) del mRNA, mientras que factor eIF4G actúa como proteína de andamio sobre la cual se estructura el complejo de iniciación. eIF4G cuenta con dos sitios de unión a eIF4A, un sitio de unión a eIF4E, un sitio de unión a eIF3 y un sitio de unión a la proteína de unión a la cola poly(A) del mRNA, PABP [56,57]. La proteína eIF4G participa en el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal al mRNA, actuando como una proteína de andamio asociándose a la subunidad 40S ribosomal por interacción con eIF3, y al mRNA vía interacción con eIF4E [2]. La interacción 5'cap-eIF4E-eIF4G-PABP-Poly(A) media la circularización del mRNA, incrementando su eficiencia traduccional [24,25,58]. La subunidad ribosomal 40S es reclutada como parte del complejo de iniciación 43S, que se constituye del complejo ternario eIF2-GTP/Met-tRNA_i, eIF1, eIF1A, y eIF3. El factor eIF1A promueve la unión del complejo 43S al mRNA. Luego de posicionarse en el extremo 5' del mensajero, la subunidad 40S ribosomal se desplaza en sentido 5'a 3' del mRNA en un proceso denominado "*scanning*", hasta encontrar el codón de inicio [4]. El factor eIF1 es necesario para el reconocimiento del codón de inicio que normalmente corresponde al primer AUG en el contexto (G/AXXAAUGG,

donde X es cualquier nucleótido [3,4]), formando así el complejo de iniciación 48S, el cual se encuentra posicionado sobre el codón de inicio. La interacción codon-anticodón entre el AUG y el Met-tRNA_i permite la liberación de eIF1 y además se induce la hidrólisis de eIF2-GTP catalizada por eIF5, liberando así eIF2-GDP del complejo 48S. Luego, el factor eIF5B media el reclutamiento de la subunidad 60S, resultando en la formación de un ribosoma 80S competente para la traducción en el cual el tRNA iniciador (Met-tRNA_i) se encuentra posicionado en el sitio peptidil (P) del ribosoma, terminando así la etapa de iniciación y dando paso a la etapa de elongación [4-6].

1.2 Inicio de la traducción dependiente de sitios internos de entrada al ribosoma.

De forma alternativa al inicio de la traducción canónico, algunos mRNAs virales y celulares pueden iniciar su traducción utilizando un mecanismo mediado por elementos de RNA que son capaces de reclutar la subunidad ribosomal 40S de manera independiente de los extremos del mRNA; la estructura 5'cap y la cola 3'poli(A) [5], denominados sitios internos de entrada al ribosoma (IRESes) [7]. Los elementos IRESes fueron descritos inicialmente en el estudio de mRNAs virales de la familia

Picornaviridae, los cuales carecen de la modificación 5'cap [14]. Estos estudios llevaron a la caracterización funcional y estructural de los primeros elementos IRESes. Estos estudios iniciales sugieren además que distintos elementos IRESes no poseen consenso de secuencia nucleotídica ni de estructura secundaria, por tanto, deben ser caracterizados únicamente de manera funcional. Es así como los primeros IRESes virales identificados, como el del virus de la poliomielitis (PV) [14] o del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) [59], se caracterizaron al insertar la región 5'UTR del mRNA genómico viral (gRNA) en la región intercistronica de un plasmidio codificante para dos proteínas reporteras (vector bicistronico). En este contexto, al generarse un mRNA bicistronico, el inicio de la traducción del primer cistron es dependiente de la estructura 5'cap, mientras que el inicio de la traducción del segundo cistron depende de la capacidad de la secuencia intercistronica de reclutar la subunidad 40S ribosomal de manera interna [2, 13]. El uso de mensajeros bicistronicos para la caracterización funcional de IRESes continúa siendo hoy la estrategia más utilizada para la identificación este tipo de elementos de RNA [2].

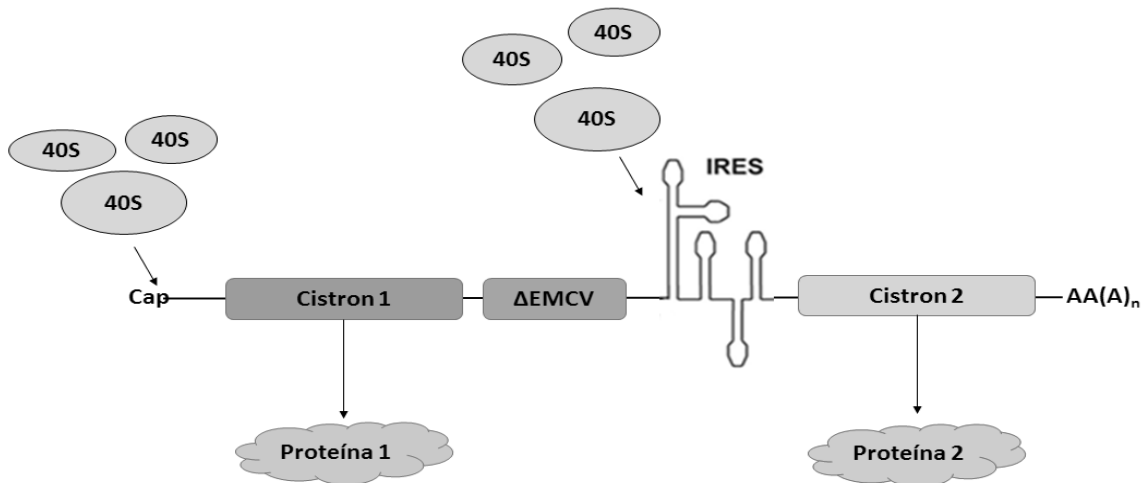


Fig. 1. Representación esquemática de un mensajero bicistrónico. En este sistema, la traducción del primer cistrón (cistrón 1) ocurre por un mecanismo cap-dependiente, mientras que la traducción del segundo cistrón (cistrón 2) sólo ocurrirá si la región intercistronica posee actividad IRES. En el mensajero bicistrónico, la región ΔEMCV corresponde a la región 5' UTR del mRNA genómico del virus de la encefalomiocarditis con una mutación que no permite generar un IRES funcional, el cual es utilizado para evitar el mecanismo de terminación-reiniciación del ribosoma (Adaptada de López-Lastra y cols., 2005).

Desde su caracterización inicial en mRNAs de la familia Picornaviridae [59], se ha descrito la presencia de elementos IRESes en mRNAs provenientes de otras familias

virales incluyendo miembros de las familias *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, y *Retroviridae* [15-19]. También se han descrito elementos IRESes en RNAs de virus de insectos [61] y de plantas [62], así como en elementos retrotransposones de roedores [63] e insectos [64]. Más aun, se han descrito la presencia de IRESes en mRNAs de origen celular [65]. Es así como hoy se estima que hasta un 10% de los mRNAs celulares poseen elementos IRES [60]. Es relevante mencionar que la actividad IRES en mRNAs celulares ha demostrado estar asociada a diversas patologías incluyendo leucemias, linfomas [53], enfermedades neurodegenerativas [54] y cáncer [55]. Por cuanto, se estima que el entender los mecanismos moleculares que gobiernan el inicio de la traducción dependiente de IRESes así como su modulación por proteínas celulares, permitirán establecer estrategias específicas para regular su función [19, 87]. Lo anterior permite proponer a los IRESes y sus proteínas moduladoras como un blanco específico para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a regular el inicio de la traducción IRES-dependiente. Esto tendría un potencial impacto terapéutico en todas las enfermedades asociadas a una desregulación traduccional mediada por IRES [95]. Como modelos de estudio, en este trabajo en particular, nos enfocaremos en los IRES de origen retroviral y sus proteínas regulatorias las cuales ya han sido identificados como un potencial blanco para el desarrollo de nuevas terapias antivirales [49, 50].

1.3 Ciclo replicativo Retroviral

El ciclo replicativo retroviral comienza con la interacción de proteínas de superficie del virión con los apropiados receptores y correceptores presentes en la superficie de la membrana de la célula blanco [7, 88, 94]. Una vez que ocurre la fusión de las membranas viral y celular, el genoma viral es expuesto en el citoplasma celular y retrotranscrito por la proteína transcriptasa reversa viral, RT, a una molécula de DNA lineal de doble hebra [88, 89]. El DNA viral, junto con algunas proteínas virales y celulares forma el complejo de pre-integración (PIC), el cual migra al núcleo. En el núcleo, El DNA viral es integrado en el genoma de la célula infectada mediante la acción de la proteína integrasa, IN. En este estado el genoma viral es denominado provirus [7,90]. En el provirus, la región codificante está flanqueada por secuencias repetidas llamadas repetición terminal larga (LTR, del inglés long terminal repeat). Las secuencias LTR poseen elementos reguladores para el inicio de la transcripción viral [7, 90]. El promotor viral presente en la región LTR es reconocido por a RNA polimerasa II (RNA pol II) celular, generando un RNA mensajero (mRNA) de largo completo o genómico (gRNA) retroviral. Después de su síntesis el gRNA puede sufrir, o no, distintos grados de procesamiento de corte o empalme dando así origen a todos los mRNAs virales [91,92].

En el citoplasma celular, el gRNA cumple dos funciones, la de mRNA y la de RNA genómico viral. Como mRNA, es reconocido por la maquinaria traduccional de la célula hospedera para permitir la síntesis de la poliproteína Gag. Una vez que las proteínas estructurales han sido sintetizadas, el gRNA es incorporado como genoma en las partículas virales gracias a la interacción del RNA con Gag [7, 93]. El RNA viral es destinado hacia la membrana celular y encapsidado en forma de dímero gracias a interacciones no covalentes que se establecen entre dos hebras [93]. La partícula viral es liberada por yemación y completa su maduración mediante cortes proteolíticos de las poliproteínas Gag y Gag/Pol realizados por la enzima viral PR [7, 93].

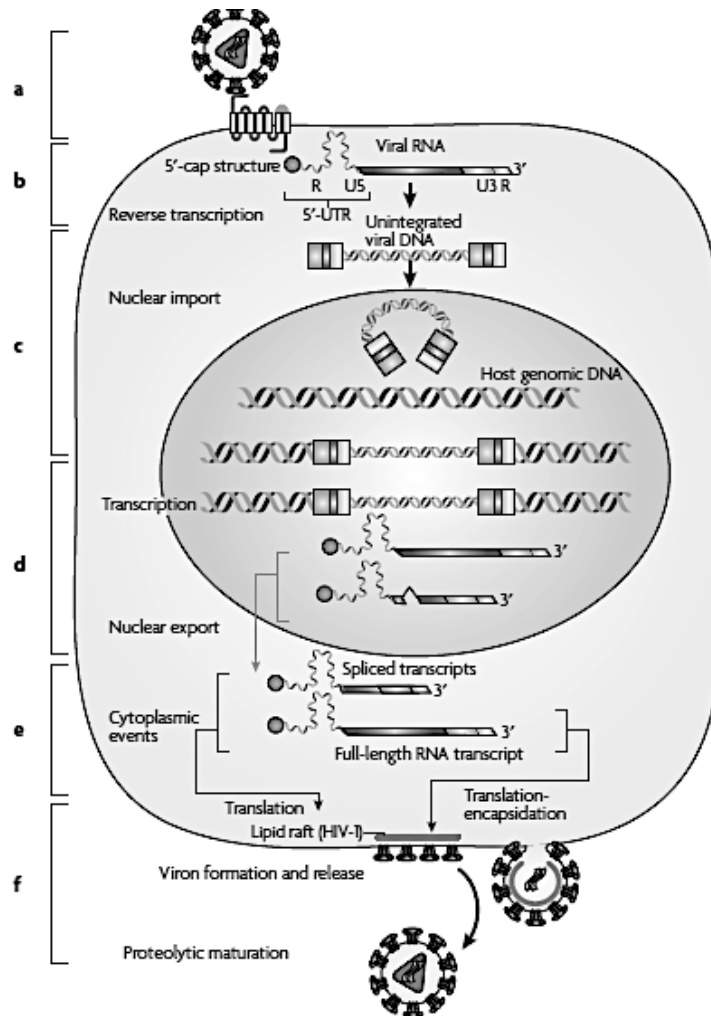


Figura 2. Esquema de las etapas del ciclo replicativo retroviral. El ciclo replicativo de retrovirus se divide en 6 etapas esenciales, estas son: interacción, adsorción y entrada a la célula (a); síntesis del DNA viral de sobre hebra por transcrippción reversa (b); integración (c); transcripción, splicing y exporte nuclear (d); traducción y encapsidación (e); ensamblaje y yemación (f). (Adaptada de Balbay y cols., 2007).

1.4 Inicio de la traducción del mRNA genómico retroviral

Los retrovirus presentan un genoma de RNA de polaridad positiva, cuya replicación se realiza a través de un intermediario de DNA, el cual es integrado en el genoma del hospedero (Provirus) [2,3]. El gRNA retroviral es sintetizado en el núcleo a partir del DNA proviral por la RNA polimerasa II celular (Pol II). El transcrito viral posee una estructura 5'cap, una región 5'UTR río arriba del marco de lectura abierto (ORF) que codifica para las proteínas estructurales Gag y Gag/Pol, y una región 3' UTR poliadenilada [7, 20]. Además, de estas características se ha descrito que los gRNAs de diversos retrovirus, como por ejemplo del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) [15, 16], el virus de la leucemia de linfocitos T humano de tipo 1 (HTLV-1) [18] y el virus del tumor mamario murino (MMTV) [19], entre otros [66-69], albergan elementos IRES en la región 5'UTR. Por tanto, el inicio de la síntesis de proteína en retrovirus puede ocurrir utilizando tanto el mecanismo canónico, cap-dependiente, o via un mecanismo no canónico, IRES-dependiente. De igual manera como se ha descrito para los elementos IRESes presentes en mRNAs celulares, la presencia de elementos IRESes en mRNAs retrovirales desempeña un papel fundamental al permitir la síntesis de proteínas virales en condiciones bajo las cuales la traducción cap-

dependiente se encuentra inhibida [8-12]. Esto ocurre, por ejemplo, durante el arresto en la fase G₂M del ciclo celular inducido por la infección de HIV-1 o HTLV-1, promovido por las proteínas virales Vpr o p30, respectivamente [70,71]. En el estadio G₂M del ciclo celular, la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida, pero no así la traducción IRES-dependiente [70, 71]. Además, en estadios tardíos de la infección por las proteasas retrovirales PR proteoliza el factor eIF4G, de manera que este factor pierde su capacidad de interactuar con eIF4E, afectando así el inicio de la traducción canónico [72-74]. Más aún, se ha descrito que condiciones de estrés oxidativo inducidos por la replicación de HIV-1 o HTLV-1 también se inhibe la traducción cap-dependiente, sin afectar el reclutamiento interno de la maquinaria traduccional en los gRNAs virales [10,11, 75].

1.5 Factores que actúan en “trans” sobre IRES

Una de las características de los elementos IRES presentes en los mRNAs de origen celulares, y que es compartida por los IRESes de origen retroviral, es que su función requiere de la participación de proteínas celulares diferente a los factores eucarióticos de inicio de la traducción. De forma genérica, estos factores celulares se denominan factores que actúan en “trans” sobre IRES (ITAFs) [21,22]. Se postula que los ITAFs

actúan como chaperonas de RNA, participando en el proceso de estructuración de los elementos IRES, regulando así el reclutamiento de la maquinaria de inicio de la traducción sobre el mRNA [21]. Los ITAFs en su mayoría corresponden a proteínas asociadas al metabolismo del mRNA cuya localización celular es principalmente nuclear. Por tanto, cabe preguntarse cuáles proteína celulares, que normalmente están retenidas en el núcleo, y de qué manera estas proteínas participan en el proceso citoplasmático de síntesis de proteína.

En el afán de comprender las bases moleculares de la regulación de la traducción de mRNAs que poseen tanto un elemento 5'cap y un IRES, nuestro laboratorio ha propuesto el uso de mRNAs retrovirales como modelos de estudio. Esta estrategia de investigación se sustenta en los siguientes principios: a) los virus utilizan la maquinaria celular para llevar a cabo la síntesis de sus proteínas; b) los mRNAs retrovirales son sintetizados por la maquinaria de transcripción celular, por cuanto, comparten todas las características de un mRNA celular; c) aun cuando los mRNAs retrovirales comparten todas las características de un mRNA celular, no están presentes en las células (exógenos), evitando así interferencias potenciales que podrían existir con mecanismos de regulación aun no caracterizados que pudiesen entorpecer el análisis al utilizar un mRNA celular (endógeno) en el estudio.

Es así que tanto nuestro laboratorio, como otros, han invertido esfuerzo en la búsqueda de proteínas celulares que modulan elementos IRES retrovirales. A la fecha se ha descrito que la actividad del IRES de HIV-1, IRES retroviral prototipo, es dependiente de los factores canónicos eIF4A [48] y eIF5A [24,50], y factores no canónicos como la proteína ribosomal S25 [51], HuR [26], human Rev-interacting protein (hRIP) [24], DEAD box polypeptide 3 (DDX3) [24], ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNPA1) [11], y hnRNP U [42]. Se ha propuesto en el caso del gRNA de HIV-1, al igual que para los mRNAs celulares que poseen IRES [78], que un complejo ribonucleoproteico (RNP) conformado por el RNA viral, proteínas canónicas y no canónicas del inicio de la traducción modularía la actividad IRES. De aquí surge el interés de identificar las proteínas celulares que forman parte de los diferentes RNPs de HIV-1, caracterizar el rol de las proteínas identificadas en la modulación traduccional IRES-dependiente, y determinar el mecanismo molecular que media la acción de estas proteínas sobre la expresión génica. Con el fin de identificar nuevos ITAFs de elementos retrovirales, nuestro laboratorio ha utilizado, dos estrategias experimentales: a) ensayos de *pull down*, acopado a espectrometría de masas (MS) [41]; b) cromatografía por afinidad GRNA acoplado a MS. Ambas estrategias permitieron la generación de listas parciales de proteínas citoplasmáticas y nucleares que se asocian a las regiones 5' UTR de HIV-1 [41] y HTLV-1 [41,42].

Una observación interesante surgida del estudio de la modulación de la actividad IRES de HIV-1, es que algunos ITAFs demostraron unirse al mensajero viral en el núcleo y luego deslocalizarse al citoplasma junto a éste para así cumplir su función de modulador traduccional [11,25]. Esta observación se refuerza con datos (no publicados) de nuestro laboratorio, los que indican que al transfectar células con mensajeros bicistrónicos con los elementos IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV sintetizados *in vitro*, éstos no exhiben actividad IRES. Sin embargo, al transfectar estos vectores bicistrónicos como DNA, dl-HIV-1, dl-HTLV-1 y dl-MMTV, los cuales son transcritos en el núcleo, se observa que los gRNAs exhiben actividad IRES. Estos resultados sugieren por tanto, que algunos elementos reguladores de los IRESes retrovirales deben ensamblarse con el RNA en el núcleo para ser funcionales posteriormente en el citoplasma.

En base a los antecedentes presentados, en este trabajo de tesis se propone la identificación de al menos una proteína nuclear que forme parte del complejo proteico asociado a la modulación de la traducción mediado por IRES presente en la región 5'UTR de los gRNAs de los virus HIV-1, HTLV-1 y MMTV. El criterio de selección de las proteínas a estudiar utilizado en este trabajo se basó en los siguientes requerimientos:

- 1) Proteína con alto puntaje (score) de unión a la región 5'UTR de HIV-1 identificada mediante ensayos de *pull down* y cromatografía de afinidad GRNA, acopladas a MS

[41, 42]. 2) Proteína identificada como proteínas de unión a la región 5'UTR de HIV-1 en estudios similares a los nuestros, pero reportados por otros laboratorios [82, 85, 88]. 3) Proteína de localización preferentemente nuclear. 4) Proteína con información reportada de actuar como ITAF para los IRESs presentes en otros mRNAs virales o celulares, diferente al mRNA de HIV-1 o HTLV-1.

Basado en los criterios de selección expuestos, la ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hnRNP K) surgió como un candidato interesante. HnRNP K se encuentra presente en las listas generadas desde los ensayos de *pull down* para la identificación de proteínas de unión a las regiones 5'UTR de HIV-1 del trabajo de Vallejos y colaboradores o en la lista extendida no publicada, generada con esta aproximación [41], y en la de lista aún no publicada generada como parte del trabajo de tesis de Nataly Contreras [42]. En células, hnRNPK presenta una localización predominantemente nuclear y es capaz de unir RNA y DNA pues posee dominos de unión KH [43]. La proteína a hnRNPK participa además en diferentes procesos asociados al metabolismo del mRNA como son transcripción, estabilización de mRNAs y traducción [43-45]. Por otra parte, Evans y colaboradores describieron que hnRNP K actúa como ITAF del mRNA de c-myc [31]. Estos antecedentes fueron considerados suficientes para decidir estudiar el rol de hnRNP K en la modulación de la traducción IRES-dependiente de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

En resumen, basado en los criterios de selección establecidos para identificar nuevos ITAFs para IRESs de origen retroviral, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el impacto de hnRNP K sobre la iniciación interna mediada por la región 5'UTR de los gRNAs, de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

Se sugiere que los resultados generados en esta tesis contribuirán al mejor entendimiento del mecanismo de regulación del inicio de la traducción IRES-dependiente de gRNAs retrovirales. Así también, se estima que estos resultados contribuirán al entendimiento de la regulación de la expresión génica mediada por proteínas nucleares.

2. HIPÓTESIS

La ribonucleoproteína heterogénea nuclear K actúa como un ITAF para los elementos IRES presentes en la región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

3. OBJETIVO GENERAL

**Evaluar el rol de hnRNP K sobre el inicio de la traducción mediada por los IRESes de
HIV-1, HTLV-1 y MMTV.**

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-. Validar la selección de hnRNP K como un ITAF putativo para los elementos IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

2-. Determinar si hnRNP K actúa como un ITAF para los elementos IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

3-. Determinar si hnRNP K forma complejos con otros ITAFs retrovirales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

Células de riñón de embrión humano (HEK293T; CRL-11268) y células humanas epiteliales de cáncer cervico-uterino (HeLa; CCL-2TM) fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; #SH30022, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, Utah, Estados Unidos) suplementado con 10% de suero fetal bovino (#SH30910 Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/mL; #SV30010, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), y 1% fungizona (25 µg/ml; #SV30078.01, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences). Células Jurkat (J77) fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute con Glutamax (RPMI, Gibco), suplementado al igual que el medio DMEM. Las células fueron cultivadas a una temperatura de 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂.

5.2 Vectores

Los vectores dl HIV-1 IRES, dl HTLV-1 IRES, dl MMTV y dl Δ EMCV, pNL4.3, y pNL4.3-Rluc [11,16,18,19,76] utilizados en este trabajo, así como los vectores expresores de las proteínas recombinantes hnRNP A1 con tag myc (pMyc-hnRNP A1) y hnRNPU con tag histidina (pHIS-hnRNPU) [77,42] han sido previamente descritos. El vector expresor de la proteína recombinante hnRNP K con tag hemaglutinina (pHA-hnRNP K) utilizado en este trabajo es un vector comercial (Sino-Biological, HG16029-NY). Para todas las transfecciones, la cantidad total de DNA transfectado fue la misma; cuando fue necesario, la cantidad total de DNA fue igualado suplementando con el vector comercial, pSP64 (Promega, Madison, WI, USA). El vector pcDNA3.1 lacZ, el cual expresa β -galactosidasa desde un transcrito expresado en forma cap-dependiente, fue utilizado como control interno de eficiencia de transfección (normalizador).

5.3 Extractos Celulares

Para la preparación de los extractos, 8×10^6 células HEK293T y HeLa ó 14×10^6 células Jurkat fueron centrifugadas a 340 g por 5 min. El pellet obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer PBS 1X; 1 mL se utilizó para la preparación del extracto celular completo y el otro mL se utilizó para obtener las fracciones nuclear y

citoplasmática. Para la preparación del extracto celular completo, las células fueron centrifugadas a 500 g por 5 min a 4°C. Transcurrido el tiempo, el pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de buffer RIPA (Tris-HCl pH 7.5 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM, NP-40 0.5%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1 % e inhibidor de proteasas (Roche) y luego se sonicó en frío a 40% de amplitud por 20 segundos. El extracto celular completo fue conservado a -20°C. Para la obtención de las fracciones nuclear y citoplasmática, las células fueron centrifugadas a 500 g por 5 min a 4°C. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 400 µl de buffer RLNa (10 mM de Tris-HCl (pH 8), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5% NP40, 10 U/µl de inhibidor de RNAsas) y se incubó en hielo por 5 min. Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 16.000 g por 3 min. El sobrenadante obtenido se rescató, se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas previamente y se conservó como la fracción citoplasmática. El pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de buffer RLNa y se centrifugó a 16.000 g por 3 min. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de buffer RIPA, se sonicó en frío y el lisado obtenido se conservó como la fracción nuclear. La especificidad de la preparación de los extractos descritos previamente se evaluó mediante ensayos de western blot, utilizando anticuerpos que reconocen la proteína nuclear PARP-1 o la proteína citoplasmática GAPDH.

5.4 Inmunofluorescencia indirecta

Células HeLa fueron transfectadas con el vector pNL4.3, el cual codifica para un clon infeccioso de HIV-1. La evaluación de la deslocalización fue evaluada mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para esto, $2,5 \times 10^4$ células HeLa fueron sembradas sobre un cobertor de vidrio hasta un 60% de confluencia. Posteriormente, las células se transfectaron con 200 ng del vector pSP64 o del vector pNL4.3. Luego de 24/48 h.p.t, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % por 10 min. Luego, las células se permeabilizaron con PBS 1X con 1% tritón X-100 0,03 % y se bloquearon con PBS 1X con 10 % de suero fetal bovino y tritón X-100 0,03 %. Posteriormente, cada cobertor de vidrio se incubó 16 h con el anticuerpo primario anti-hnRNP K (sc-28380) en dilución 1: 100. Al día siguiente las células se lavaron y se incubaron a temperatura ambiente por 2 h con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) diluido 1:200. Transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 710301, KPL Inc.) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente los cobertores se lavaron y colocaron en medio de montaje DAKO (S3023, DAKO Denmark A/S). Las imágenes se capturaron con magnificación 60X utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y se procesaron con el programa ImageJ.

5.5 Transfección de siRNA y co-transfección siRNA/DNA

Los ensayos de silenciamiento se llevaron a cabo sembrando $1,1 \times 10^5$ células HEK293T en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzado el 80-90% de confluencia, las células fueron co-transfectadas con 200 ng de los plásmidos dl HIV-1IRES, dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES en conjunto con 375 ng del vector vacío pSP64 y con 100 nM de un RNA silenciador (siRNA) que permite inhibir la expresión endógena de hnRNP K (sc-38282, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA). Como control se utilizó un silenciador negativo o scramble (SC), (#4390844; Ambion, ThermoFisher Scientific Inc). Transcurridas 48 h.p.t, las células fueron lisadas utilizando 50 μ L de buffer pasivo de lisis (Promega); 20 μ L de los lisados celulares fueron utilizados para analizar la expresión de las proteínas reporteras como se describe en 5.7 y una alícuota de cada lisado fue utilizada para evaluar la expresión de hnRNP K mediante western blot.

Para los ensayos con pNL4.3-RLuc, $1,1 \times 10^5$ células HEK293T fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzado el 80-90% de confluencia, las células fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 200 nM del siRNA que permite silenciar la expresión endógena de hnRNP K (sc-38282, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA). Como control se utilizó el silenciador negativo o scramble (SC), (#4390844; Ambion, ThermoFisher Scientific Inc.). Transcurridas 24h

p.t, las células fueron transfectadas con 200 ng de vector pnl4.3-RLuc utilizando el reactivo polietilenimina (PEI). 24h luego de esta segunda transfección, las células fueron lisadas con 50 μ L de buffer pasivo de lisis y 20 μ L fueron utilizados para analizar la expresión de la proteínas reportera Renilla Luciferasa (RLuc). Una alícuota de cada lisado fue utilizada para evaluar la expresión de hnRNP K endógena mediante western blot.

5.6 Transfección de DNA

Para los ensayos de sobreexpresión, $1,1 \times 10^5$ células HEK293T fueron sembradas en placas de 24 pocillos hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Posteriormente, las células se co-transfectaron con 200 ng de los plásmidos dl HIV-1 IRES, dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES, 25 ng del plásmido pcDNA3.1 LacZ y con concentraciones crecientes de los vectores expresores HA-hnRNP K (pCMV3-SP-N-HA-hnRNP K), Myc-hnRNP A1 (pcDNA3.1-Myc-hnRNP A1) y HuR (pcDNA3-HuR), utilizando el reactivo de transfección jetPEI (Invitrogen). Para los ensayos de co-expresión de hnRNPs, 5×10^4 células HEK293T fueron sembradas en placas de 48 pocillos hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Posteriormente, las células se co-transfectaron con 150 ng de los plásmidos dl HIV-1 IRES, dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES, 12,5 ng del plásmido pcDNA 3.1 LacZ y con concentraciones equivalentes de los vectores

expresores HA-hnRNP K, Myc-hnRNP A1, y His-hnRNP U (125 ng), utilizando el reactivo de transfección jetPEI.

En ambos experimentos, 24 h.p.t, las células se lisaron utilizando 50 y 25 μ L de buffer pasivo de lisis; 20 μ L de los lisados celulares fueron utilizados para analizar la expresión de las proteínas reporteras como se describe en **5.7**, y una alícuota de cada lisado fue utilizada para evaluar la sobreexpresión de las proteínas mediante western blot.

5.7. Ensayos de Luciferasa.

Las mediciones de actividad luciferasa se realizaron utilizando 20 μ L de lisado celular. Las mediciones se llevaron a cabo. La actividad enzimática de luciferasa de Renilla (RLuc) y *Firefly* Luciferasa (FLuc) se midió utilizando el sistema DLR™ Assay System siguiendo las instrucciones del fabricante (#E1960, Promega Corporation) en un luminómetro de tubos (Berthold Detection Systems GmbH), el cual entrega como unidad de medición “unidades relativas de luminiscencia” (RLU). En este trabajo, los resultados son mostrados utilizando dos índices de actividad traduccional, la actividad de luminiscencia relativa (RLA), en el cual las RLU para cada cistrón son normalizados a una condición control, o el índice de actividad traduccional relativa (RTA), dado por la razón entre FLuc y RLuc.

5.8. Ensayo de crosslinking e inmunoprecipitación (UV-CLIP).

El ensayo UV-CLIP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente con algunas modificaciones [23,29]. En resumen, $3,6 \times 10^6$ células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm (tres placas por condición) hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Posteriormente, las células se co-transfectaron con el vector dl HIV-1 y con el plásmido pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K o como control negativo el vector pSP64. La proteína HA-hnRNP K fue inmunoprecipitada utilizando esferas de agarosa cargadas con anti-HA o anti IgG como control, seguido por western blot. El RNA asociado se detectó por transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativo (RT-qPCR) como ha sido descrito previamente [23, 29] utilizando los partidores validados para la amplificación de *firefly* luciferasa o del gen gapdh [29].

5.9 Ensayos de Coimmunoprecipitación (CO-IP):

$3,6 \times 10^6$ células HEK293T fueron cultivadas en placas de 100 mm hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Posteriormente, las células se co-transfectaron con 1 μ g del plásmido dl HIV-1 IRES y 7 μ g de los vectores expresores HA-hnRNP K (pCMV3-SP-N-HA-hnRNP K), Myc-hnRNP A1 (pcDNA3.1-Myc-hnRNP A1) y HuR (pcDNA3-HuR), utilizando el reactivo de transfección jetPEI. 48 h.p.t, las células fueron lavadas con PBS y colectadas por centrifugación a 4°C. Posteriormente, las células

fueron tratadas con buffer de lisis (50 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 1% Triton -X100 e inhibidor de proteasas Roche). Luego, se realizó un *preclearing* del extracto celular completo (WCL) con las esferas de agarosa-proteína A/G (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, INC) no inmunizadas y pre-bloqueadas con BSA 1 mg/mL. El contenido de proteína total de las muestras se determinó usando el kit *BCA protein assay* (Thermo Scientific). 300 µL de WCL fueron guardados como *input* para los análisis de western blot. Las esferas bloqueadas con BSA se incubaron con los anticuerpos anti-HA rabbit o mouse, o con los controles IgG rabbit o mouse (SC-2025, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA). Luego, los WCL fueron utilizados para cada ensayo de IP. Finalmente, las esferas fueron lavadas con buffer de lavado (50 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 1% Triton -X100) y los complejos fueron denaturados con buffer de muestra (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 2% SDS, 0.04% azul de comassie). Las muestras fueron calentadas por 5 min a 90°C y analizadas por western blot.

5.10. Ensayos de ligación por proximidad (PLA).

Los ensayos de PLA se realizaron usando el kit DUOLINK *in situ*, y las sondas de PLA anti-mouse minus, y anti-rabbit plus (Sigma aldrich) como ha sido previamente descrito [28]. Células HEK293T fijadas con PFA, se incubaron con solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente, Luego, se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes (especificados en cada Fig.), y se incubaron con los cubreobjetos a 37°C por 1h. Posterior a 4 lavados con PBS, los pasos de ligación y amplificación se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y agua ultrapura, antes de agregar el medio de montaje con DAPI Vectashield. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio Olympus, modelo BX51.

5.11 Detección de proteínas mediante western blot

Las células fueron lisadas con Buffer de lisis pasivo (Promega) y la concentración de proteína total en los extractos se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Para la detección de las proteínas HA-hnRNP K, Myc-hnRNPA1, His-hnRNPU, HuR, PARP-1 y GADPH, 20-30 µg del total de

proteínas fueron resueltos en geles tricina-SDS-PAGE al 15% y luego transferidas a una membrana de Difluoro-polivinideno (PDVF; Millipore, Milford, Massachusetts, Estados Unidos) activada con metanol por 1 min. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 1 h con TBS 1X, 5 % de leche descremada y 0.1 % de tween 20. Transcurrido el tiempo se lavaron 3 veces por 10 min con TBS 1X y 0.1 % de tween 20 y se incubaron durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios según corresponda: anti-HA (H9658, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluido 1:5.000, anti-Myc (#2272, Cell Signaling, Inc) diluido 1:3.000, anti-HIS (H1029, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluido 1:5.000, anti-PARP (# 9542, Cell signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA) diluido 1:1.000 y anti-GAPDH (#MAS-15738, Thermo Scientific) diluido 1:5.000. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS 1X y 0.1 % de tween 20 y luego se incubaron por 1.5 horas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1: 10.000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) o anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1: 10.000 (Merck-Millipore Darmstadt 64293, Germany). La presencia de cada una de las proteínas fue detectada mediante una reacción de quimioluminiscencia que fue capturada utilizando placas fotográficas.

5.13. Análisis estadístico

Los gráficos y análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad versión 5 (La Jolla, CA 92037, USA). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante t-test o ANOVA según corresponda seguido de los post-test indicados en cada experimento. Un p valor de menor o igual a 0.05 se determinó como significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Validar la selección de hnRNP K como un ITAF putativo para los elementos IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

6.1.1 Localización de la proteína hnRNP K endógena en células.

La proteína hnRNP K pertenece a la familia de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares humanas (hnRNPs) las cuales han sido descritas como proteínas de localización principalmente nuclear, aun cuando pueden también migrar entre el núcleo y el citoplasma [22]. Como inicio en este estudio se decidió evaluar la localización de hnRNP K endógena en las líneas celulares HEK293T, HeLa y Jurkat. Las dos primeras líneas celulares han sido utilizadas previamente como modelos para realizar estudios de IRES retrovirales [16, 18, 23, 50]. Por su parte, tanto las células HeLa como las células Jurkat fueron utilizadas en los ensayos de *pull down* para la identificación de proteínas de unión a las regiones 5' UTR de HIV-1 y HTLV-1 [41, 42].

Para llevar a cabo este objetivo, se prepararon extractos totales, nucleares y citoplasmáticos desde HEK293T, HeLa y Jurkat, como se describe en la sección 5.3. Los extractos obtenidos se utilizaron en un ensayo de western blot para diseñado para detectar hnRNP K. En estos ensayos se utilizó a las proteínas PARP-1 y GAPDH como marcadores de núcleo y citoplasma, respectivamente (Fig.3).

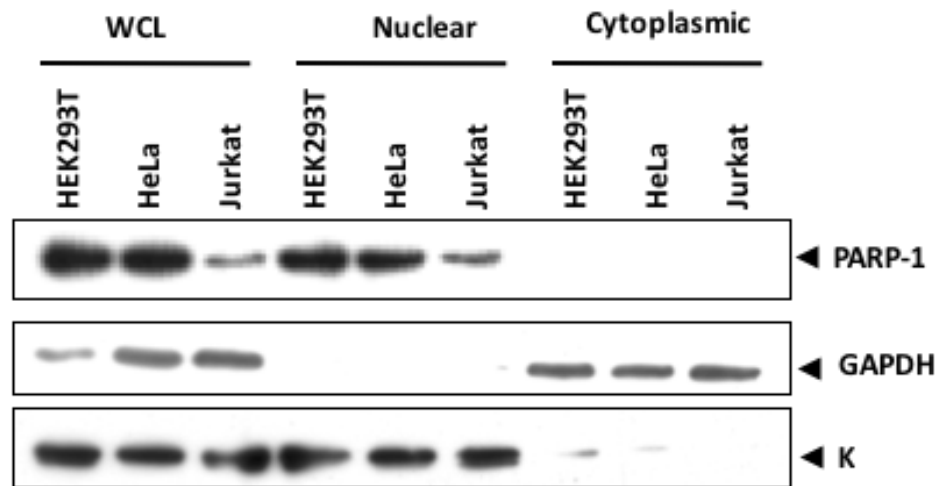


Fig. 3. Localización celular de hnRNP K en diferentes líneas celulares. Extractos completos, nucleares y citoplasmáticos obtenidos de células HEK293T (carril izquierdo), HeLa (carril central) y Jurkat (carril derecho) analizados por western blot. PARP-1 y GAPDH se utilizaron como marcadores de núcleo y citoplasma, respectivamente.

Como se observa en la Fig. 3, para las distintas líneas celulares fue posible obtener extractos nucleares y citoplasmáticos, lo que se confirma por la expresión de la proteína nuclear PARP-1 y la proteína citoplasmática GAPDH, y en acuerdo a lo previamente descrito [37], se observa que la localización de hnRNP K es principalmente nuclear en las tres líneas celulares evaluadas (Fig. 3).

6.1.2. Localización de la proteína hnRNP K endógena en células donde HIV-1 replica.

De actuar como un ITAF para el IRES de HIV-1, se prevé que durante la infección con HIV-1 la proteína hnRNPK se relocalice, al menos en forma parcial, al citoplasma. Con el fin de evaluar esta posibilidad, células HeLa fueron transfectadas con el plasmidio pNL4.3 el cual corresponde a un clon infeccioso de HIV-1 y se procedió a determinar la localización de la proteína hnRNP K (Fig. 4). Como indicador de la replicación de HIV-1 se detectó la proteína de la matriz (p17). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI. Cabe mencionar que en el laboratorio no existe un sistema eficiente de replicación de HTLV-1 y MMTV, por lo que los ensayos de replicación viral y localización de hnRNP K se limitaron sólo a HIV-1.

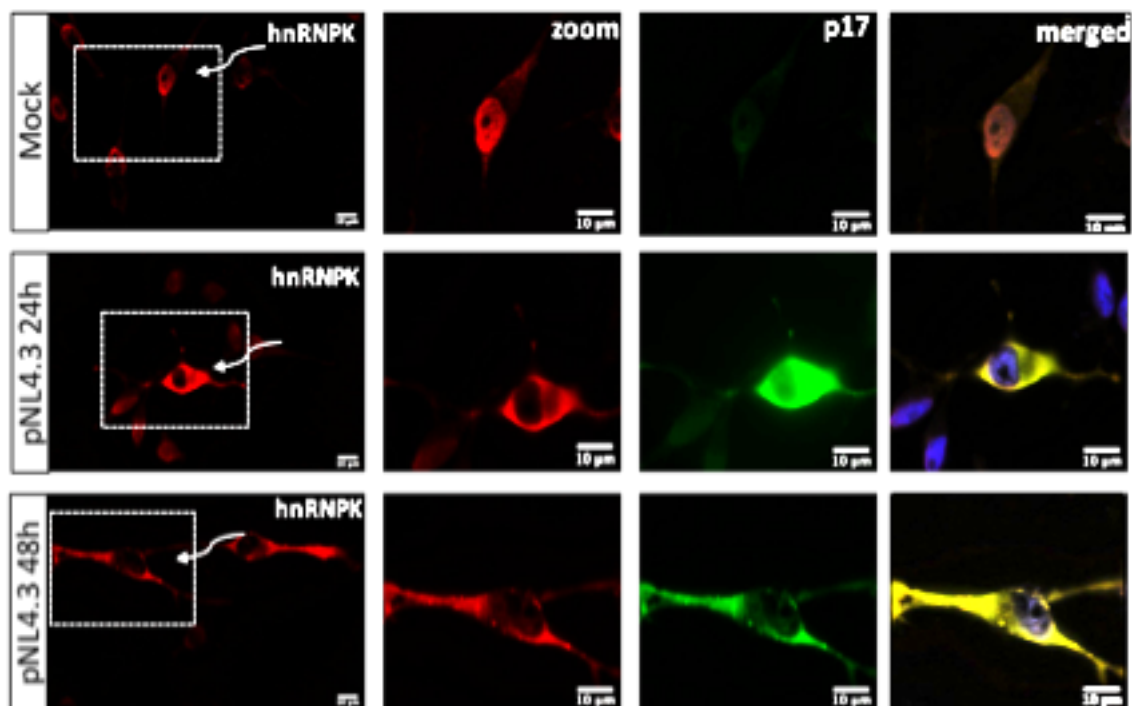


Fig. 4. Localización subcelular de hnRNP K durante la replicación de HIV-1. Células HeLa fueron transfectadas con vector pSP64 (Mock) o con un clon infeccioso de HIV-1 (pNL4.3). La localización de hnRNP K y fue evaluada por ensayos de inmunofluorescencia. Azul: Dapi, Rojo: hnRNP K, verde: proteína viral p17.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta muestran que la proteína hnRNP K deslocaliza desde el núcleo al citoplasma en células donde HIV-1 replica. Por tanto, la proteína hnRNP K se relocaliza hacia el citoplasma en células infectadas con HIV-1. Este resultado apoya la posibilidad, que durante la replicación de HIV-1, hnRNPK cumpla un rol en el citoplasma.

6.1.3 El silenciamiento de la expresión de hnRNP K endógena afecta la traducción de Gag en un clon molecular de HIV-1.

Con el fin de determinar si la expresión de la proteína hnRNP K modula la traducción del mRNA de HIV-1, se realizó un ensayo de silenciamiento de esta proteína en células HEK293T. Las células fueron posteriormente transfectadas con el clon molecular de HIV-1, pNL4-3-RLuc [76], en el cual, el gen que codifica para la proteína reportera RLuc se encuentra en la región codificante para la proteína viral Gag dando origen a una proteína de fusión Gag-RLuc (Figura 5). De esta manera, la utilización de este clon molecular recombinante permite evaluar el efecto de la depleción de hnRNP K sobre la traducción de la proteína Gag-RLuc.

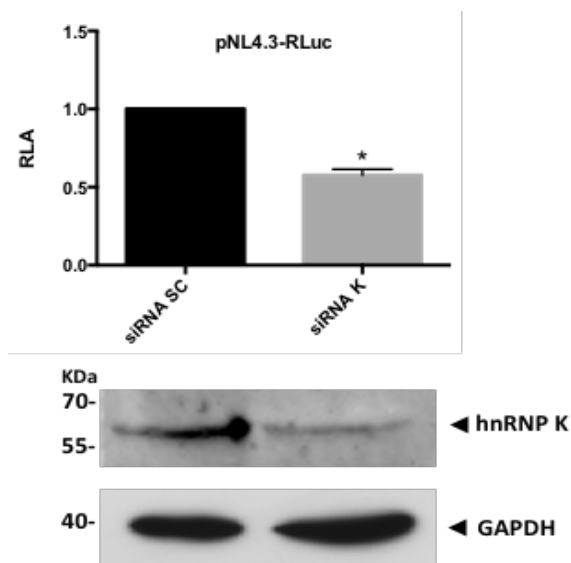


Figura 5. Silenciamiento de la expresión de hnRNP K afecta la traducción del clon molecular de HIV-1. Células HEK293T se transfectaron con 200 nM de un siRNA negativo (SC) o con 200 nM de un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNP K. 24 h.p.t, fueron transfectadas con el clon molecular pNL4.3-RLuc. La actividad de RLuc se muestra como RLA, relativo al valor obtenido en presencia del siRNA control, el cual fue fijado arbitrariamente a 1. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante t-test no paramétrico. *, $p < 0.05$ versus SC.

Los resultados muestran que se logra un silenciamiento parcial de la expresión endógena de hnRNP K en células HEK293T (Fig. 5, panel inferior, hnRNP K), mientras que el control de carga no presenta cambios (Fig. 5, panel inferior, GAPDH). Por otra

parte, se observa que la reducción de la expresión endógena de hnRNP K tiene un impacto negativo sobre la síntesis de la proteína viral recombinante Gag-RLuc. Por tanto, la expresión de hnRNP K es requerida para la traducción del gRNA de HIV-1.

6.2. Determinar si hnRNP K actúa como un ITAF para el IRES de HIV-1.

6.2.1. La proteína hnRNP K se une a la región 5' UTR de HIV-1 en células HEK293T.

Considerando que la proteína hnRNP K es requerido para la traducción de gRNA de HIV-1 (Fig.5), se decidió validar la interacción entre hnRNP K y la región 5'UTR del gRNA de HIV-1 obtenido a partir de los ensayos de pull down GRNA/espectrometría de masas. Esto se realizó mediante un ensayo de UV-CLIP acoplado a RT-qPCR. En este ensayo de las células HEK293T se transfectadas con el vector dl HIV-1, en conjunto con el vector pCMV3-SP-N-HA-hnRNP K o con el vector pSP64 (control) se expusieron a un pulso de luz ultravioleta (UV 400 mJ/cm²) la cual induce la formación de enlaces covalentes entre proteínas y ácidos nucleicos que están en asociación física directa [29]. Posterior al *UV-crosslinking* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación acoplada a ensayos de RT-qPCR.

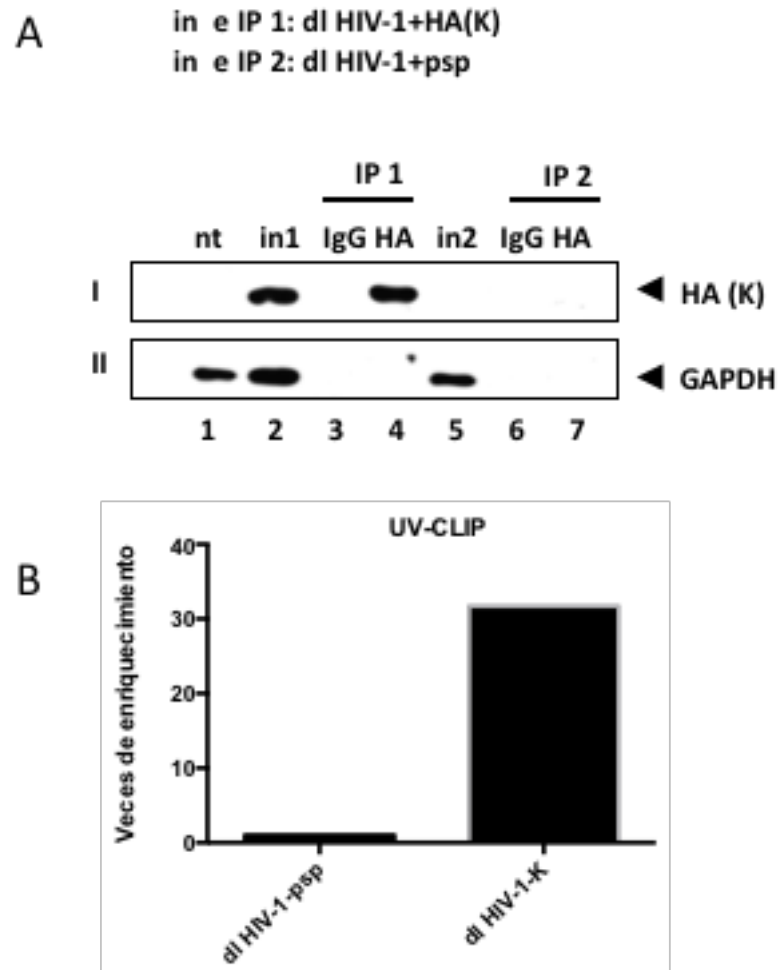


Fig. 6. La proteína hnRNP K interactúa con la región 5'UTR de HIV-1 en células HEK293T. (A) Células HEK293T fueron co-transfectadas con el vector dl HIV-1 y con el plásmido pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K o como control negativo el vector pSP64. 48 h p.t, las células fueron irradiadas con un pulso de UV sobre hielo, y los extractos celulares totales fueron utilizados para ensayos de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-HA (α -HA) o control anti-IgG (α -IgG). Las proteínas obtenidas desde las condiciones de no transfección

(nt), input (in) e inmunoprecipitación (ip), fueron identificadas mediante un ensayo de western blot utilizando los anticuerpos primarios α -HA o α -GAPDH. **(B)** Veces de enriquecimiento calculada considerando la razón de RNA que codifica para FLuc o GAPDH obtenida con la IP utilizando α -HA sobre la IP utilizando α -IgG. Las veces de enriquecimiento obtenidas para el control IP, fueron ajustadas a 1.

La inmunoprecipitación de la proteína recombinante HA-hnRNP K fue determinada mediante ensayos de western blot (Fig. 6 A). En acuerdo a lo esperado, HA-hnRNP K es detectada en el *input* de la condición experimental donde se transfectó el vector pCMV3-SP-N-HA-hnRNP K (Fig. 6A carril 1). A su vez, es posible detectar la proteína HA-hnRNP K solo en las IPs en las cuales se utilizó el anticuerpo anti-HA (Fig. 6A, panel I, carriles 4 y 7) y no al utilizar anticuerpo anti-IgG (Fig. 6A, panel I, carriles 3 y 6). Como control de carga se realizó un western blot contra la proteína GAPDH, demostrando que en todas las condiciones experimentales se cargaron cantidades similares de muestra (Fig. 6A, panel II, carriles 1, 2 y 5). A su vez, los resultados del ensayo RT-qPCR dan cuenta de un enriquecimiento del RNA de dl HIV-1 en la IP (Fig. 6B). Los resultados se presentan como veces de enriquecimiento de RNA con respecto a la IP obtenida entre el dl HIV-1 y el control de no interacción (Fig. 6B). Por tanto, los ensayos UV-CLIP/RT-qPCR demuestran que la proteína hnRNP K interactúa con el RNA dl HIV-1.

6.2.2. El silenciamiento de la expresión de hnRNP K impacta negativamente sobre la actividad del IRES de HIV-1

La traducción del gRNA de HIV-1 puede llevarse a cabo de manera cap- o IRES dependiente [16, 96]. Con el fin de determinar si la proteína hnRNP K ejerce su impacto sobre la actividad del IRES de HIV-1, células HEK293T se co-transfectaron con el plásmido dl HIV-1 IRES, en conjunto con el vector vacío pSP64 y un siRNA comercial diseñado para silenciar la expresión endógena de hnRNP K o con un RNA negativo o scramble comercial (siRNA-SC). El silenciamiento de la expresión de hnRNP K endógena se evaluó mediante ensayo de western blot (Fig 7A). Se determinó la actividad luciferasas, RLuc y FLuc, y los resultados se presentan como actividad luciferasa relativa (RLA) (Fig. 7B) y como actividad traduccional relativa (RTA) (Fig. 7C), donde las actividades de ambos cistrones obtenidas en presencia del siRNA-SC fueron llevadas a 1 (Fig. 7B, 7C). El RTA corresponde a la razón FLuc/RLuc (RTA), y es utilizado como un indicador de la eficiencia de traducción IRES-dependiente [18, 23, 50].

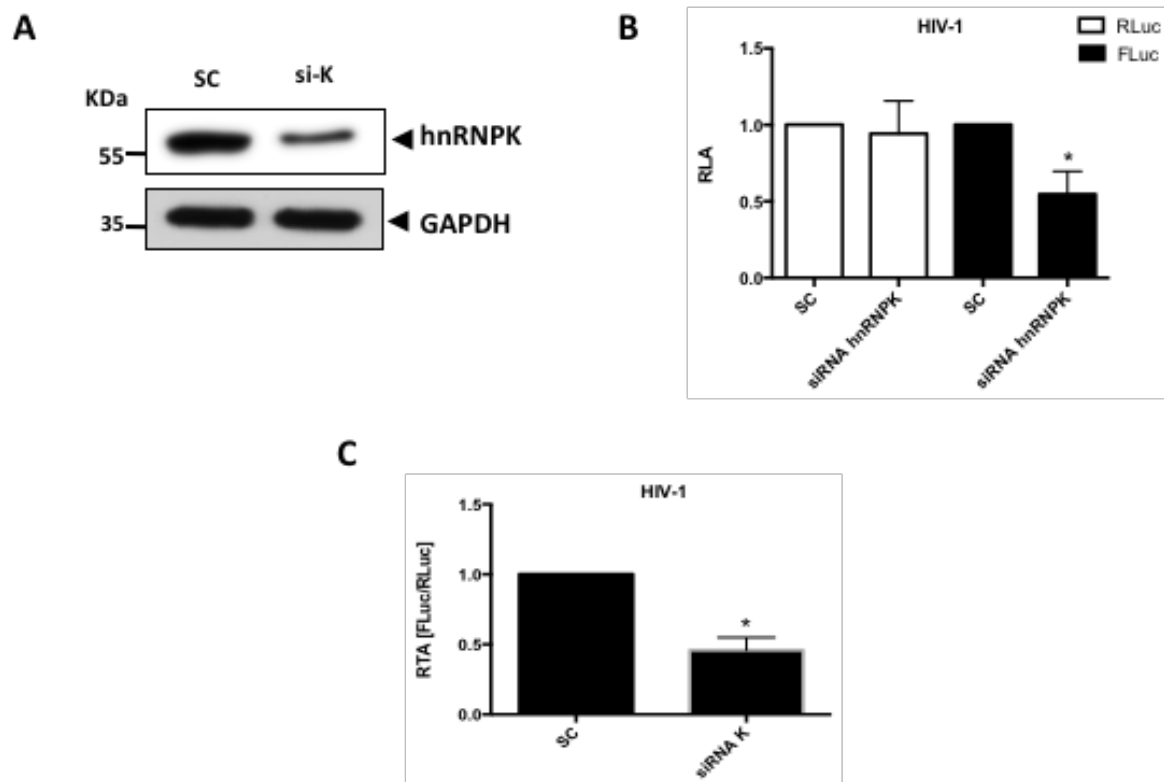


Fig. 7. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HIV-1 requiere de la proteína hnRNP K.

Células HEK293T se co-transfectaron con el vector dl HIV-1 IRES junto con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con 100 nM de un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNP K (**A**). El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNP K sobre la traducción se muestra como RLA (**B**) o RTA (**C**), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA

control como 1 Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA, seguido por comparación múltiple Dunnet **(B)** o t-test no paramétrico (C). *, $p < 0.05$.

Los resultados muestran que se logra un silenciamiento parcial de la expresión endógena de hnRNP K en células HEK293T (Fig. 7A, panel superior), mientras que el control de carga no presenta cambios (Fig. 7A, panel inferior). Por otra parte, la reducción de la expresión endógena de hnRNP K no impacta sobre la expresión de RLuc (Fig. 7 B, barras blancas). Sin embargo, la actividad FLuc mediada por el IRES de HIV-1 se ve reducida ~0.5 veces (Fig 7 B, barras negras). Con el fin visualizar mejor los resultados estos se presentan como RTA [18, 23, 50]. Los resultados confirman que el silenciamiento de hnRNPK lleva a una disminución significativa de la traducción mediada por la región 5' UTR de HIV-1, en comparación al control negativo (Fig. 7). Por tanto, hnRNP K es requerida para la iniciación IRES-dependiente del gRNA de HIV-1.

6.2.3 La sobreexpresión de hnRNP K estimula el inicio de la traducción IRES dependiente de HIV-1.

Con el fin de validar los resultados anteriores (Fig.-7) se decidió evaluar el impacto de la sobreexpresión de la proteína hnRNP K sobre la actividad del IRES de HIV-1. Para ello, células HEK293T se co-transfectaron con el plásmido dl HIV-1 IRES junto con el plásmido

pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K. Luego, 24 h.p.t, las células se lisaron y se confirmó la sobreexpresión de HA-hnRNP K mediante un ensayo de western blot (Fig. 8, paneles inferiores), utilizando un anticuerpo anti-HA. Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RLA (Fig. 8A, C, E), o como RTA (Fig. 8B, D, F), relativo a las actividades obtenidas en ausencia de pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K, las cuales se llevaron al 1.

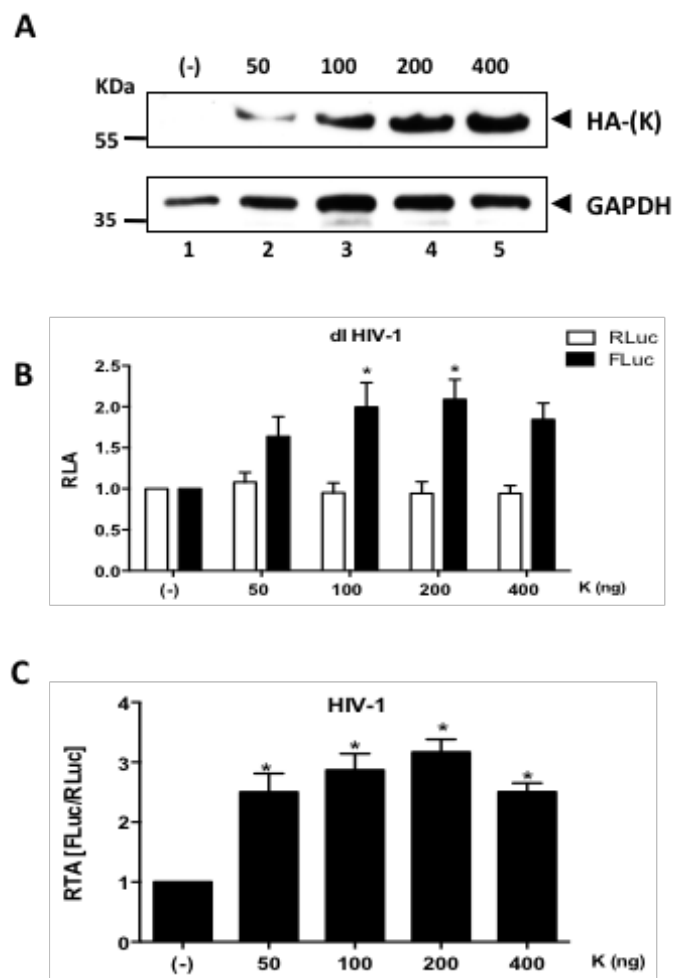


Fig. 8. La sobreexpresión de hnRNP K estimula la actividad del IRES de HIV-1. Células HEK293T co-transfectaron con 200 ng del plásmido dl HIV-1 -IRES, junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del vector pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K. **(A)** Análisis de western blot para la detección de la proteína recombinante o el control de carga GAPDH. El efecto de la expresión de hnRNP K se muestra como RLA **(B)** o como RTA **(C)**, relativo a la actividad del vector bicistrónico en ausencia del plásmido que permite la expresión de hnRNP K. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Dunnet. *, $p < 0.05$.

Los resultados del ensayo de western blot confirman la sobreexpresión de la proteína recombinante HA-hnRNP K en el contexto de células HEK293T (Fig. 8A, panel superior). Además, la expresión de la proteína GAPDH, utilizada como control de carga, indica que se cargó una cantidad similar de proteína en cada carril (Fig. 8A, panel inferior). La sobreexpresión de HA-hnRNP K no afecta la actividad del reportero RLuc, que da cuenta de la traducción cap-dependiente, para ninguna de las condiciones evaluadas (Fig 8B, barras blancas). Por otra parte, la sobreexpresión de HA-hnRNP K induce un incremento en la actividad del reportero FLuc (Fig 8B, barras negras), que da cuenta de la actividad IRES de HIV-1. El impacto de la sobreexpresión de HA-hnRNP K sobre la actividad del IRES de HIV-1 se aprecia mejor cuando los datos son

expresados como RTA (Fig 8C).

Basado en los resultados de los ensayos de silenciamiento (Fig.7) y de sobreexpresión (Fig. 8) se concluye que hnRNP K actúa como un ITAF, modulando positivamente la actividad IRES de HIV-1.

6.2.4 La expresión de hnRNP K no induce actividad de promotor críptico o de *splicing* alternativo sobre el dl HIV-1.

En la célula hnRNP K participa en el metabolismo del mRNA. Por cuanto, a pesar que los resultados anteriores sugieren que hnRNP K es un ITAF del IRES de HIV-1, el incremento de FLuc observado en la figura 7 podrían deberse a que la sobre-expresión de la proteína hnRNP K induzca actividad de promotor críptico en los vectores bicistrónicos utilizados, o bien que induzca un proceso de *splicing* alternativo del mRNA bicistrónico. En ambos casos, si así fuese, un mRNA con 5'Cap y Poli(A) que expresara FLuc podría generarse enmascarando así nuestros resultados. Con el propósito de descartar esta posibilidad, se evaluó si la sobre-expresión de hnRNP K inducía actividad de promotor críptico o bien *splicing* alternativo.

En el primer caso, células HEK293T se transfectaron con el vector bicistrónico dl HIV-1 IRES o con el vector Δ SV40 dl HIV-1 (Fig.9A esquema), en ausencia o presencia del plásmido de expresión de HA-hnRNP K. El vector Δ SV40 carece del promotor SV40

(Fig. 9A, esquema) y permite evaluar la presencia de un promotor críptico en el plasmidio de expresión utilizado ya que en ausencia del promotor la síntesis del mRNA bicistrónico debería encontrarse inhibida por cuanto disminuiría la actividad RLuc y FLuc.

En el segundo caso, se realizó un ensayo de silenciamiento utilizando un siRNA contra la región codificante para RLuc (Fig 9B, esquema) o scRNA, en ausencia o presencia del plásmido de expresión de HA-hnRNP K. En este caso se espera que las actividades de ambas proteínas reporteras disminuya en presencia del RLuc-siRNA, independientemente a si hnRNP K está o no siendo sobreexpresada.

En ambos ensayos, 24h.p.t, las células fueron lisadas y se determinó las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc. Los resultados se presentan como RLA (Fig. 9A), relativo a las actividades obtenidas en presencia del vector dl HIV-1 IRES (Fig. 9A) o del control de no silenciamiento SC (Fig. 9B).

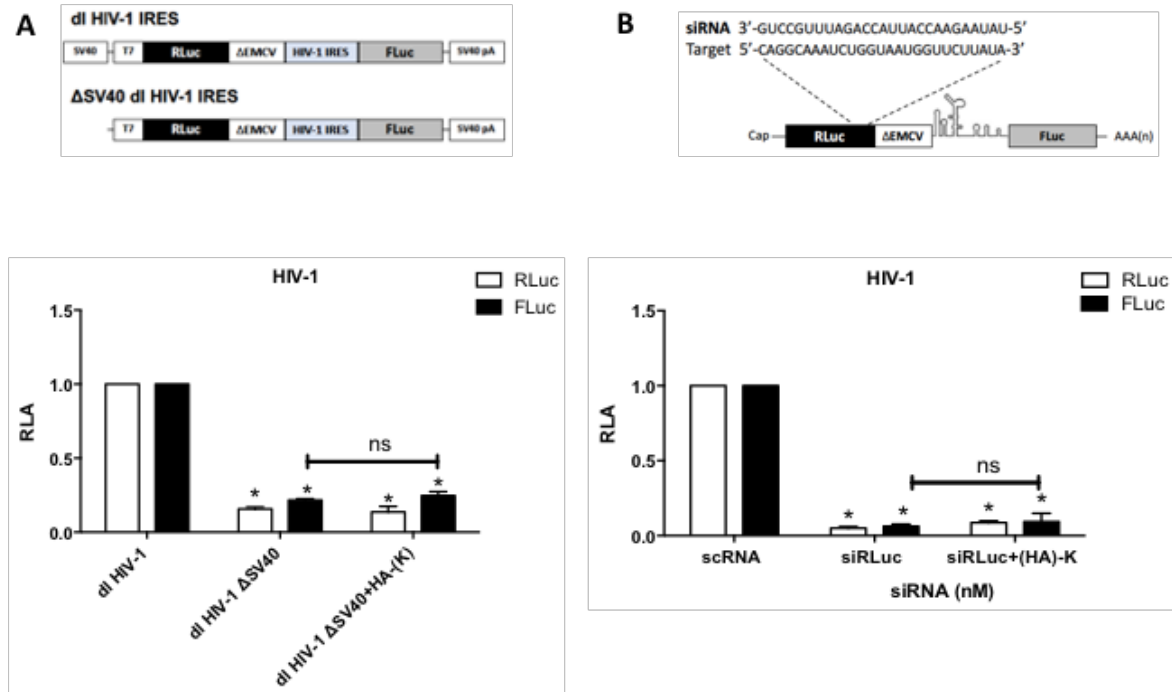


Fig. 9. La expresión de hnRNP K no induce actividad de promotor críptico o de *splicing* alternativo en dl HIV-1 IRES. (A) panel superior: representación esquemática de los vectores bicistrónicos, con y sin promotor SV40 (ΔSV40). Células HEK293T se transfectaron con los vectores descritos en A, junto al vector pcDNA3.1 *LacZ*, en ausencia o presencia del vector de expresión de HA-hnRNP K. Las actividades de RLuc (barras blancas) y FLuc (barras negras) se expresaron como RLA y se llevaron a 1 con respecto a las actividades obtenidas con el vector SV40. **(B).** panel superior: representación esquemática en la cual se se indica la posición de la región blanco del siRNA contra RLuc. Células HEK293T se transfectaron con el vector dl HIV-1 IRES en conjunto con un siRNA control (SC), o con un siRNA diseñado contra la región codificante de RLuc en ausencia o presencia del vector de expresión de HA-hnRNP

K. Las actividades de RLuc (barras blancas) y FLuc (barras negras) se graficaron como RLA, considerando las actividades de RLuc y FLuc en presencia del SC como 1.

Los resultados de estos ensayos sugieren que la expresión de la proteína HA-hnRNP K no induciría actividad de promotor críptico o de especies alternativas de *splicing* en el mensajero bicistrónico de HIV-1.

6.2.5. El silenciamiento de la expresión de hnRNP K impacta negativamente sobre la actividad del IRES de HTLV-1 y de MMTV

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos para el IRES de HIV-1 son aplicables para otros modelos de IRESes retrovirales, se realizaron los mismos ensayos de silenciamiento en presencia de los plásmidos dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES. El plasmidio dl HTLV IRES contiene la secuencia del elemento IRES del virus de la leucemia de linfocitos T humano de tipo 1 (HTLV-1), clonado en la región intercistrónica [18], mientras que el plasmidio dl MMTV IRES contiene la secuencia del elemento IRES del virus del tumor mamario murino (MMTV), clonado en la región intercistrónica [19]. El silenciamiento de la expresión de hnRNP K endógena se evaluó mediante un ensayo de western blot (Fig. 10A) (Fig. 11A). Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como actividad

luciferasa relativa, RLA (Fig. 10B) (Fig. 11B) y actividad traduccional relativa (RTA) (Fig. 10C) (Fig. 11C), donde las actividades de ambos cistrones obtenidas en presencia del siRNA-SC fueron llevadas a 1 (Fig. 10B,11C).

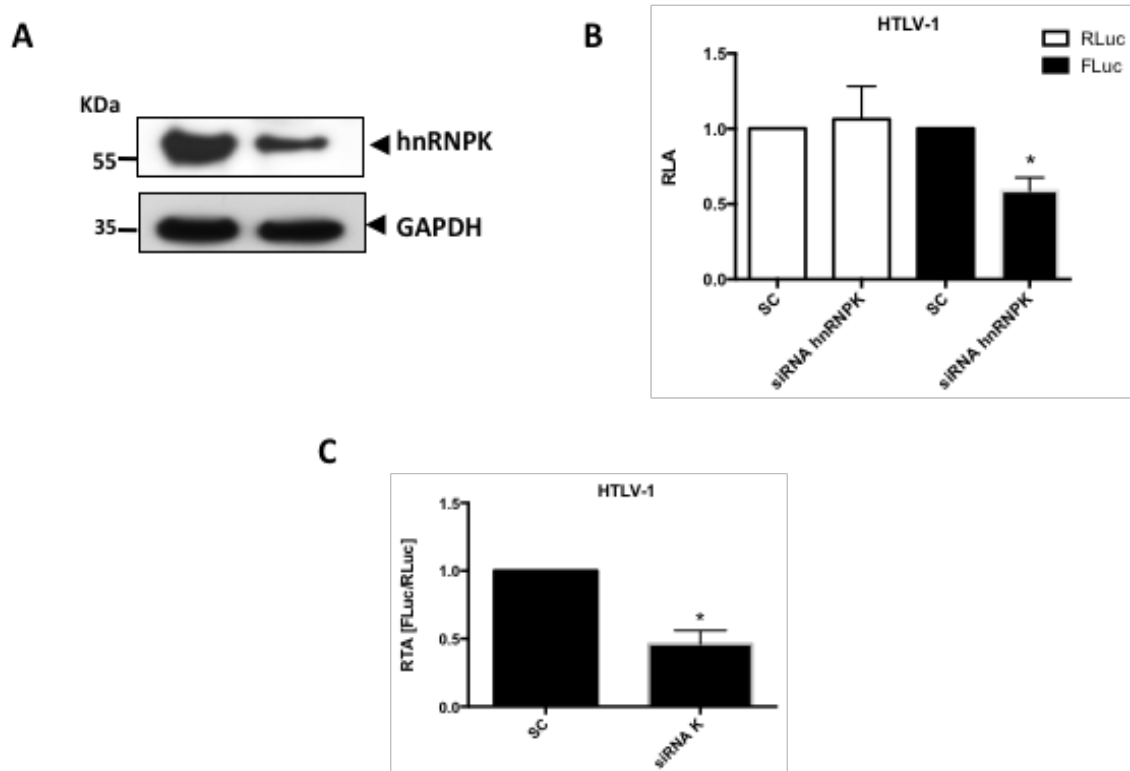


Fig.10. El inicio de la traducción IRES-dependiente de HTLV-1 requiere de la proteína hnRNP K. Células HEK293T, se transfectaron con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con 100 nM de un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNP K (**A**). El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNP K sobre la traducción se muestra como RLA (**B**) o RTA (**C**), considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. Los análisis

estadísticos fueron realizados mediante ANOVA, seguido por comparación múltiple Dunnet **(B)** o t-test no paramétrico. *, $p < 0.05$ versus SC **(C)**.

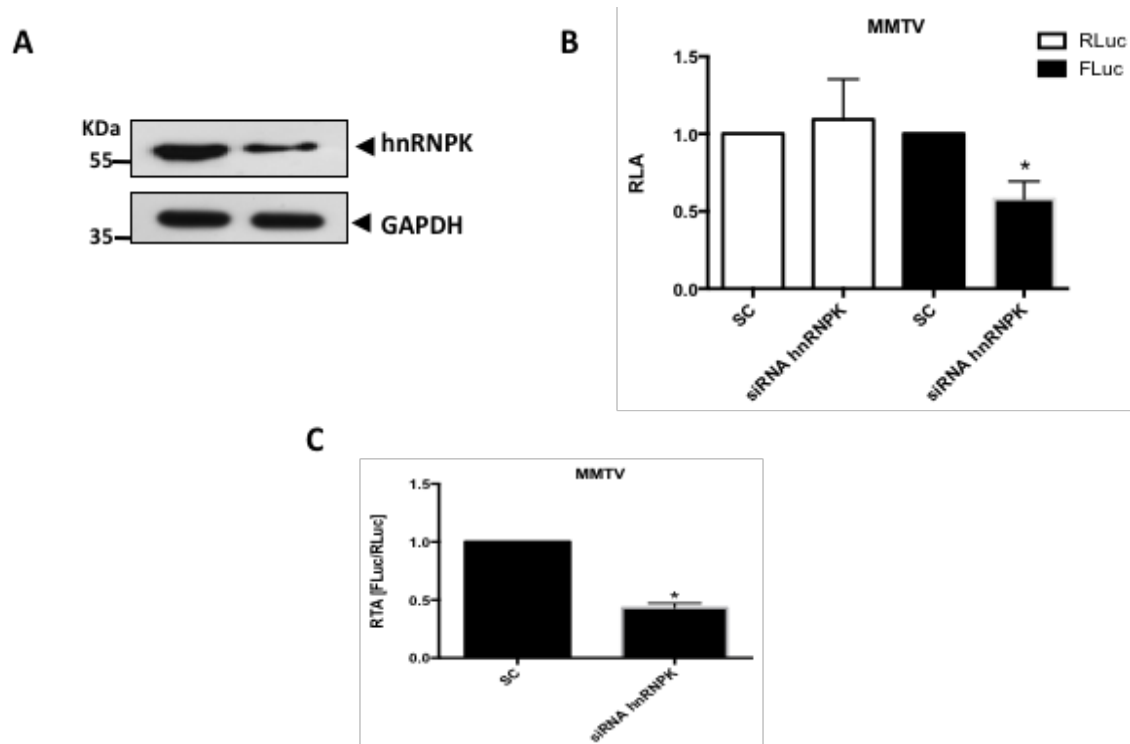


Fig. 11. El inicio de la traducción IRES-dependiente de MMTV requiere de la proteína hnRNP K. Células HEK293T, se transfectaron con 100 nM de un siRNA negativo (SC) o con 100 nM de un siRNA específico para silenciar la expresión de la proteína hnRNP K **(A)**. El efecto del silenciamiento de la proteína hnRNP K sobre la traducción se muestra como RLA **(B)** o RTA **(C)**, considerando los valores obtenidos en presencia del siRNA control como 100 %. Los análisis

estadísticos fueron realizados mediante ANOVA, seguido por comparación múltiple Dunnet **(B)** o t-test no paramétrico **(C)**. *, $p < 0.05$ versus SC.

Los resultados de los ensayos de western blot muestran que se logra un silenciamiento parcial de la expresión endógena de hnRNP K en células HEK293T (Fig. 10A, 11A panel superior), co-transfectadas con los vectores bicistrónicos dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES, respectivamente. Además, el control de carga GAPDH es similar en ambas condiciones (Fig. 10A, 11 A panel inferior), sugiriendo que el silenciamiento de hnRNP K no afecta la traducción global y que cantidades similares de proteínas fueron cargadas en cada carril.

Por otra parte, en ambos experimentos se observa que la reducción de la expresión endógena de hnRNP K no altera la expresión de RLuc (Fig 10 B, 11 B, barras blancas). Sin embargo, la actividad de FLuc mediada por los IRESes de HTLV-1 o MMTV se ven reducidas significativamente. (Fig 10 B, 11 C barras negras). Los resultados también se presentan como RTA, confirmando que el silenciamiento de hnRNP K lleva a una disminución significativa de la eficiencia traduccional en presencia del 5' UTR de HTLV-1 y de MMV, en comparación al control negativo (Fig 10 C Y 11C).

6.2.6 La sobreexpresión de hnRNP K estimula el inicio de la traducción IRES dependiente de HTLV-1 y MMTV.

Se evaluó, además, el impacto de la sobreexpresión de la proteína hnRNP K sobre el inicio de la traducción mediada por los elementos IRES de HTLV-1 y MMTV. Para ello, células HEK293T se co-transfectaron con los plásmidos dl HTLV-1 IRES o dl MMTV IRES junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K. 24 h.p.t, las células se lisaron y se confirmó la sobreexpresión de HA-hnRNP K mediante western blot (Fig. 12, paneles inferiores), utilizando un anticuerpo anti-tag HA. Las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron y los resultados se presentan como RLA (Fig. 12A, C, E) o como RTA (Fig. 12B, D, F), relativo a las actividades obtenidas en ausencia de pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K, las cuales se llevaron al 1.

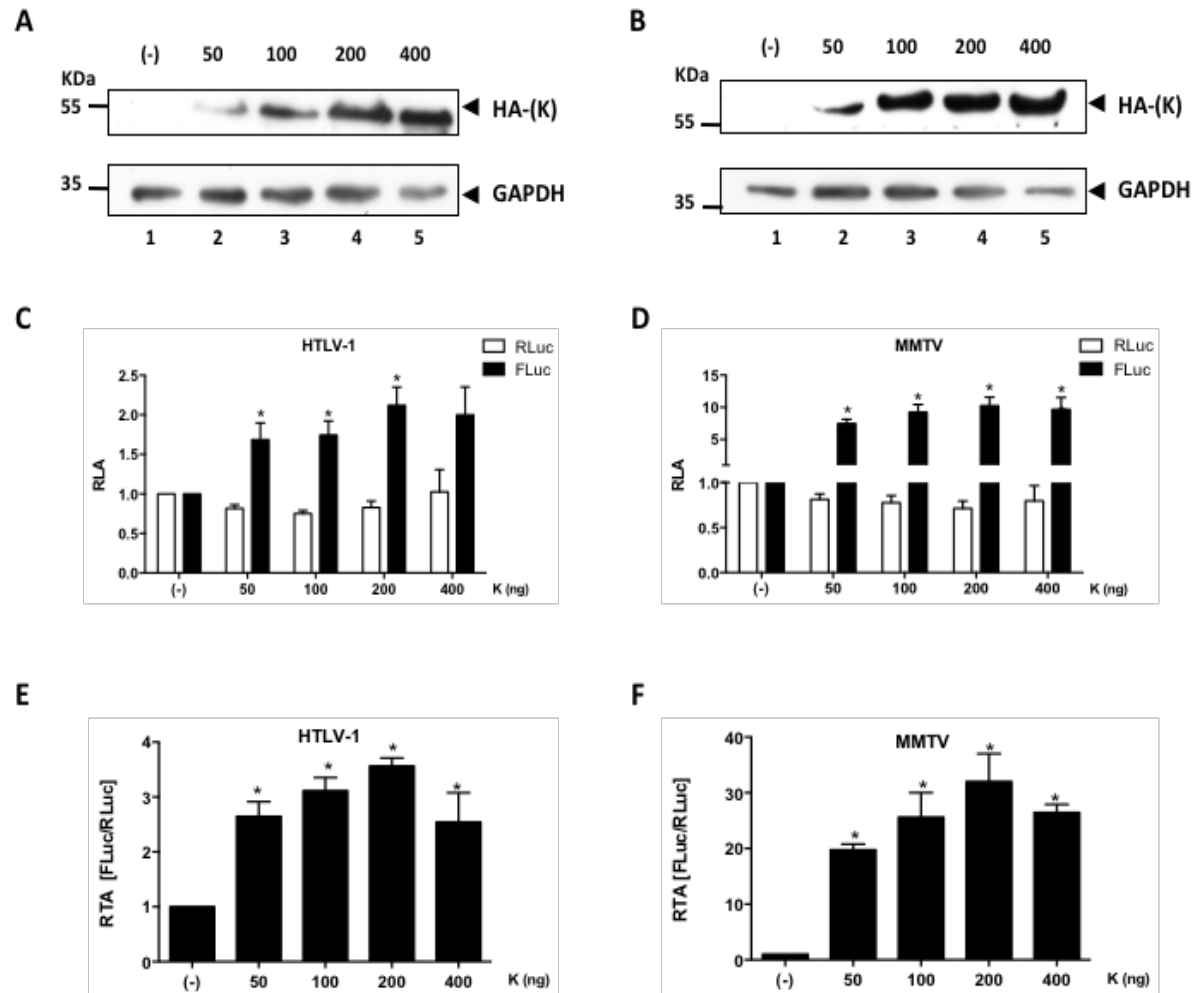


Fig. 12. La sobreexpresión de hnRNP K estimula la actividad de los elementos IRESes de HTLV-1 y MMTV. Células HEK293T co-transfectaron con 200 ng de los plásmidos dl HTLV-1 -IRES (**A**, **C**, **E**) o dl MMTV-IRES (**B**, **D**, **F**) junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del vector pCMV3-SP-N-HA/hnRNP K. (**A**) Análisis de western blot para la detección de la proteína recombinante o el control de carga GAPDH. El efecto de la

expresión de hnRNP K se muestra como RLA **(C, D)** o como RTA **(E, F)**, relativo a la actividad de cada vector bicistrónico en ausencia del plásmido que permite la expresión de hnRNP K. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Dunnet. *, $p < 0.05$.

Los resultados indican que la sobreexpresión de hnRNP K en el contexto de células HEK293T (Fig. 12A y 12B) en presencia del dl HIV-1 IRES ó HTLV-1 IRES, no afecta la actividad cap-dependiente de manera significativa (Fig 12 C y D, barras blancas), para ninguna de las concentraciones utilizadas del vector de sobreexpresión de HA-hnRNP K (Fig 12B). Por otra parte, la sobre-expresión de HA-hnRNP K induce un incremento en la actividad de traduccional IRES-dependiente en los dos modelos retrovirales (Fig. 12C y 12 D, barras negras) (Fig. 12 E y F).

En conjunto, los resultados de los ensayos de silenciamiento y de sobreexpresión de hnRNP K indican que esta proteína actúa como un ITAF, modulando positivamente la actividad de los IRESes de HTLV-1 y de MMTV.

6.2.7. La co-expresión de hnRNP K con otros ITAFs de HIV-1 impacta positivamente sobre la actividad IRES de HIV-1.

A la fecha se han identificado otras proteínas hnRNP como ITAFs para el IRES de HIV-1 [11, 42]. Con el propósito de establecer si existe una relación entre la actividad

de diferentes ITAFs de HIV-1, se evaluó el efecto de la co-expresión de hnRNP K con otros moduladores positivos de la actividad IRES de HIV-1 previamente descritos como son hnRNP A1 y U [11, 42] sobre el inicio de la traducción mediada por el elemento IRES de HIV-1. Los ensayos de co-expresión se realizaron co-transfectando células HEK293T con el plásmido dl HIV-1 IRES junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con los vectores expresores de HA-hnRNP K, Myc-hnRNP A1 y HIS-hnRNP U. Luego de 24h.p.t, se lisaron las células y se determinó las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc. Los resultados se presentan como RLA (Fig. 13 A, C) o RTA (Fig. 13 B) relativo a las actividades obtenidas en ausencia de las proteínas hnRNPs, las cuales se llevaron a 1. Adicionalmente, se confirmó la expresión de las proteínas recombinantes con anticuerpos anti-tags correspondientes (Fig. 13 D).

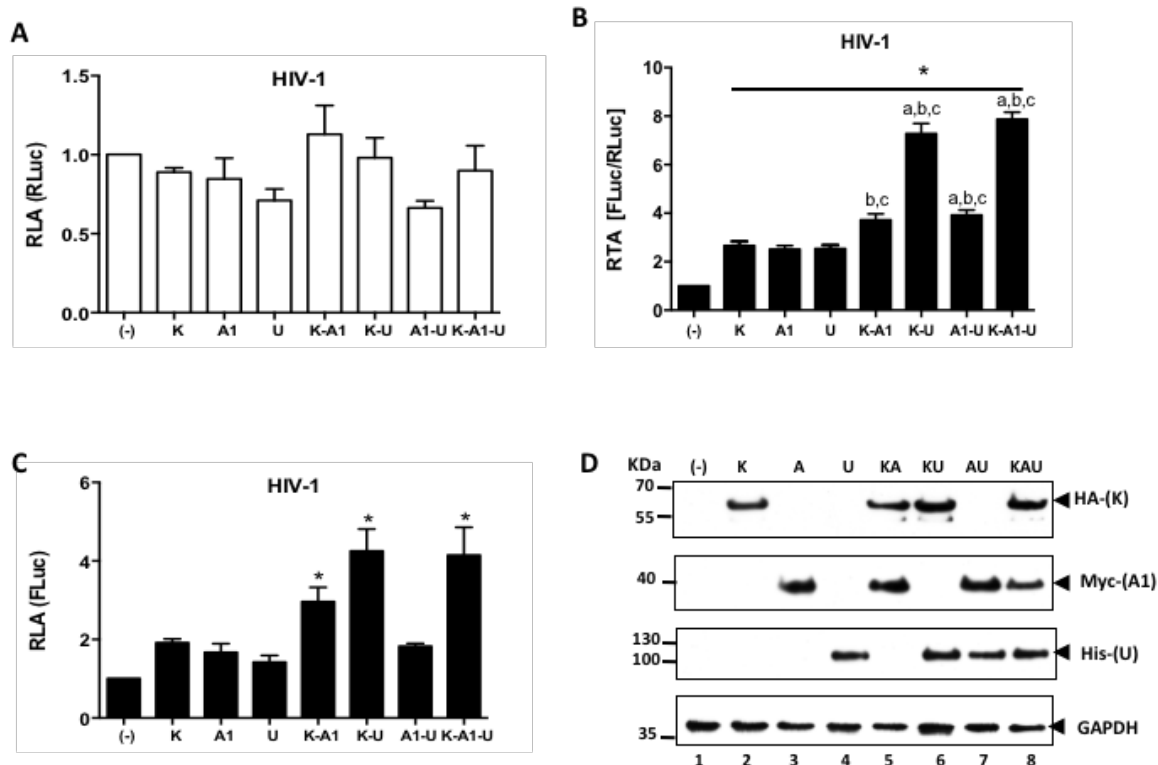


Fig. 13. La coexpresión de hnRNP K, A1 y U estimula la actividad IRES de HIV-1. Células HEK293T se transfectaron con 150 ng del vector dl HIV-1 IRES junto con 125 ng de un vector expresor para las proteínas HA-(K), myc-(A1) o HIS-(U). La actividad IRES fue medida y expresada como RLA (**A**, **B**) o RTA (**C**) relativo a la actividad medida en células HEK293T transfectadas el vector dl HIV-1 IRES con el vector pSP64, el cual se llevó a 1. El panel inferior de (**C**) muestra los análisis de western blot para la detección de las proteínas recombinantes y el control de carga GAPDH. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de

la prueba de Tukey. *, $p < 0.05$ respecto a (-); a, $p < 0.05$ respecto a K; b, $p < 0.05$ respecto a A1; c, $p < 0.05$ respecto a U.

Los resultados muestran que actividad RLuc no se ve afectada de manera significativa por la co-expresión de las proteínas hnRNPs, cuando su traducción es mediada por el IRES de HIV-1 (Fig.13 A). Por otra parte, la actividad FLuc en condiciones de co-expresión de las proteínas hnRNPs (Fig.13 C: K-A1, K-U, K-A-U), aumenta en forma significativa en comparación al efecto inducido por la expresión de cada proteína en forma independiente (Fig. 13 C: K, A, U). Los resultados también se presentan como RTA, confirmando que el efecto de la co-expresión de estas proteínas hnRNP sobre la actividad traduccional guiada por el IRES de HIV-1 es mayor en comparación al efecto inducido por la expresión de cada proteína en forma independiente.

La expresión de cada proteína recombinante fue evaluada mediante ensayos de western blot (Fig 13 D, panel I, II y III). Además, el control de carga GAPDH (Fig 13 D, panel IV) es similar en todos los carriles (Fig 12 D, panel IV), confirmando que cantidades similares de proteínas fueron cargadas en cada carril.

6.2.8. La co-expresión de hnRNP K con otros ITAFs impacta positivamente sobre la actividad IRES de HTLV-1 y MMTV.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la co-expresión de hnRNP K con los ITAFs descritos para HIV-1 IRES en los otros dos modelos de IRES retrovirales de este estudio. La proteína hnRNP U fue descrita como un modulador positivo de actividad IRES en HTLV-1 y MMTV [42]. Sin embargo, la modulación de hnRNP A1 sobre el inicio de la traducción en estos modelos no ha sido previamente descrita. Por este motivo, previo a realizar los ensayos de co-expresión se evaluó el efecto de la sobreexpresión de hnRNP A1 sobre la actividad IRES de HTLV-1 y MMTV (Fig. 14. A y B). Para ello, células HEK293T se co-transfectaron con los plásmidos dl HTLV-1 IRES y dl MMTV IRES junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con concentraciones crecientes del vector de sobreexpresión de hnRNP A1 con tag myc. Para realizar los ensayos de co-expresión, células HEK293T con los plásmidos dl HTLV-1 IRES o dl MMTV IRES junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con los vectores expresores de HA-hnRNP K, Myc-hnRNP A1 y HIS-hnRNP U, como se describe en la sección 5.6. En ambos tipos de ensayos, 24 h.p.t, se lisaron las células y se determinó las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc. Los resultados se presentan como RTA (Fig. 14) relativo a las actividades obtenidas en ausencia de sobreexpresión de las proteínas hnRNPs, llevado a 1. Adicionalmente, se

confirmó la expresión de las proteínas recombinantes con anticuerpos anti-tags correspondientes (Fig. 14 A- D, paneles inferiores de cada figura).

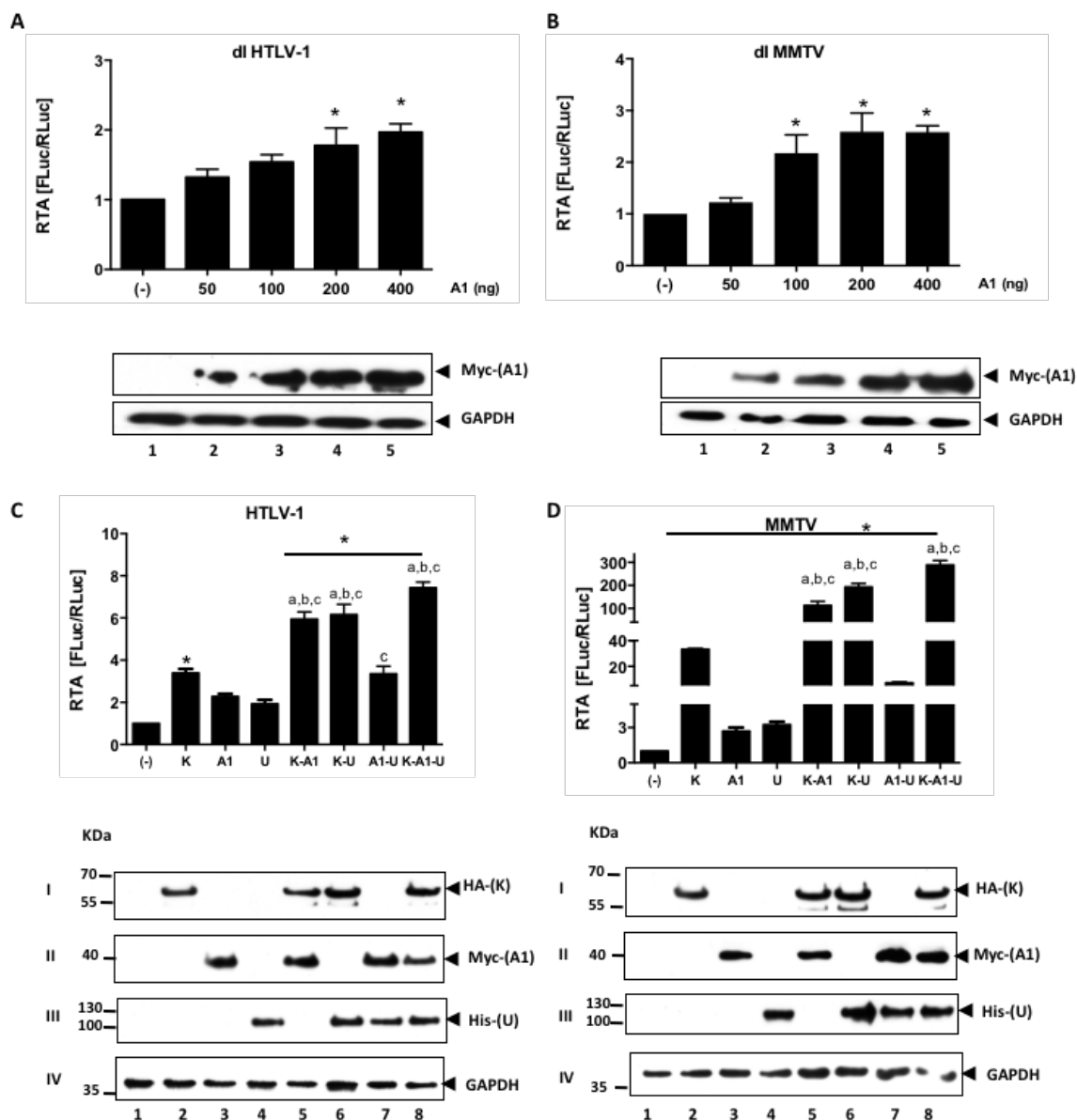


Fig. 14. La coexpresión de hnRNP K, A1 y U estimula la actividad IRES de HTLV-1 y MMTV.

(A) Células HEK293T co-transfectaron con 200 ng de los plásmidos dl HTLV-1-IRES **(A)** y dl MMTV-IRES **(B)** junto con el vector pcDNA3.1 *LacZ* en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del vector pMyc-A1. El efecto de la expresión de Myc-hnRNP A1 se muestra cómo RTA, relativo a la actividad de cada vector bicistrónico en ausencia del plásmido que permite la expresión de hnRNP A1. **(C,D)** Células HEK293T se transfectaron con 150 ng de los vectores dl HTLV-1-IRES **(C)** o dl MMTV-IRES **(D)** junto con 125 ng de un vector expresando las proteínas HA-(K), myc-(A1) o HIS-(U). La actividad IRES fue medida y expresada como RTA relativo a la actividad medida en células HEK293T transfectadas con los vectores bicistrónicos en ausencia de proteínas sobreexpresadas, el cual se llevó a 1. El panel inferior de cada Figura muestra los análisis de western blot para la detección de las proteínas recombinantes o el control de carga GAPDH. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA, seguida de la prueba de Dunnet. *, $p < 0.05$ respecto a (-); a, $p < 0.05$ respecto a K; b, $p < 0.05$ respecto a A1; c, $p < 0.05$ respecto a U.

La sobreexpresión de hnRNP A1 en el contexto de células HEK293T induce un incremento en la actividad de los IRESes de HTLV-1 y MMTV. Por tanto, al igual que para lo ya reportado para el IRES de HIV-1 [11], se concluye que hnRNPA1 es un ITAF para los IRESes de HTLV-1 y MMTV.

Adicionalmente, al evaluar el índice de actividad IRES, RTA, se observó que éste

presenta un mayor aumento cuando hnRNP K, hnRNP A1 y hnRNP U son co-expresadas comparado con el aumento inducido por la expresión de cada proteína en forma independiente, en ambos experimentos (Fig 14 C y D).

La expresión de cada proteína recombinante fue confirmada mediante ensayo de western blot (Fig 14 C y D, panel I, II y III). Además, el control de carga GAPDH de ambos experimentos (Fig 14 C y D, panel IV) es similar en todos los carriles (Fig 14 D, panel IV), confirmando que cantidades similares de proteínas fueron cargados en cada carril.

6.2.9. La proteína HuR interfiere con la modulación positiva de hnRNP K sobre la traducción mediada por el IRES de HIV-1.

La proteína antígeno R humano (HuR), pertenece a la familia de proteínas de visión anormal letal embrionaria y está asociada a diversos procesos celulares como estabilización de mRNA, exporte nuclear y modulación de la síntesis de proteínas [46, 47]. HuR fue previamente descrita como un modulador negativo de la actividad traduccional dependiente de IRES de HIV-1 [26].

Con el fin de establecer la relación entre hnRNP K y el modulador negativo de la actividad IRES HuR, se evaluó el efecto de la co-expresión de hnRNP K y HuR sobre el inicio de la traducción mediada por el IRES de HIV-1. Para ello, células HEK293T se transfectaron con el vector dl HIV-1, junto con el plásmido pcDNA 3.1 *LacZ* y con los vectores expresores de HA-hnRNP K y HuR en las cantidades indicadas en la Figura 14. Luego, las células se lisaron y las actividades enzimáticas de RLuc y FLuc se determinaron como se describe en la sección 5.7. Los resultados se presentan como RLA (Fig. 15 A, B) o RTA (Fig. 15 B) relativo a las actividades obtenidas en ausencia de las proteínas hnRNPs, las cuales se llevaron a 1. Adicionalmente, se confirmó la expresión de las proteínas recombinantes con anticuerpos anti-tags correspondientes (Fig. 15 D).

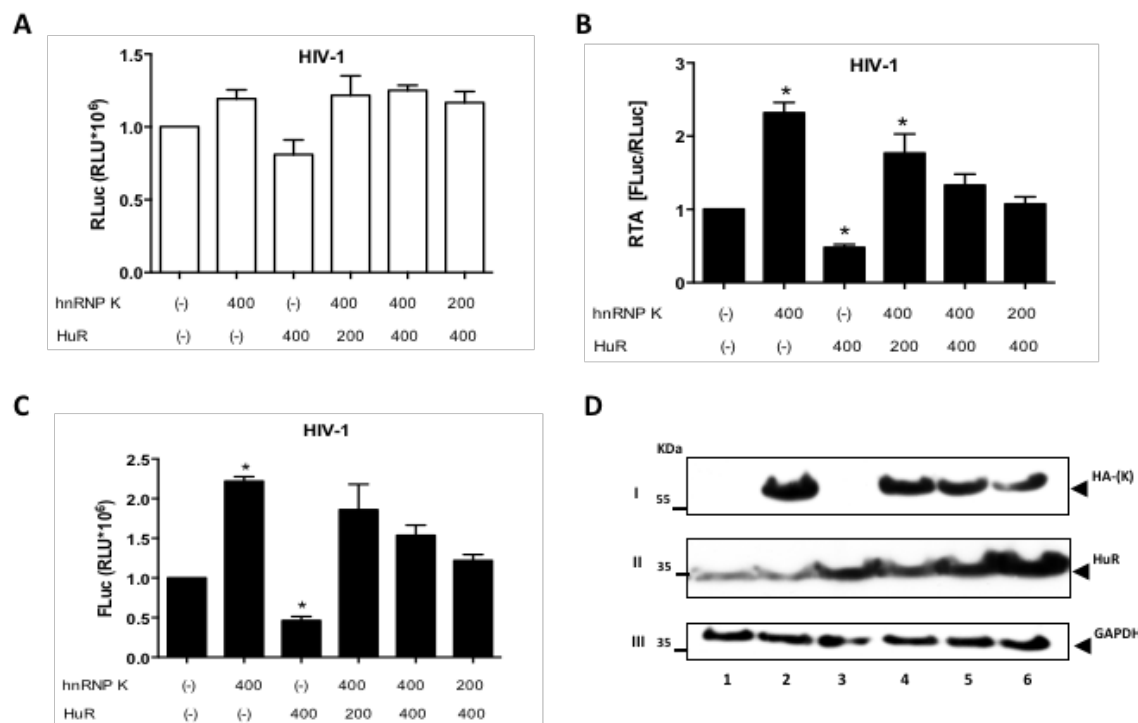


Fig. 15. HuR inhibe la actividad estimuladora de hnRNP K sobre el IRES de HIV-1 en células HEK293T. Células HEK293T se transfectaron con (200ng) del plásmido dl HIV-1 IRES, junto con (200-400 ng) de los plásmidos que codifican para HuR y HA-hnRNP K. La actividad IRES fue medida y expresada como RLA **(A,C)** o RTA **(B)** relativo a la actividad medida en células HEK293T transfectadas con el plásmido dl HIV-1 con el vector pSP64, el cual se llevó a 1. **(D)** Análisis de western blot para la detección de las proteínas sobreexpresadas o el control de carga GAPDH. * $p < 0,05$ respecto a (-).

Los resultados muestran que actividad RLuc, que da cuenta de la traducción cap-dependiente, no se ve afectada de manera significativa por la expresión de HA-hnRNP K, HuR, ni por la co-expresión de ambas proteínas, cuando su traducción es mediada por el IRES de HIV-1 (Fig.15 A). Por otra parte, la sobreexpresión de HA-hnRNP K y HuR inducen un aumento y una reducción de la actividad FLuc, respectivamente, en comparación al control negativo (Fig 15 B). Esto indica que los controles están en concordancia con el efecto previamente descrito para hnRNP K, así como la modulación negativa sobre el elemento IRES de HIV-1, la cual ha sido reportada previamente [26]. Al co-expresar HA-hnRNP K con concentraciones crecientes de HuR, se observa una disminución de la actividad FLuc. Este efecto se observa más claramente al evaluar el índice de actividad IRES (RTA), de HIV-1 (Fig 15 B). La expresión de las proteínas fue confirmada mediante ensayo de western blot (Fig 15 D, panel I y II). Además, el control de carga GAPDH (Fig 15 D, panel III) es similar en todos los carriles (Fig 15 D, panel IV), confirmando que cantidades similares de proteínas fueron cargados en cada carril.

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína HuR inhibe la inducción de la actividad IRES de HIV-1 ejercida por hnRNP K en el contexto de células HEK293T.

6.3.1. Interacción de hnRNP K con hnRNPA1, hnRNP U y HuR en células HEK293T.

Habiendo establecido que las proteínas hnRNP U, hnRNP A1 en conjunto con hnRNP K estimulan la actividad IRES retroviral y a su vez que HuR era capaz de inhibir la estimulación ejercida por hnRNP K sobre el IRES de HIV-1, surge la posibilidad que estas proteínas ITAF formen parte de un complejo junto a hnRNP K. Por tanto, se decidió evaluar si hnRNP K es capaz de interactuar de manera directa con las otras proteínas ITAFs estudiadas, en presencia del 5' UTR de HIV-1. Este estudio se realizó utilizando las técnicas de CO-IP y PLA, según se describe en la sección 5.9. Es así como se evaluó interacción entre HA-hnRNP K con Myc-hnRNP A1(Fig. 16), entre HA-hnRNP K y HIS-hnRNP U (Fig.17), y entre hnRNP K y HuR (Fig.18), en presencia o ausencia del dl HIV-1 IRES.

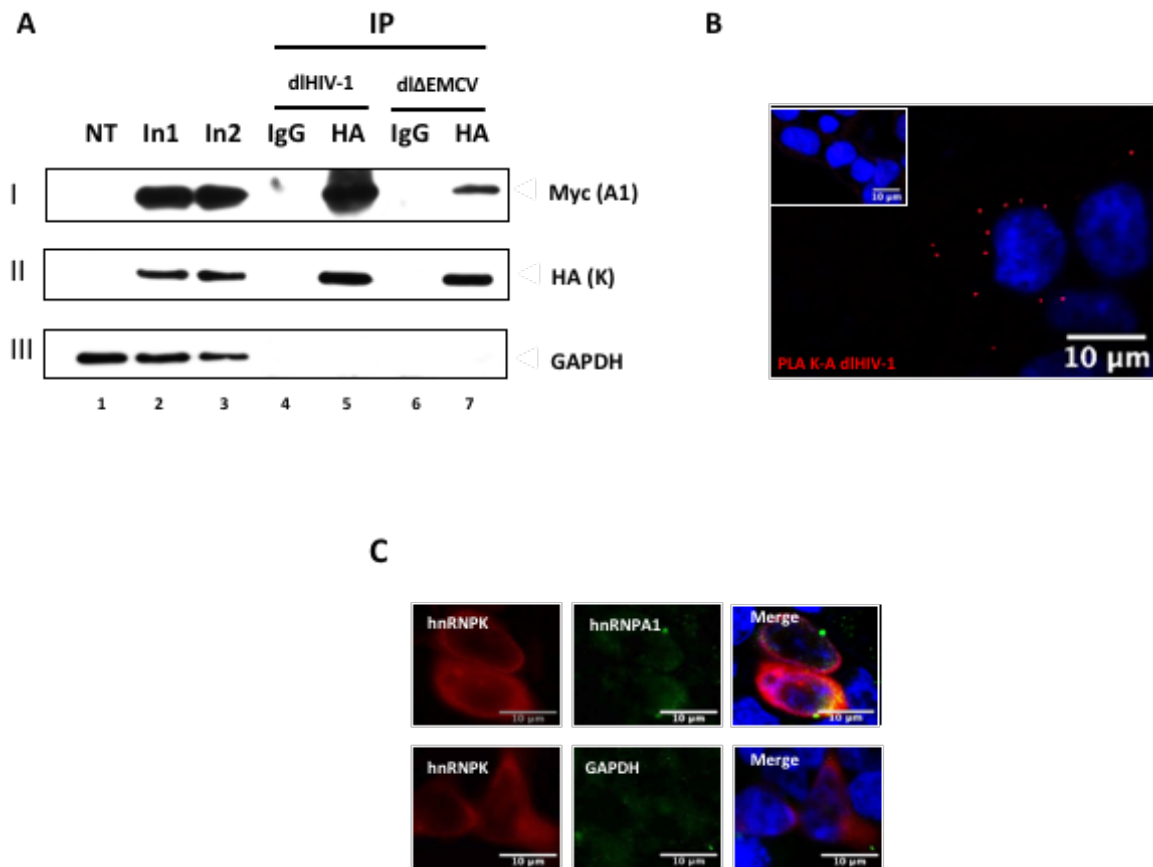


Figure 16. hnRNP K interactúa con hnRNP A1 en células HEK293T. (A) Células HEK293T fueron transfectadas con 1 μ g de los plásmidos dl HIV-1 IRES o dlΔEMCV junto con 7 μ g de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y Myc- hnRNP A1. 48 h.p.t las células fueron lisadas. Los extractos celulares fueron utilizados para inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-HA de ratón (α HA) o anticuerpo control IgG de ratón (α IgG). Proteínas desde las fracciones input (In) e IP fueron utilizadas para ensayos Western blot usando un anti-Myc (panel I), anti-HA (panel II), o anti-GAPDH (panel III). Como anticuerpo secundario, el panel II fue incubado

con proteína A/G-HRP, panel I con anticuerpo anti-conejo-HRP y el panel III con anticuerpo anti-mouse-HRP. NT: no transfectada, In: input. **(B)** Células HEK293T fueron co-transfectadas con 0.25 µg de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y Myc- hnRNP A1 en presencia de dl HIV-1 IRES . A las 24 h.p.t, la interacción entre las proteínas hnRNPs fue analizada por PLA. Los puntos rojos indican proximidad menor a 40 nm entre estas proteínas. El cuadro más pequeño en la esquina superior izquierda corresponde al control de PLA sin anticuerpos primarios. Barra de escala 10 µm. **(C)** La expresión de las proteínas en células HEK293T fue analizada mediante ensayos de IFI utilizando anticuerpos contra los tags de estas proteínas.

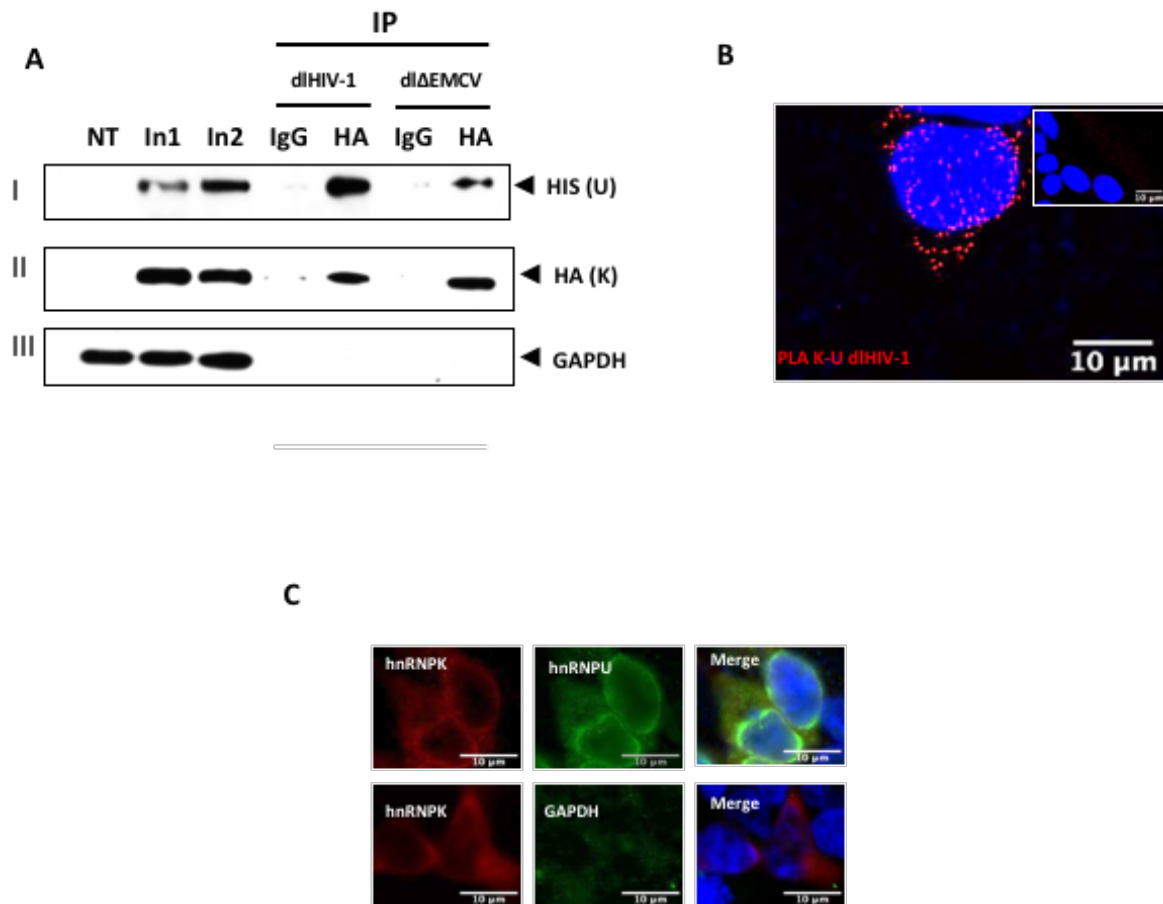


Figure 17. hnRNP K interactúa con hnRNP U en células HEK293T. A) Células HEK293T fueron transfectadas con 1 μ g de los plásmidos dl HIV-1 IRES o dlΔEMCV junto con 7 μ g de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y HIS- hnRNP U. 48 h.p.t las células fueron lisadas. Los extractos celulares fueron utilizados para realizar ensayos de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-HA de ratón (α HA) o anticuerpo control IgG de ratón (α IgG). Proteínas desde las fracciones input (In) e IP fueron utilizadas para ensayos Western blot usando un

anti-HIS (panel I), anti-HA (panel II), o anti-GAPDH (panel III). Como anticuerpo secundario, el panel II fue incubado con proteína A/G-HRP, paneles I y III con anticuerpo anti-ratón-HRP. NT: no transfectada, In: input. **(B)** Células HEK293T fueron co-transfectadas con 0.25 μ g de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y HIS- hnRNP U en presencia de dl HIV-1 IRES . A las 24 h.p.t, la interacción entre las proteínas hnRNPs fue analizada por PLA. Los puntos rojos indican proximidad menor a 40 nm entre estas proteínas. El cuadro más pequeño en la esquina superior izquierda corresponde al control de PLA sin anticuerpos primarios. Barra de escala 10 μ m. **(C)** La expresión de las proteínas en las condiciones utilizadas fue analizada mediante ensayos de IFI utilizando anticuerpos contra los tags de estas proteínas.

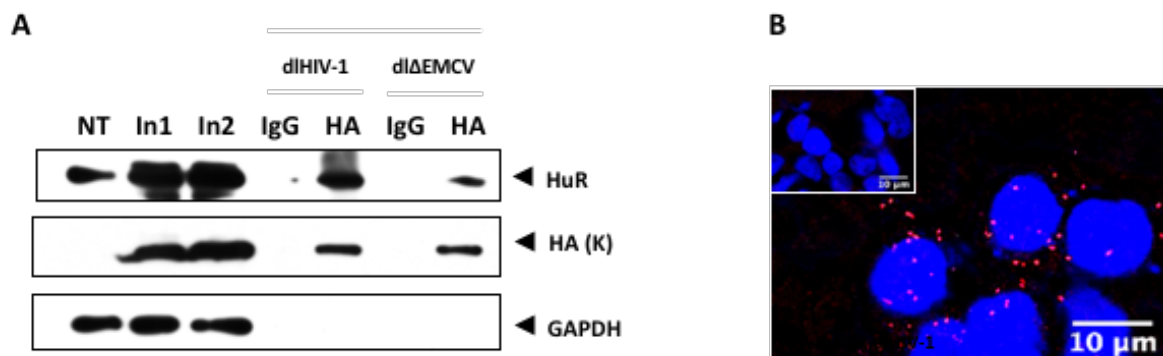


Figure 18. hnRNP K interactúa con hnRNP HuR en células HEK293T. A) Células HEK293T fueron transfectadas con 1 μ g de los plásmidos dl HIV-1 IRES o dlΔEMCV junto con 7 μ g de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y HuR. 48 h.p.t las células fueron lisadas. Los extractos celulares fueron utilizados para inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-HA de

ratón (α HA) o anticuerpo control IgG de ratón (α IgG). **(A)** Proteínas desde las fracciones input (In) e IP fueron utilizadas para ensayos Western blot usando un anti-HuR (panel I), anti-HA (panel II), o anti-GAPDH (panel III). Como anticuerpo secundario, el panel II fue incubado con proteína A/G-HRP, paneles I y III con anticuerpo anti-ratón-HRP. NT: no transfectada, In: input. **B)** Células HEK293T fueron co-transfectadas con 0.25 μ g de los plásmidos que codifican para HA- hnRNP K y HuR en presencia de dl HIV-1 IRES . A las 24 h.p.t, la interacción entre las proteínas hnRNPs fue analizada por PLA. Los puntos rojos indican proximidad menor a 40 nm entre estas proteínas. El cuadro más pequeño en la esquina superior izquierda corresponde al control de PLA sin anticuerpos primarios. Barra de escala 10 μ m.

Al evaluar los ensayos de CO-IP entre HA-hnRNP K con Myc-hnRNP A1 (Fig. 16), His-hnRNP U (Fig.17) y HuR (Fig.18), se puede evidenciar claramente la sobreexpresión HA-hnRNP K en los extractos input (Fig 16, 17 y 18, in: carriles 2 y 3), comparado con los extractos generados desde células no transfectadas (Fig 16, 17 y 18, panel 2, nt: carril 1). Además, HA-hnRNP K solo fue detectada cuando el ensayo de IP se realizó utilizando esferas pA/G conjugadas con el anticuerpo α HA (Fig. 16, 17, 18, panel II, carriles 5 y 7) y no cuando las esferas PA/G fueron conjugadas con el anticuerpo control α IgG (Fig 16, 17, 18, panel II, carriles 4 y 6, IP), asegurando la especificidad de la IP de HA-K. La comparación de la expresión de la proteína GAPDH en las condiciones input sugiere que se cargaron cantidades similares de proteínas en todos los carriles.

(Fig 16, 17, 18, panel III, carriles 2 y 3, in). Finalmente, la detección de las proteínas recombinantes Myc-hnRNP A1 (Fig 16, panel I, carriles 5 y 7), His-hnRNP U (Fig 17, panel I, carriles 5 y 7) y de la proteína HuR (Fig 18, panel I, carriles 5 y 7), permiten concluir estas tres proteínas forman complejos con HA-hnRNP K en presencia del 5'UTR de HIV-1 (Fig 16, 17 y 18, Panel I, carril 5), como en presencia del dl Δ EMCV. Como control, se realizaron estos ensayos de CO-IP en presencia del vector dl Δ EMCV. Los resultados muestran que en estas condiciones aún se observa formación de complejos entre las proteínas evaluadas, aunque en menor grado, en comparación a las CO-IP realizadas en presencia del dl HIV-1 IRES (Fig 16, 17 y 18 comparar panel I, carriles 5 y 7 de cada figura). Además, la asociación entre las proteínas ITAFs HA-hRNP K y Myc- hnRNP A1, entre HA-hRNP K y HIS- hnRNP U y entre HA-hRNP K y HuR fue confirmada por ensayos de PLA realizados en presencia del dl HIV-1. Los *dot plots* indican que existen puntos de asociación entre estas proteínas. (Fig. 16 B, 17 B, Y 18B).

En conjunto, los ensayos de CO-IP permiten concluir que HA-hnRNP K forma complejos con otros ITAFs descritos para HIV-1, como son hnRNP A1, hnRNP U y HuR.

7. DISCUSIÓN

Se ha postulado que la presencia de un elemento IRES en el 5'UTR del gRNA retroviral le otorgaría una ventaja traduccional sobre los mRNAs celulares durante la infección viral, bajo condiciones de estrés, o durante fases específicas del ciclo celular, condiciones en las cuales la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida [8-12]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que determinan el reconocimiento de los IRESs por parte de la maquinaria de inicio de la traducción celular no son del todo claros. Se ha descrito que los elementos IRESs retrovirales requieren de ITAFs para asegurar su traducción [34]. En este trabajo de tesis se evaluó el rol de la proteína hnRNP K sobre el inicio de la traducción dependiente de IRES en tres modelos retrovirales. La proteína hnRNP K pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneo nucleares [34] y fue identificada en una aproximación proteómica realizada en el laboratorio de Virología Molecular, PUC, basada en cromatografía por afinidad a RNA denominada GRNA (Glutathione RNA affinity chromatography) acoplada a espectometría de masas [27], el cual permitió identificar proteínas que interactúan con las regiones 5'UTR de los gRNAs de HIV-1 y HTLV-1. Los resultados de este estudio muestran que la proteína hnRNP K deslocaliza desde el núcleo al citoplasma en presencia de un clon infeccioso de HIV-1, sugiriendo un rol citoplasmático de hnRNP K

durante el ciclo viral de HIV-1. Mediante ensayos de UV-CLIP/q-RT-PCR se determinó que hay una asociación directa entre hnRNP K y la región 5'UTR de estos retrovirus.

Los resultados funcionales indican que esta proteína actúa como un ITAF para los elementos IRESs de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Finalmente los ensayos de co-expresión y CO-IP sugieren que hnRNP K actúa en asociación con otros ITAFs en la modulación de la actividad traduccional IRES-dependiente apoyando el modelo de la formación de un RNP-IRES.

7.1 La Proteína hnRNP K deslocaliza desde el núcleo al citoplasma en presencia de un clon infeccioso de HIV-1.

HnRNP K es una proteína predominantemente nuclear, involucrada en diversos procesos del metabolismo del RNA, incluyendo regulación del *splicing*, exporte nuclear, estabilidad de mRNA e inicio de la traducción mediado por IRES [37]. HnRNP K se ha descrito como una proteína *shuttle*, la cual puede localizar bidireccionalmente entre el núcleo y el citoplasma [78] Se ha observado que la infección de células con el virus de estomatitis vesicular induce una relocalización de hnRNP K desde el núcleo al citoplasma [38]. Además, se ha reportado previamente que la fosforilación de hnRNP K por ERK, induce una acumulación citoplasmática de hnRNP K [79], y aumenta la

traducción de c-myc [31,80]. Adicionalmente, hnRNP K fue descrita también aberrantemente localizada en el citoplasma en cáncer colorectal, induciendo la traducción IRES dependiente de la proteína p58BTK, una isoforma oncogénica en cáncer de colon [81].

En base a estos antecedentes, y con el fin de establecer a hnRNP K como un ITAF candidato, el cual se prevé que durante la infección con HIV-1 debiese relocalizarse al citoplasma, la primera aproximación experimental utilizada consistió en identificar mediante western blot la presencia de la proteína en extractos completos, nuclear y citoplasmático provenientes de células HEK293T, HeLa y Jurkat con el objetivo de evaluar su distribución en las distintas fracciones. Los resultados obtenidos permiten identificar que en las diferentes líneas celulares su localización es predominantemente nuclear (Fig. 3). Luego, se evaluó su localización en presencia de un clon infeccioso de HIV-1 y se observó que posterior a la transfección con el clon infeccioso pNL4.3, hay una relocalización de la proteína desde el núcleo al citoplasma (Fig.4). Un estudio previo reportó una disminución en la producción de la proteína viral p24 de HIV-1 dado por la depleción de hnRNP K utilizando la estrategia de siRNA [85]. En este trabajo de tesis, se observó que la depleción parcial de hnRNP K tuvo un impacto negativo sobre la traducción de Gag en un clon molecular de HIV-1 (Fig. 5). Estos resultados sugieren que la localización citoplasmática de hnRNP K podría ser

importante durante el curso de la replicación de HIV-1, particularmente en traducción y confirmaron a esta proteína como un ITAF candidato retroviral.

7.2 La proteína hnRNP K se une a la región 5'UTR de HIV-1 en células.

La interacción de hnRNP K con las regiones 5' UTR de HIV-1, HTLV-1 y MMTV podría ocurrir a través de dos mecanismos distintos. El primero de ellos comprende la asociación de un factor celular al IRES el que provocaría un cambio conformacional en la estructura del elemento y permitiría el posterior reclutamiento de hnRNP K y el segundo mecanismo comprende una interacción directa de la proteína con el mRNA. Considerando que la proteína hnRNP K posee 3 dominios KH, responsables de su unión a DNA/RNA [30], que su participación descrita en el inicio de la traducción IRES-dependiente en otro modelo, como es el caso del mRNA de c-myc involucra una interacción directa proteína-RNA [31], y existen sitios putativos de unión de hnRNP K a las regiones 5'UTR de HIV-1, HTLV-1 y MMTV (sitios UCCU, UCCCU) [32,33] , nos pareció pertinente evaluar la capacidad de interacción directa de hnRNP K con la región 5'UTR de HIV-1, HTLV-1 y MMTV. Estos resultados validan la identificación de hnRNP K como una proteína de asociación a la región 5' UTR de HIV-1 de acuerdo a los experimentos de espectometría, previamente realizados en el Laboratorio de Virología Molecular, PUC [19, 42]. Dado que en el ensayo de UV-CLIP la exposición de las células

a un pulso de luz UV induce la formación de enlaces covalentes entre proteínas y ácidos nucleicos en asociación física directa [29], se pudo demostrar que la proteína hnRNP K interactúa con el dl HIV-1 IRES (Fig. 6) directamente. Sin embargo, no es posible determinar con este ensayo el lugar específico de interacción.

7.3. La proteína hnRNP K actúa como un ITAF, modulador positivo para los IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

Considerando que la proteína hnRNP K es un ITAF candidato de los IRESes retrovirales, nos pareció permitiente evaluar la participación de esta proteína en la traducción mediada por el IRES de HIV-1. Para ello, se realizó un ensayo de silenciamiento y sobreexpresión de la proteína (Figs. 7 y 8). Los resultados de este ensayo nos permiten establecer que hnRNP K es un ITAF que estimula la actividad del IRES de HIV-1. Adicionalmente se demuestra que este efecto estimulatorio de la expresión de FLuc por parte de hnRNP K no es debido a la formación de un mRNA con 5'Cap y Poli(A) expresando FLuc (Fig.9) generazdo por un proceso de splicing alternativo o bien por la presencia de un promotor críptico en el vector utilizado.

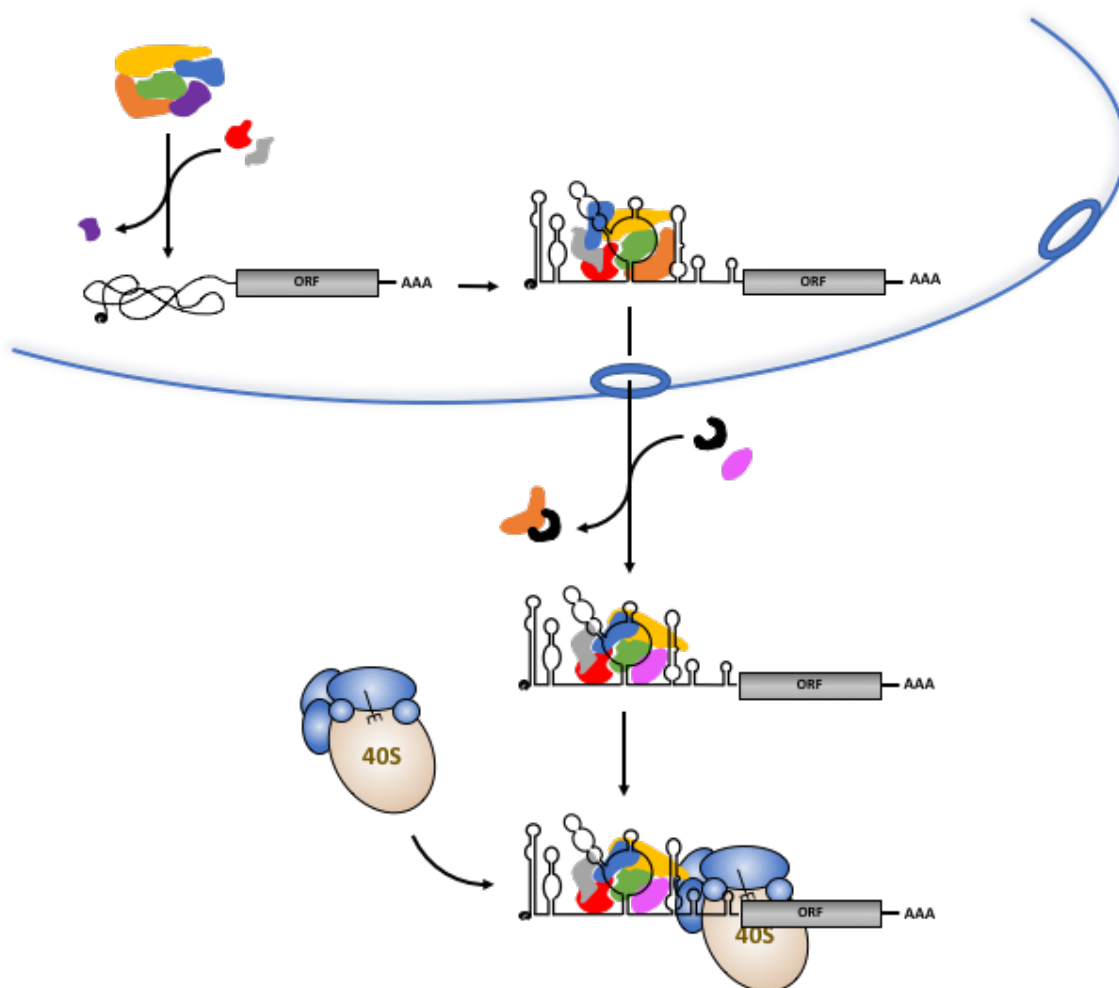
Finalmente, se estableció que los resultados obtenidos para el IRES de HIV-1 eran extrapolables a otros IRESes retrovirales. Por tanto se concluye que que la proteína

hnRNP K actúa como un ITAF, modulando positivamente la actividad IRES de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.

Dado que más de una proteína de la familia de las hnRNPs se ha descrito como ITAF de HIV-1 [11,42], resultó interesante establecer una relación entre la actividad inducida por hnRNP K con otros moduladores positivos de la actividad IRES de HIV-1 previamente descritos como son hnRNP A1 y U [11, 42]. Los resultados de estos ensayos mostraron que la actividad traduccional dependiente de IRES, en condiciones de co-expresión de las proteínas hnRNPs, aumenta en forma significativa en comparación al efecto inducido por la expresión de cada proteína en forma independiente (Fig. 13), confirmando que estas proteínas actúan como ITAFs de estos elementos retrovirales (Fig. 12,13 y 14). Estos resultados sugieren además que estos ITAFs podrían estar actuando como un complejo RNP-IRES, permitiendo la conformación de un IRES funcional (Fig. 19. Modelo de trabajo).

Por otra parte, al extender estos ensayos a los otros dos modelos de IRESes retrovirales de este estudio, se observó diferencias en los tamaños de efectos dados por la co-expresión de hnRNPs. Estas observaciones permiten sugerir que no todos los complejos RNP-IRESs retrovirales son iguales (Fig 9, 10 y 11). Por ejemplo, en el caso del HIV-1-IRES (Fig.13), la co-expresión de hnRNP K con hnRNP A1 tiene un impacto menor sobre la estimulación total de la actividad IRES (47%) comparado con el efecto

de esta co-expresión en presencia del HTLV-1-IRES (80%) o del MMTV-IRES (40%) (Fig 14).



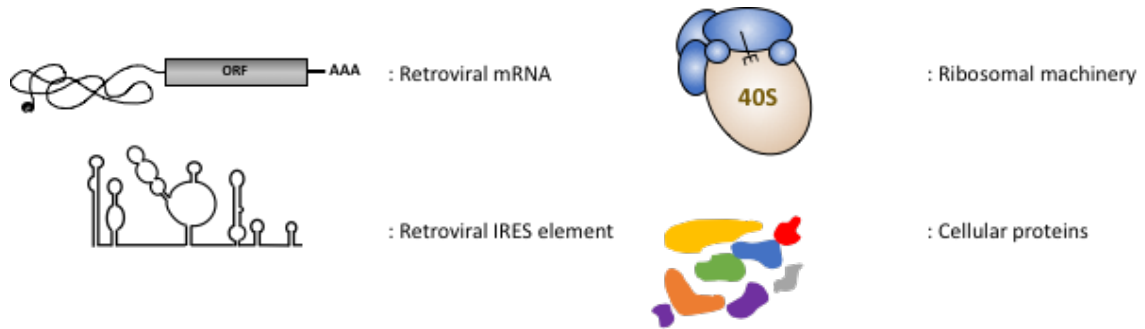


Figura 19. Modelo propuesto. Proteínas de unión a RNA asisten a mRNAs retrovirales permitiendo la conformación de un IRES funcional. Proteínas celulares de localización preferentemente nuclear se unen a la región 5'UTR del mRNA retroviral en el núcleo, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP-IRES), el cual se deslocaliza desde el núcleo al citoplasma. En el citoplasma el RNP-IRES modula el reclutamiento de la maquinaria traduccional al mRNA retroviral.

7.4. La proteína HuR interfiere con la modulación positiva de hnRNP K sobre la traducción mediada por el IRES de HIV-1.

Con el propósito de obtener mayor información de la relación entre la modulación inducida por hnRNP K en asociación con otros ITAFs previamente descritos de HIV-1-

IRES, se realizaron ensayos de co-expresión de hnRNP K con la proteína antígeno R humano (HuR), la cual está asociada a diversos procesos celulares como estabilización de mRNA, exporte nuclear y modulación de la síntesis de proteínas [46, 47]. HuR fue previamente descrita como un modulador negativo de la actividad traduccional dependiente de IRES de HIV-1 [26]. Los resultados de estos ensayos muestran que la sobreexpresión de HuR inhibe la inducción por hnRNP K de la actividad IRES de HIV-1 en el contexto de células HEK293T (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la modulación positiva de ITAFs, en este caso hnRNP K puede ser interrumpida por otras proteínas con modulación antagónica, como lo es HuR.

5. La proteína hnRNP K interactúa con las proteínas hnRNPA1, hnRNP U y HuR.

Dado que más de una proteína es capaz de modular la traducción mediada por el elemento IRES de HIV-1, se decidió evaluar si existe interacción entre estas proteínas en células HEK293T en presencia del 5'UTR de HIV-1 mediante ensayos de CO-IP. Los resultados muestran que la proteína HA-hnRNP K interactúa con las proteínas Myc-hnRNP A1 (Fig.16) y también con HIS- hnRNP U (Fig. 16). Esta observación es interesante, dado que se ha descrito previamente que las proteínas hnRNPs pueden

establecer diversas interacciones del tipo proteína-proteína [86]. Estos antecedentes, junto con los resultados de este trabajo nos permiten especular que uno o más complejos RNP pueden ser dinámicos y que en el caso del IRES de HIV-1, dentro de sus componentes se encontraría la proteína hnRNP K en asociación con otros ITAFs descritos para HIV-1, como son hnRNP A1, hnRNP U.

Por otro lado, mediante CO-IP se pudo confirmar que HA- hnRNP K interactúa también con HuR (Fig.18). Este es un resultado interesante, pues el estudio de Rivas y colaboradores, mencionado anteriormente, indica que HuR no se asocia directamente al 5'UTR de HIV-1 [26]. En ese estudio se planteó que el impacto negativo sobre la actividad IRES de HIV-1 podría ser, por tanto, mediado por una proteína intermediaria. Es probable que HuR se una a hnRNP K y otras proteínas para modular la actividad IRES retroviral.

En el caso de HIV-1, el genoma viral posee alta tasa de mutación debido a la carencia de actividad correctora de la transcriptasa reversa viral [97]. Esto lleva a que se generen cepas resistentes a los efectos de las drogas [97]. La intervención de la asociación virus-hospedero a nivel traduccional (mRNA viral-proteínas asociadas) puede ser entonces visionada como una terapia alternativa en aquellos pacientes en que el virus se vuelve inmune a los efectos del tratamiento estándar. Esto debido a

que esta estrategia involucra asociaciones que han sido generadas, perfeccionadas y conservadas evolutivamente, y por tanto es mas difícil que se pueda generar resistencia. Desde esta perspectiva, los resultados obtenidos para la proteína hnRNP K como un modulador positivo sobre los elementos IRESes de tres retrovirus de géneros diversos [98], sugiere una conservación de la función moduladora de este ITAF y permite proponer a hnRNP K como un blanco terapéutico interesante.

En resumen, los resultados de este trabajo identifican un nuevo modulador de la actividad traduccional mediada por IRES en retrovirus y el impacto de su asociación con otros ITAFs. Los datos generados en este trabajo otorgan nuevas pistas acerca del mecanismo de reclutamiento ribosomal mediado por los elementos IRESs de los mRNAs retrovirales. Se espera que, a largo alcance, este conocimiento sea utilizado en el desarrollo de nuevas estrategias antivirales dirigidos específicamente a la traducción del mRNA retroviral.

8. CONCLUSIONES

- 1. La Proteína hnRNP K deslocaliza desde el núcleo al citoplasma en presencia de un clon infeccioso de HIV-1.**
- 2. La proteína hnRNP K se une a la región 5'UTR del mRNA de HIV-1.**
- 3. La proteína hnRNP K actúa como un ITAF, modulador positivo para los IRESes de HIV-1, HTLV-1 y MMTV.**
- 4. La proteína HuR interfiere con la modulación positiva de hnRNP K sobre la traducción mediada por el IRES de HIV-1.**
- 5. La proteína hnRNP K interactúa con las proteínas hnRNPA1, hnRNP U y HuR.**

Referencias

- 1-. Gebauer F. and Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(10): 827-35.
- 2-. López-Lastra M et al., Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res.* 2005; 38(2-3):121-46.
- 3-. Berkhout B et al., Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(12):5232-44.
- 4-. Pestova TV et al., Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(13): 7029-36.
- 5-. López-Lastra M et al., Translation initiation of viral mRNAs. *Rev Med Virol.* 2010; 20(3): 177-95.
- 6-. Jackson RJ et al., The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(2): 113-27.
- 7-. Balvay L et al., Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(2):128-40.
- 8-. Goh WC et al., HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med.* 1998; 4(1): 65-71.

- 9-. Castelló A et al., HIV- 1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. PLoS One. 2009; 4(11): e7997.
- 10-. Gendron K et al., The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. Nucleic Acids Res. 2011; 39(3):902-12.
- 11-. Monette A et al., Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. J Biol Chem. 2009; 284(45): 31350-62.
- 12-. Holcik M and Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(4): 318-27.
- 13-. Jackson RJ et al., Cap-dependent and cap-independent translation: operational distinctions and mechanistic interpretations. Curr Top Microbiol Immunol. 1995; 203:1-29.
- 14-. Pelletier J and Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature. 1988; 334(6180): 320-5.

- 15-. Buck C. et al., The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Virology*. 2001; 75(1), 181-91.
- 16-. Brasey A et al., The Leader of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G₂ / M Phase of the Cell Cycle. *Journal of Virology*. 2003; 77(7): 3939–49.
- 17-. López-Lastra M et al., Characterization of an internal ribosomal entry segment within the 5' leader of avian reticuloendotheliosis virus type A RNA and development of novel MLV-REV-based retroviral vectors. *Hum Gene Ther*. 1997; 8(16): 1855-65.
- 18-. Olivares E et al., The 5' untranslated region of the human T-cell lymphotropic virus type 1 mRNA enables cap-independent translation initiation. *J Virol*. 2014; 88(11):5936-55.
- 19-. Vallejos M et al., The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(2):618-32.
- 20-. Cochrane AW et al., The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology*. 2006; 3:18.

- 21-. Cristofari G et al., The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002; 72: 223-68.
- 22-. Komar AA and Hatzoglou M., Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.* 2011; 10(2): 229-40.
- 23-. Cáceres CJ et al, Polypyrimidine tract-binding protein binds to the 5' untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA and stimulates cap-independent translation initiation. *FEBS J.* 2016; 283(10): 1880-901.
- 24-. Liu Jet al., Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(2): 308-21.
- 25-. Stoneley M., et al., Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(3): 687-94.
- 26-. Rivas-Aravena A et al., The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology.* 2009; 392(2): 178-85.

27. Czaplinski, K. et al. Identification of 40LoVe, a xenopus hnRNP D family protein involved in localizing a TGF- β -related mRNA during oogenesis', *Developmental Cell*, 2005; 8(4), 505–515.
28. Toro-Ascuy D et al., A Rev-CBP80-eIF4A1 complex drives Gag synthesis from the HIV-1 unspliced mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(21):11539-11552.
29. Wang Z et al., CLIP: construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins in vivo. *Methods.* 2009; 48(3):287-93.
30. Xu Y et al., The multifunctional RNA-binding protein hnRNP K is critical for the proliferation and differentiation of myoblasts. *BMB Rep.* 2018; 51(7):350-355.
31. Evans JR., Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2003; 22(39):8012-20.
32. Cao W et al., Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):8059-71.
33. Thisted T et al., Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and alphaCP-2KL, suggest Distinct modes of RNA recognition. *J Biol Chem.* 2001; 276(20):17484-96.

34. King H. A et al., The role of IRES *trans* -acting factors in regulating translation initiation. *Biochem Soc Trans.* 2010; 38(6):1581-6.
35. Cochrane AW et al., The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology.* 2006; 3:18.
36. Semler, B. L et al., IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes', *Trends Microbiol.* 2008; 16(1): 1–5.
37. Geuens T et al., The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016; 135(8):851-67.
38. Pettit Kneller EL et al., hnRNPs Relocalize to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2009 Jan;83(2):770-80.
39. Burd CG et al., RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 1994 Mar 1;13(5):1197-204.
40. Xiao Ret al., Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation. *Mol Cell.* 2012 Mar 9;45(5):656-68.

41. Vallejos M et al., Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(14): 6186-200.
42. Contreras N. Rol de las proteínas celulares PTB1, Nucleolina y hnRNP en el inicio de la traducción de mRNAs retrovirales mediado por IRESes. Tesis. 2018.
43. Chan JY et al., The transactivation domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overlaps its nuclear shuttling domain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(10):2078-89.
44. Bomsztyk K et al., hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays.* 2004; 26(6): 629-38.
45. Jean-Philippe J., hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(9):18999-9024.
46. Doller A et al., Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(8):2608-25.
47. Galban S et al., RNA binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28 (1), 93–107.

48. Plank TD et al., Internal translation initiation from HIV-1 transcripts is conferred by a common RNA structure. *Translation (Austin)*; 2(1):e27694.
49. Saxena D et al., Drug-Based Lead Discovery: The Novel Ablative Antiretroviral Profile of Deferiprone in HIV-1-Infected Cells and in HIV-Infected Treatment-Naive Subjects of a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Exploratory Trial. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0154842.
50. Cáceres CJ et al., Targeting deoxyhypusine hydroxylase activity impairs cap-independent translation initiation driven by the 5'untranslated region of the HIV-1, HTLV-1, and MMTV mRNAs. *Antiviral Res*. 2016 Oct;134:192-206.
51. Carvajal F et al., Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation. *FEBS J*. 2016 Jul;283(13):2508-27.
53. Horvilleur E et al., Cap-Independent Translation in Hematological Malignancies. *Front Oncol*. 2015; 5:293.
54. Holcik M. Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation in Neuronal Protein Synthesis 2018; *The Oxford Handbook of Neuronal Protein Synthesis*

55. Sriram A et al., Translation acrobatics: how cancer cells exploit alternate modes of translational initiation. *EMBO Rep.* 2018; 19(10). pii: e45947.
56. Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell.* 2003; 95:141-156.
57. Rogers GW et al., Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem.* 2001; 276:30914-30922.
58. Gallie DR et al., The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development.* 1991; 5(11): 2108–2116.
59. Jang SK et al., A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol.* 1988; 62(8): p. 2636-43.
60. Weingarten-Gabbay et al., Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science.* 2016; 15;351(6270). pii: aad4939.
61. Terenin IM et al., A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry. *Mol Cell Biol.* 2005 Sep;25(17):7879-88.

62. Cui Y et al., AtLa1 protein initiates IRES-dependent translation of WUSCHEL mRNA and regulates the stem cell homeostasis of Arabidopsis in response to environmental hazards. *Plant Cell Environ.* 2015; 38: 2098–2114.
63. Li PW et al., The dicistronic RNA from the mouse LINE-1 retrotransposon contains an internal ribosome entry site upstream of each ORF: implications for retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(3):853-64.
64. Ronfort C et al., Characterization of two distinct RNA domains that regulate translation of the Drosophila gypsy retroelement. *RNA.* 2004; 10(3):504-15.
65. Leppek K et al., Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(3):158-174.
66. Ohlmann T et al., An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 11899–11906.
67. Berlioz C et al., An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J. Virol.* 1995; 69, 2214–2222.
68. Deffaud C et al., Characterization of an internal ribosomal entry segment in the 5' leader of murine leukemia virus env RNA. *J. Virol.* 2000; 74: 846–850.

69. Deffaud C et al., Rous sarcoma virus translation revisited: characterization of an internal ribosome entry segment in the 5' leader of the genomic RNA. *J. Virol.* 2000; 74, 11581–11588.
70. He J et al., Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34 cdc2 activity. *J Virol.* 1995; 69: 6705-6711.
71. Datta A et al., Human T-lymphotropic virus type-1 p30 alters cell cycle G2 regulation of T lymphocytes to enhance cell survival. *Retrovirology.* 2007; 4:49.
72. Ventoso I et al., HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *pnas.* 2001; 98(23): 12966–12971.
73. Ohlmann T et al., In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol.* 2002; 318(1): 9–20.
74. Perales C et al., Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett.* 2003; 533: 89-94.
75. Takahashi M et al., HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood.* 2013; 122:715-725.

76. Soto-Rifo R et al., DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J.* 2012; 31:3745-3756.
77. Patry C et al., Targeting heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1 and A2 proteins by RNA interference promotes cell death in transformed but not in normal mouse cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(10):1193-9.
78. Michael WM et al., The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 1997; 16: 3587–3598.
79. Habelhah H et al., ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 325–330.
80. Notari M et al., A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood* 2006; 107: 2507–2516.
81. Grassilli E et al., A novel oncogenic BTK isoform is overexpressed in colon cancers and required for RAS-mediated transformation. *Oncogene.* 2016 Aug 18;35(33):4368-78.
82. Marchand V et al., Identification of protein partners of the human immunodeficiency virus 1 tat/rev exon 3 leads to the discovery of a new HIV-1 splicing regulator, protein hnRNP K. *RNA Biol.* 2011;8: 325-42.

83. Barboro, P et al., Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Lett.* 2014; 352: 152–159.
84. Wilson, J.E et al., Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 4990–4999.
85. Hadian K et al., Identification of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-recognition region in the HIV Rev protein. *J Biol Chem.* 2009; 284: 33384-91.
86. Mikula M et al., Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics.* 2006; 6: 2395-406.
87. Dibrov SM et al., Hepatitis C virus translation inhibitors targeting the internal ribosomal entry site. *J Med Chem.* 2014; 57: 1694-707.
88. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 657-700.
89. Basavapathruni, A. and K.S. Anderson, Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J.* 2007; 21: 3795-808.

90. Rabson, A.B. and B.J. Graves, Synthesis and processing of viral RNA., in Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997; 205-261.
91. Malim, M.H., et al., The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989; 338: 254-7.
92. Kalland, K.H., et al., The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 7436-44.
93. Kutluay, S.B et al., Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog*. 2010; 6: p. e1001200.
94. Manel N et al., The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003; 115:449-459.
95. Komar AA et al., Exploring Internal Ribosome Entry Sites as Therapeutic Targets. *Front Oncol*. 2015; 5:233.
96. Amorim R et al., HIV-1 transcripts use IRES-initiation under conditions where Cap-dependent translation is restricted by poliovirus 2A protease. *PLoS One*. 2014; 9:e88619.

97. Roberts JD et al., The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988; 242:1171-3.
98. Brun-Vezinet F et al., Classification of retroviruses. *Rev Prat*. 1990; 40: 2116-9.