



Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Genética Molecular y Microbiología

TESIS DOCTORAL:

**“ESTRUCTURAS DE RNA Y SU IMPACTO SOBRE EL INICIO DE LA  
TRADUCCIÓN DEL MRNA GENÓMICO DE HIV-1 Y DEL SMRNA DE ANDV”**

Por

FELIPE ALONSO CARVAJAL DÍAZ

Marzo 2019



Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Genética Molecular y Microbiología

**“ESTRUCTURAS DE RNA Y SU IMPACTO SOBRE EL INICIO DE LA  
TRADUCCIÓN DEL MRNA GENÓMICO DE HIV-1 Y DEL SMRNA DE ANDV”**

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile  
como parte de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas mención Genética Molecular y Microbiología

Por

**FELIPE ALONSO CARVAJAL DÍAZ**

Director de Tesis: Dr. Marcelo López L.

Comisión de Tesis: Dr. Patricio Arce J.  
Dr. Pablo González M.  
Dra. Loreto Holuigue B.  
Dr. Eugenio Spencer O.

Marzo 2019

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marcelo López-Lastra, por permitirme aprender a hacer ciencia en su laboratorio.

Agradezco a la Dra. Maricarmen Vallejos, quien fue un pilar fundamental en mi aprendizaje.

Agradezco el apoyo de todos los miembros pasados y presentes del Laboratorio de Virología.

Agradezco al laboratorio del Dr. Bruno Sargueil, quienes me recibieron con los brazos abiertos y permitieron enriquecer mi aprendizaje científico.

Agradezco al laboratorio de la Dra. Sunnie Thompson, por su colaboración en el desarrollo de los experimentos de este trabajo de tesis.

Agradezco a CONICYT, que gracias a su financiamiento hizo posible el desarrollo de este trabajo de tesis.

## RESUMEN

La síntesis de proteínas es el proceso por el cual la información contenida en un RNA mensajero (mRNA) es decodificada para sintetizar la correspondiente cadena polipeptídica. El proceso de síntesis de proteínas se divide en 4 etapas principales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas. El inicio de la síntesis de proteínas, la cual es la etapa más regulada de la traducción, comprende el reclutamiento de los factores de inicio de la traducción y de la subunidad 40S ribosomal sobre el mRNA a ser traducido, el proceso de búsqueda del codón de inicio o *scanning*, y el ensamblaje y posicionamiento del ribosoma 80S sobre el codón de inicio. En el mRNA existen estructuras canónicas necesarias para un proceso eficiente de inicio de la traducción, tales como la estructura cap en el extremo 5', y la cola poliadenilada (poly(A)) en el extremo 3' de éste. Dichas estructuras permiten el reclutamiento de los factores de inicio, así como la circularización no covalente del mRNA. A su vez, las regiones 5' y 3' no traducidas (UTRs) del mRNA contribuyen en la regulación del proceso de inicio, modulando la eficiencia del reclutamiento de la maquinaria traduccional. En este respecto, las estructuras de RNA presentes en las regiones UTR son moduladores importantes del proceso de inicio de la síntesis de proteínas. Algunos mRNAs de origen viral utilizan mecanismos alternativos para reclutar los complejos de inicio de la traducción, otorgándoles una ventaja por sobre los demás mRNAs dentro de la célula. Parte de estos mecanismos no canónico se basan en la presencia de estructuras de RNA en las regiones UTR del mRNA, las cuales pueden mediar la síntesis de proteínas de forma independiente de la estructura cap o de la cola poly(A). Para ahondar en el conocimiento de los mecanismos de regulación del inicio de la traducción no canónico, en este

trabajo de tesis, se eligieron dos modelos de mRNAs virales, los cuales permiten caracterizar por un lado el inicio de la síntesis de proteínas cap-independiente, y por otro, el inicio de la traducción poly(A) independiente.

El primer modelo utilizado fue el mRNA completo del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1). Este mRNA viral posee en su región 5'UTR un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Para este modelo, se determinó el funcionamiento del elemento HIV-1 IRES en diferentes tipos celulares. Se estableció que este IRES es de naturaleza modular, diferenciándose así de los IRES de origen viral. Se determinó además que el elemento HIV-1 IRES no requiere del proceso de *scanning* para iniciar la síntesis de proteínas, reclutando los complejos de inicio directamente sobre el codón de inicio.

El segundo modelo estudiado correspondió al mRNA del segmento S (SmRNA) del *Orthohantavirus Andes* (ANDV). Este mRNA viral posee una estructura 5'-cap, pero carece de cola poly(A). A pesar de esto, el SmRNA es traducido, dando origen a las proteínas virales N y NSs. En este trabajo se caracterizaron las estructuras secundarias de RNA presentes en la región 5' y 3' UTR del SmRNA de ANDV mediante la estrategia de SHAPE. Se determinó la estructura de la región 5'UTR y se estableció que las estructuras de RNA presentes en ella regulan el inicio de la traducción del SmRNA. Para la región 3'UTR del SmRNA, se caracterizó las estructuras de RNA existentes, sin embargo, no fue posible asignar una estructura única a esta región puesto que los resultados sugieren que más bien se comportaría como un elemento dinámico.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten ahondar en el entendimiento de la regulación del proceso de inicio de la síntesis de proteínas no canónico en modelos de mRNAs virales.

## ABSTRACT

Protein synthesis is the process by which the information encoded in a messenger RNA (mRNA) is decoded to synthesize the corresponding polypeptide chain. The protein synthesis process is divided in 4 steps: initiation, elongation, termination and recycling of ribosomes. The initiation step of the protein synthesis, which is the most regulated step, comprises the recruitment of the initiation factors and the 40S ribosomal subunit to the mRNA, the search for an adequate start codon (scanning), and the assembly and positioning of the 80S ribosome on the start codon. There are canonical structures in the mRNA, necessary for an efficient translation initiation process, such as the 5' end cap structure, and the polyadenylated tail (poly(A)) in the 3' end of the mRNA. Both structures allow the recruitment of the initiation factors, and the non-covalent circularization of the mRNA. Likewise, the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of the mRNA contribute to the regulation of the initiation process, modulating the efficiency of the recruitment of the translational machinery. In this respect, the RNA structures present in the UTR regions are key modulators of the process of translation initiation. There are mRNAs of viral origin that use alternative mechanisms to recruit the translation initiation complexes, giving them an advantage over other mRNAs inside the cell. Part of these non-canonical mechanisms is based on the presence of RNA structures in the UTR regions of their mRNAs, which can mediate protein synthesis independently of the presence of the cap or the poly(A) structures. In order to deepen the knowledge of the mechanisms that regulate the non-canonical translation initiation process, in this thesis two viral mRNAs models were chosen, which will allow on one side to

characterize the cap-independent initiation process, and on the other side, the poly(A)-independent initiation process.

The first model used was the full-length mRNA of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). This viral mRNA harbors an internal ribosome entry site (IRES) in its 5'UTR. For this model, the functionality of the HIV-1 IRES element was determined in different cell types. Was established that this IRES element is modular in nature, rendering it different from other viral IRES elements. It was also determined that the HIV-1 IRES element does not require the scanning process to initiate the protein synthesis, being able to recruit the initiation complexes directly on the initiation codon.

The second model studied corresponded to the mRNA of the S segment (SmRNA) of the *Orthohantavirus Andes* (ANDV). This viral mRNA have a 5'-cap structure but lacks a poly(A) tail. Despite this, the SmRNA is translated, giving rise to the viral proteins N and NSs. In this thesis, the RNA secondary structures located on the 5' and 3'UTR regions of the SmRNA were characterized, using the SHAPE strategy. The secondary structure of the 5'UTR region was determined and was established that the RNA structures present in it regulate the translation initiation from the SmRNA. For the 3'UTR region, the RNA secondary structures present were characterized, however, was not possible so assign a single structure to this region, due to its dynamic behavior shown by the results.

Altogether, the results obtained in this thesis work allow us to deepen in the understanding of the regulation of the non-canonical translation initiation process in viral mRNA models.

## ABREVIATURAS

mRNA	RNA mensajero
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
ANDV	Orthohantavirus Andes
ITAF	Factor trans-activador de IRES
eIF	Factor eucariótico de inicio de la traducción
DDX3	Helicasa de RNA de la familia de helicasas dependientes de ATP con motivo DEAD
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
HCV	Virus de la hepatitis C
PV	Virus de la poliomielitis
siRNA	RNA de interferencia
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
UTR	Región no traducida
Cap	estructura 5' terminal del mRNA, m7GpppN
Poly(A)	Cola poliadenilada
GTP	Guanosita trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DEAD	Motivo aminoacídico asp-glu-ala-asp
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
DV	Virus del dengue
CITE	Estimulador de la traducción independiente de cap
N	Nucleoproteína de ANDV
NSs	Proteína no estructural del segmento S de ANDV
SHAPE	Acilación selectiva de hidroxilo 2' analizada por extensión de oligonucleótido
RTA	Actividad traduccional relativa, como porcentaje de la razón FLuc/RLuc del control

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Síntesis de proteínas; inicio de la traducción .....	1
1.2. Rol de las Estructuras de RNA en el inicio de la síntesis de proteínas .....	3
1.3. Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) y el inicio no canónico de la síntesis de proteínas .....	5
1.4. IRES de origen viral vs IRES de tipo celular .....	7
1.5. Traducción sin cola poliadenilada (poly(A)). .....	8
1.6. mRNAs modelos para el estudio del inicio no canónico de la traducción. ....	10
1.6.1. <i>IRES de HIV-1, modelo para el estudio del inicio de la traducción IRES dependiente.</i> .....	12
1.6.2. <i>El SmRNA del del Orthohantavirus Andes (ANDV) como modelo de estudio de mRNAs que posee 5'cap pero carece de una cola 3'poly(A).</i> .....	15
1.7. Trabajo propuesto .....	17
<b>2.1. HIPÓTESIS 1</b> .....	<b>19</b>
Objetivo general 1.....	19

<b>2.2. HIPÓTESIS 2 .....</b>	<b>19</b>
Objetivo general 2.....	19
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES.....	20
3.2. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES de mutaciones puntuales.....	21
3.3. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES de mutaciones de delección .....	24
3.4. Construcciones utilizadas a partir del Segmento S de Andes virus.....	26
3.5. Mutaciones sitio-dirigidas región 5'UTR ANDV.....	27
3.6. Western Blot .....	27
3.7. Transfecciones de DNA.....	28
3.8. Transfecciones de RNA.....	29
3.9. Transcripciones in vitro .....	29
3.10. Modificación del RNA para análisis de SHAPE .....	30
3.11. Reacción de transcripción reversa para análisis de SHAPE .....	31
3.12. Análisis datos de SHAPE .....	32
3.13. Predicción de estructura secundaria utilizando información experimental .....	32
3.14. Ensayo de medición de actividad Luciferasa .....	33
<b>4.1. RESULTADOS PARTE 1.....</b>	<b>34</b>
<b>EL IRES PRESENTE EN LA REGION 5' NO TRADUCIDA DEL MRNA GENÓMICO DE HIV-1 ESTÁ CONSTITUIDO POR</b>	
<b>MÓDULOS ESTRUCTURALES DE RNA.....</b>	<b>34</b>
4.1.1. El IRES de HIV-1 es activo en células HeLa y COS-7 .....	34
4.1.2. La actividad FLuc asociada a la construcción bicistronica no se debe la generación de mRNAs alternativos. ....	38
4.1.3. La actividad del elemento HIV-1 IRES depende de la presencia de la proteína ribosomal S25.....	45
4.1.4. Mutaciones estructurales influyen en la actividad del elemento HIV-1 IRES .....	51

4.1.5. El elemento HIV-1 IRES no realiza <i>scanning</i> ribosomal. ....	59
<b>4.2. RESULTADOS PARTE 2.....</b>	<b>63</b>
<b>LAS REGIONES 5' Y 3' NO-TRADUCIDAS DEL MRNA DEL SEGMENTO S DEL ORTHOHANTAVIRUS ANDES POSEEN ESTRUCTURAS SECUNDARIAS ESTABLES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE INICIO DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>63</b>
4.2.1. Las regiones no traducidas del SmRNA son altamente estructuradas .....	63
4.2.2. Estructuras en el 5'UTR modulan el reconocimiento de los codones de inicio del SmRNA .....	76
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>
5.1. Discusión parte 1 .....	82
5.2. Discusión parte 2 .....	88
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>7. PROYECCIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>8. APÉNDICE .....</b>	<b>95</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Construcciones bicistrónicas utilizadas.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 2. Actividad de reporteros bicistrónicos en línea celular HeLa.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 3. Actividad de reporteros bicistrónicos en línea celular COS-7.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 4. Esquema del transcrito producido desde un posible promotor críptico presente en una construcción bicistrónica.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5: Presencia de promotor críptico en células HeLa.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6: Presencia de promotor críptico en células COS-7.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7. Esquema del transcrito generado a partir de un posible proceso de splicing alternativo desde el mRNA bicistrónico.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. Evaluación de splicing alternativo en mRNAs bicistrónicos expresados en células HeLa.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 9. Evaluación de splicing alternativo en mRNAs bicistrónico expresados en células COS-7.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10. Efecto de la ausencia de la Proteína Ribosomal S25 en la síntesis de proteínas cap-dependiente.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11. Efecto del silenciamiento de eS25 en la actividad IRES en el contexto celular HeLa.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12: Recuperación de expresión y funcionalidad de eS25.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 13. Efecto del silenciamiento de eS25 en la actividad IRES en el contexto celular COS-7.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 14: Efecto de mutaciones puntuales en la región 5'UTR de HIV-1 sobre la actividad del elemento HIV-1 IRES.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 15: Esquema de la estructura secundaria de la región 5'UTR de VAR2.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16: Efecto de deleciones estructurales en la actividad del elemento VAR2 IRES, en contexto celular HeLa.</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17. Efecto de deleciones estructurales en la actividad del elemento VAR2 IRES, en contexto celular COS-7.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 18: Actividad IRES en condiciones de inhibición del <i>scanning</i> ribosomal.</b>	<b>60</b>

<b>Figura 19: <i>Scanning</i> ribosomal y actividad del elemento HIV-1 IRES en presencia de la región codificante para Gag.</b>	<b>62</b>
<b>Figura 20: Esquema del SmRNA del virus andes.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 21: Histograma de la reactividad SHAPE de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV.</b>	<b>65</b>
<b>Figura 22: Estructura secundaria de RNA de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 23: Histograma de la reactividad SHAPE de la región 3'UTR del SmRNA de ANDV.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 24: Estructuras secundarias de RNA propuestas para la región 3'UTR del SmRNA de ANDV.</b>	<b>73</b>
<b>Figura 25: Representación esquemática de los reporteros utilizados y su contexto.</b>	<b>77</b>
<b>Figura 26: Localización de mutaciones dirigidas contra la estructura de la región 5'UTR del SmRNA.</b>	<b>78</b>
<b>Figura 27: Actividad traduccional relativa (RTA) de las mutantes dirigidas contra la estructura secundaria de la región 5'UTR, para los codones de inicio de N y Nss.</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para mutaciones puntuales del elemento HIV-1 IRES.</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para mutaciones de delección de dominios del elemento VAR2 IRES.</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para nuevas construcciones de Andes virus, y para mutaciones dirigidas sobre la región 5'UTR del SmRNA de Andes virus.</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 4: Oligonucleótidos marcados fluorescentemente para análisis de SHAPE.</b>	<b>31</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Síntesis de proteínas; inicio de la traducción

Los RNA mensajeros (mRNA) portan la información genética codificada en el DNA desde el núcleo al citoplasma celular. Los mRNAs eucarióticos poseen en su extremo 5' una estructura cap ( $7\text{mGpppN}$ ), una región 5' no traducida (5'UTR), un marco de lectura abierto (ORF) que contiene la región codificante para una proteína, delimitado por un codón de inicio de la traducción (AUG) y por un codón de término de la traducción (UAA, UAG, UGA), una región 3' no traducida (3'UTR), y la mayoría de los mRNAs presenta una cola poliadenilada (poly(A)) de longitud variable. La traducción de un mRNA es el proceso mediante el cual la información contenida en el ORF de dicho mRNA es decodificada por la maquinaria de síntesis de proteínas para dar origen a una cadena polipeptídica.

El proceso de traducción de los mRNAs se divide en 4 etapas principales: Iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas (Jackson, et al., 2010; López-Lastra, et al., 2005). De estas, la etapa más regulada es el inicio de la traducción, el cual comienza con el reconocimiento de la estructura 5'cap del mRNA por parte del factor eucariótico de inicio (eIF) de la traducción eIF4F, permitiendo el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, la cual recorre la región 5'UTR en búsqueda del codón de inicio, y finaliza con el ribosoma 80S ensamblado sobre el codón de inicio, dando paso a la elongación. El factor eIF4F está constituido por tres proteínas, eIF4E, quien reconoce la estructura 5'cap, eIF4A, una helicasa de RNA, y la proteína eIF4G, una proteína de andamiaje. La proteína eIF4G media la circularización no covalente del mRNA

al interactuar con el extremo 5' vía eIF4E y con el extremo 3' a través de la interacción con la proteína de unión a poly(A) (PABP) (Gallie, 1991; Wells, et al., 1998). El factor eIF4G recluta a la subunidad ribosomal menor, 40S, mediante su interacción con eIF3. La subunidad ribosomal 40S es reclutada como parte de un complejo ternario compuesto por la proteína eIF2, el RNA de transferencia iniciador codificante para metionina ( $\text{tRNAi}^{\text{Met}}$ ), y una molécula de guanosina trifosfato (GTP). Este complejo ternario junto a los factores eIF1, eIF1A, eIF5 y eIF3 forman el complejo de pre-iniciación 43S. Una vez este complejo 43S es acoplado al mRNA comienza un proceso de “*scanning*” a lo largo de la región 5'UTR en dirección 5'a 3' en busca de un codón de inicio AUG en un contexto óptimo, complementario al  $\text{tRNAi}^{\text{Met}}$ . Una vez establecida la interacción codón-anticodón entre el mRNA y el  $\text{tRNAi}^{\text{Met}}$ , el factor eIF2-GTP asociado al complejo 43S hidroliza la molécula de GTP, constituyendo el complejo 48S. Posterior a este evento, se desplazan los factores eIF2-GDP, eIF1, eIF5 y eIF3, para permitir la unión de la subunidad ribosomal mayor (60S) y el factor eIF5B-GTP. Luego de la hidrólisis de eIF5B-GTP y la liberación del factor eIF1A, se ensambla el ribosoma 80S el cual es competente para la etapa de elongación (Jackson, et al., 2010).

## 1.2. Rol de las Estructuras de RNA en el inicio de la síntesis de proteínas

Las estructuras secundarias/terciarias presentes en el mRNA juegan un papel fundamental en todas las etapas de la síntesis de proteínas, especialmente en la regulación del inicio de la traducción. En la región 5'UTR pueden existir estructuras de RNA, las cuales pueden reducir la accesibilidad y el reclutamiento de complejos de inicio sobre la estructura 5'cap, disminuyendo así la eficiencia, o bien inhibiendo el proceso de inicio de la traducción (Babendure, et al., 2006; Kozak, 1989; Mortimer, et al., 2014; Pelletier, et al., 1985b). De encontrarse estructuras estables posicionadas en regiones río abajo de la estructura 5'cap, dichas estructuras pueden restringir el proceso de *scanning*, modulando así también la traducción de un mRNA, y con esto la expresión de la proteína codificada por éste (Babendure, et al., 2006; Kozak, 1989; Mortimer, et al., 2014; Pelletier, et al., 1985b).

En el caso de mRNAs celulares, se ha establecido que la presencia de estructuras de RNA en las regiones aledañas al codón de inicio, afecta la cantidad de ribosomas ensamblados sobre el mRNA, y con ello la eficiencia con la cual dicho mRNA es traducido (Mortimer, et al., 2014). La célula posee diversos mecanismos de control para lidiar con la presencia de estructuras en los mRNAs. Un claro ejemplo es la presencia de la helicasa eIF4A, como parte fundamental del complejo eIF4F. eIF4A permite el avance del complejo de inicio durante el proceso de *scanning* al desestabilizar estructuras secundarias de RNA a lo largo del 5'UTR (Svitkin, et al., 2001). Más aun, está descrito que otras helicasas, como por ejemplo DDX3 (perteneciente a la familia de helicasas con el motivo DEAD (asp-glu-ala-asp) en su sitio activo), pueden también participar en el proceso de inicio de la traducción, ayudando a desestabilizar las estructuras de RNA facilitando dicho proceso (Soto-Rifo, et al., 2012).

La presencia y nivel de estabilidad de las estructuras presentes en la región 5'UTR es utilizado como mecanismo de control para la expresión desde un mRNA determinado. La existencia de estructuras de horquilla a 42 nucleótidos o más de la estructura 5'cap, con un  $\Delta G$  de -30 kcal/mol, son capaces de reclutar los complejos de inicio al cap, pero la traducción se ve inhibida en contexto *in vitro* (Kozak, 1989; Pelletier, et al., 1985b, 1985a). Ensayos similares, realizados en el contexto de transfección en células, describen la inhibición de la traducción de mRNAs que presentan estructuras secundarias con un  $\Delta G$  -30 kcal/mol a diferentes distancias del extremo 5'cap (Babendure, et al., 2006). Estos resultados sugieren que estructuras secundarias con un  $\Delta G$  inferior a -30 kcal/mol inhiben tanto el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal como el proceso de *scanning* (Babendure, et al., 2006).

### 1.3.Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) y el inicio no canónico de la síntesis de proteínas

La presencia de elementos estructurales en la región 5'UTR no necesariamente impactan de manera negativa en el proceso del inicio de la traducción. Es así como se estima que 10% de los mRNA celulares son capaces de iniciar su traducción de manera independiente de la presencia de la estructura 5'cap mediante sitios internos de entrada a ribosomas (IRES) (Pelletier, et al., 1988; Pestova, et al., 1998). Los IRESs se definen como estructuras de RNA que son capaces de reclutar la maquinaria traduccional de manera independiente a los extremos 5' y 3' del mRNA (Chen, et al., 1995). Los IRESs fueron descritos inicialmente en mRNAs virales (S. K. Jang, et al., 1988; Pelletier, et al., 1988), a partir de estudios realizados para definir cómo los mRNAs de la familia viral *Picornaviridae*, los cuales carecen de la modificación 5'cap, eran capaces de reclutar la subunidad 40S ribosomal. Estos estudios llevaron a la caracterización funcional y estructural de los primeros IRESs, y permitieron definir que los IRESs no exhiben secuencia primaria o secundaria conservada, por cuanto su definición se sustenta, hasta hoy, de manera exclusiva en su función (López-Lastra, et al., 2005). Los primeros IRES se identificaron al insertar la región 5'UTR del virus de la poliomielitis (PV) o del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) en la región intercistronica de un plasmidio codificante para dos proteínas reporteras (S. K. Jang, et al., 1988; Pelletier, et al., 1988). La expresión del segundo reportero en este mRNA bicistronico mostro ser independiente de la expresión del primero, el cual es dependiente de la estructura 5'cap. De hecho, se estableció que la expresión del segundo cistron sólo ocurría si la secuencia de RNA inserta entre los cistrones era capaz de reclutar los complejos de inicio de forma interna. Posterior a estos ensayos en un contexto de reporteros bicistronicos, la capacidad de un mRNA de reclutar la maquinaria de traducción de

manera interna fue confirmada utilizando moléculas de mRNA circulares covalentemente cerradas. En estos ensayos sólo un mRNA que contenía un elemento IRES podía iniciar el proceso de traducción (Chen, et al., 1995). Estudios ulteriores demostraron que este mecanismo alternativo de inicio de la traducción no era exclusivo a los mRNAs de los miembros de la familia *Picornaviridae*, siendo de hecho una estrategia utilizada por mRNAs de otras familias virales, incluyendo miembros de las familias *Flaviviridae* (Tsukiyama-Kohara, et al., 1992), *Retroviridae* (Balvay, et al., 2007) y *Herpesviridae* (Griffiths, et al., 2005). También se han encontrado elementos IRES en RNAs de virus de insectos (Sasaki, et al., 1999; Wilson, et al., 2000) y de plantas (Gallie, 2001; Wong, et al., 2008; Zhang, et al., 2015), así como en elementos retrotransposones de roedores e insectos (López-Lastra, et al., 1999; Meignin, et al., 2003; Ronfort, et al., 2004). Los mecanismos de iniciación interna mostraron además no estar restringidos a mRNAs de origen viral. Es así como hoy se estima que hasta un 10% de los mRNAs eucarióticos poseen elementos IRES (S. a Chappell, et al., 2000; Gilbert, 2010; Komar, et al., 2011; Yang, et al., 1997). Para lograr o modular su funcionalidad como IRESs algunos mRNAs requieren asociarse a proteínas accesorias no relacionadas con los componentes canónicos de la traducción (López-Lastra, et al., 2005). Estas proteínas denominadas de manera genérica factores trans-activadores de IRES (ITAFs) actúan como proteínas chaperonas, las que a través de interacciones proteína-RNA y proteína-proteína modifican la estructura del RNA, resultando en una activación, incremento, o disminución de la actividad IRES (Komar, et al., 2011; López-Lastra, et al., 2005).

#### 1.4. IRES de origen viral vs IRES de tipo celular

Todos los IRESs comparten una función similar, la cual corresponde al reclutamiento de la maquinaria de inicio de la traducción. A pesar de esto, los IRES exhiben amplia diversidad estructural, lo que demuestra que múltiples estructuras diferentes de RNA son capaces de reclutar la maquinaria traduccional de manera 5'cap-independiente. Más aun, al comparar los IRES de origen celular y viral aparecen características particulares que los diferencian. Es así como los IRES de tipo viral en general se caracterizan por requerir una alta integridad estructural, lo cual los hace muy susceptibles a mutaciones puntuales a lo largo de su secuencia primaria. En principio, los IRESs virales se comportan como un elemento estructural unimodular (Angulo, et al., 2016; Easton, et al., 2009; Guest, et al., 2004; Hellen, et al., 2001). Esta característica ha permitido además el estudio estructural de los IRESs virales. Dada esta característica unimodular, mutaciones puntuales en la secuencia primaria de los IRESs presente en el mRNA de Picornaviruses, como PV o el virus de la fiebre aftosa (FMDV), o en mRNAs presentes en virus de otras familias como el virus de la hepatitis C (HCV), han demostrado inhibir completamente su actividad (Barría, et al., 2009; Fernández-Miragall, et al., 2009; Guest, et al., 2004). En contraste, los IRES de tipo celular, no requieren de una alta integridad de estructura ni de secuencia, y debido a esto no presentan un alto grado de estructuración, por lo que su actividad presenta una menor susceptibilidad a mutaciones puntuales en su secuencia primaria (Xia, et al., 2009). En general, la actividad IRES en mRNAs celulares se basa en la existencia de distintos módulos estructurales de RNA, los cuales se combinan para dar cuenta de la función IRES. Es por tanto la suma de la actividad de cada uno de estos módulos la que confiere la actividad IRES completa del elemento (S. A. Chappell, et al., 2003; Owens, et al., 2001). Debido a estas características, una mutación en su secuencia primaria o alguna de sus

estructuras, no es suficiente para afectar la actividad global del IRES (Baird, et al., 2007; Hellen, et al., 2001). Por ejemplo, el IRES presente en el mRNA que codifica para la proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP) puede sufrir deleciones en su porción central sin afectar la actividad traduccional del elemento IRES (Yang, et al., 1997). También es posible observar esto en el IRES presente en la región 5'UTR del mRNA que codifica para el canal de potasio 1.4 dependiente de voltaje de ratón (Kv1.4), en donde también deleciones en su secuencia no eliminan la actividad IRES, dando cuenta de la existencia de módulos funcionales capaces de realizar la función IRES por sí solos o bien regular su funcionamiento (G. M. Jang, et al., 2004).

### **1.5.Traducción sin cola poliadenilada (poly(A)).**

La circularización no covalente del mRNA es necesaria para iniciar la traducción de mRNAs eucarióticos (Gallie, 1991). Durante el proceso de iniciación de la traducción, la circularización del mRNA es mediada por la estructura 5'cap y por la cola 3'poly(A) (Gallie, 1991; Wells, et al., 1998). La circularización canónica del mRNA se logra vía interacciones RNA-proteína y proteína-proteína; 5'cap-eIF4E-eIF4G-PABP-3'Poly(A). A pesar de la relevancia de la cola 3'poly(A) en el proceso de circularización del mRNA durante la iniciación de la traducción, existen mRNAs que carecen de una cola 3'poly(A). Por ejemplo, el mRNA que codifica para las Histonas carece de una cola 3' poly(A), sin embargo, es capaz de iniciar su traducción de manera eficiente (Marzluff, et al., 2008). En el caso del mRNA de histonas, la circularización del mRNA es mediada por las proteínas celulares Stem-loop binding protein (SLBP), y SLBP interacting protein 1 (SLIP1), las cuales interactúan con una estructura de estructura de RNA presente en la región 3'UTR del mRNA. Interesantemente, la proteína SLIP1 interactúa con eIF4G, cerrando así el círculo no covalente entre el 3' y 5' del mRNA; 3'UTR stem loop-SLBP-

SLIP1-eIF4G-eIF4E-5'cap (Marzluff, et al., 2008). Estas observaciones resaltan la vía de circularización del mRNA de histonas y validan el requerimiento de la circularización del mRNA durante el proceso de inicio de la traducción.

Los mRNAs de un número importante de virus eucarióticos poseen 5'cap, pero carecen de cola 3'poly(A). Por ejemplo, más de un tercio de los virus de RNA de polaridad positiva de plantas (Dreher, et al., 2006), miembros de la familia Hantaviridae (ej. *Orthohantavirus Andes* (ANDV)), Flaviviridae (ej. Dengue virus y HCV) y Reoviridae (ej: rotavirus), carece de cola 3' poly(A). A pesar de carecer de una cola 3'poly(A), estos mRNAs virales son capaces de traducir de manera eficiente en células eucariontes. En el caso de los mRNAs virales que carecen de poly(A) existen diversas estrategias para asegurar la circularización del mRNA, asegurando así su traducción. Por ejemplo, en algunos virus que infectan plantas, estos son capaces de circularizar su mRNA utilizando estructuras complementarias presentes en las regiones 5' y 3' UTR, cerrando así el círculo vía interacciones del tipo RNA:RNA (Feng Gao, et al., 2012; Simon, et al., 2013). Otro ejemplo se observa en el mRNA del virus del Dengue (DV), que a pesar de carecer de una cola poly(A) es capaz de reclutar a la proteína PABP a dos estructuras de RNA presentes en la región 3'UTR del mRNA viral, logrando así circularizar el mRNA; 3'UTR-PABP-eIF4G-eIF4E-5'cap (Polacek, et al., 2009). Estos resultados nuevamente enfatizan en la relevancia de la circularización del mRNA durante el proceso de inicio de la traducción.

## 1.6. mRNAs modelos para el estudio del inicio no canónico de la traducción.

La estrategia para estudiar mecanismos alternativos de inicio de la traducción se basa en la utilización de mRNAs que no estén presentes normalmente en las células (exógenos). El fin de esta aproximación es el de evitar interferencias potenciales que podrían existir al utilizar un mRNA que también está presente en ella (endógeno). Con el fin de facilitar el seguimiento de la actividad traduccional del mRNA exógeno en estudio, y visualizar los resultados con mayor facilidad, los mRNAs utilizados en estos estudios codifican para proteínas reporteras. Las proteínas reporteras comúnmente utilizadas actualmente son las enzimas luciferasas, las cuales permiten obtener una lectura rápida de los resultados, con una alta sensibilidad. Siguiendo esta premisa, gran parte, pero no toda, de la información recopilada sobre mecanismos no canónicos del inicio de la traducción han sido obtenidos estudiando modelos de mRNAs virales en el contexto de células eucariontes. Estos estudios se basan también en que todos los virus convergen a un “cuello de botella” común para concretar la expresión de sus genes de forma exitosa dentro de su hospedero: la traducción de sus mRNA, proceso que necesariamente tiene que estar mediado por la maquinaria celular de síntesis de proteínas (Condit, 2013). Esto último hace fundamental que de algún modo los virus tomen control de dicho proceso para su beneficio y en desmedro de los mecanismos habituales utilizados por los mRNAs celulares. Sin embargo, y a pesar de que durante la infección viral los virus pueden alterar la preferencia de la maquinaria traduccional en favor de sus mRNAs, estos sólo utilizan aproximaciones que la célula puede permitir. Por cuanto, y sólo basado en esta noción, el estudio de los mRNAs virales y de su mecanismo para subvertir la maquinaria traduccional del hospedero ha revelado numerosos mecanismos no-canónicos de inicio de la traducción que son posibles en un contexto celular. El

conocimiento de estos mecanismos ha permitido identificar subpoblaciones de mRNAs celulares que son también capaces de utilizar mecanismos no canónicos para facilitar su traducción (López-Lastra, et al., 2005), demostrando así que el estudio de los procesos virales como el mecanismo de inicio de la traducción no solo tiene relevancia para el entendimiento de las estrategias de expresión génica viral, sino que también impacta en el conocimiento general de los mecanismos de expresión génica eucariontes. En este trabajo de tesis se propuso estudiar dos mRNAs virales, uno como modelo para entender mejor la traducción dependiente de IRES y el otro como modelo para entender la traducción de un mRNA que carece de cola poly(A).

### **1.6.1. IRES de HIV-1, modelo para el estudio del inicio de la traducción IRES dependiente.**

Los IRESs más estudiados y que son considerados modelos funcionales corresponden a aquellos presentes en los mRNAs del virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la Poliomielitis (PV) y retrovirales como es el del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) entre otros. De estos, en este trabajo de Tesis se seleccionó estudiar al IRES presente en el mRNA genómico de HIV-1, por ser un IRES de origen viral que aparentemente exhibe características asociables a un IRES de origen celular.

El 5'UTR del mRNA completo, o RNA genómico de HIV-1, virus prototipo del género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*, y agente etiológico del SIDA, contiene múltiples elementos funcionales que son críticos para la replicación viral (Berkhout, 1996). Los estudios realizados a la fecha sobre la estructura de esta región han mostrado que estos elementos funcionales se componen de horquillas o *hairpins* discretos (Berkhout, 1996; Lu, et al., 2011; Wilkinson, et al., 2008). Estos elementos funcionales incluyen la región trans-activadora (TAR), la señal de poliadenilación (Poly(A)), el sitio de unión al partidador de la transcripción reversa (PBS), el sitio de inicio de la dimerización (DIS), el sitio donador de *splicing* (SD), y la señal de empaquetamiento (Psi). Estos elementos estructurales están involucrados en los procesos de transcripción, *splicing* del mRNA, la dimerización del RNA genómico y su encapsidación, la transcripción reversa del RNA genómico y la traducción del mRNA viral (Berkhout, 1996).

Tal como otros mRNAs retrovirales (Balvay, et al., 2007; Olivares, et al., 2014; Vallejos, et al., 2009), la región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1 puede promover la iniciación interna de la traducción, permitiendo la síntesis de las proteínas virales en condiciones celulares que

inhiben la síntesis de proteínas cap-dependiente (Amorim, et al., 2014; Brasey, et al., 2003; Gendron, et al., 2011; Monette, et al., 2013; T.-D. M. Plank, et al., 2013; Vallejos, et al., 2012, 2011). Por ejemplo, el elemento HIV-1 IRES facilita la síntesis de proteínas en condiciones de estrés oxidativo y osmótico (Gendron, et al., 2011; Monette, et al., 2009), en arresto celular en el estadio G2/M (Brasey, et al., 2003; Vallejos, et al., 2011), o cuando eIF4G y PABP, dos proteínas fundamentales para la iniciación cap-dependiente, son cortadas por la proteasa de HIV-1 (Álvarez, et al., 2006; Castelló, et al., 2009; T. Ohlmann, et al., 2002; Perales, et al., 2003). En el contexto de la infección viral, un reporte muestra que la síntesis de proteínas virales es comandada por un mecanismo cap-dependiente en estadios tempranos de la infección, pero en estadios tardíos existe un cambio de mecanismo pasando a uno dependiente de IRES (Amorim, et al., 2014). Es este cambio de actividad de cap-dependiente a IRES-dependiente la responsable de la expresión sostenida de la proteína viral Gag durante la replicación de HIV-1 en células infectadas con PV (Monette, et al., 2013). Cabe mencionar que durante su replicación PV sintetiza una proteasa que corta eIF4G, generando un complejo de iniciación que es incapaz de interactuar con eIF4E, por tanto, no reconoce a las estructuras 5'cap. En conjunto, estas observaciones sugieren que el elemento HIV-1 IRES media la síntesis de la proteína viral Gag exclusivamente cuando la síntesis de proteínas cap-dependiente está inhibida.

El análisis de la región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1, región con actividad IRES, demuestra la falta de la conservación de la secuencia primaria entre diferentes aislados virales clínicos (Abbink, et al., 2005; Vallejos, et al., 2011). Sin embargo, y a pesar de la alta variabilidad en la secuencia primaria entre diferentes aislados clínicos, el análisis de estructuras secundarias reveló una conservación de la estructura de la región 5'UTR de HIV-1 entre distintos aislados naturales (Vallejos, et al., 2012). Estos resultados sugieren que en el caso de

esta región del mRNA viral su selección está basada en su estructura secundaria/terciaria y no en su secuencia primaria (Abbink, et al., 2005; Vallejos, et al., 2012, 2011). La descripción de distintas conformaciones estructurales dentro de la región 5'UTR de este mRNA, las cuales otorgarían diferentes funciones biológicas (como traducción, dimerización/encapsidación, transcripción inversa) a la región 5'UTR (Abbink, et al., 2005; Huthoff, et al., 2002), sugieren fuertemente que esta región de RNA determina su función alterando diferentes módulos estructurales de RNA (Paillart, et al., 2004). Esto llevo a sugerir que al igual que las otras funciones determinadas por cambios estructurales en la región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1 su función como IRES también podría ser modular (T. M. Plank, et al., 2014; Vallejos, et al., 2012). De ser así, el IRES de HIV-1 asemejaría a un IRES celular, diferenciándose de lo observado en IRES virales (Angulo, et al., 2016; Easton, et al., 2009; Guest, et al., 2004; Hellen, et al., 2001). Así mismo, el establecimiento de una estructura basal, común a todos los mRNAs de HIV-1 que presenta actividad IRES, refuerza aún más la idea de su comportamiento modular, con un módulo central esencial para su actividad, y módulos accesorios que participarían en su regulación (Gendron, et al., 2011; T.-D. M. Plank, et al., 2013; T. M. Plank, et al., 2014).

### **1.6.2. El SmRNA del del *Orthohantavirus Andes* (ANDV) como modelo de estudio de mRNAs que posee 5'cap pero carece de una cola 3'poly(A).**

Al igual que para el estudio de mecanismo no-canónico de iniciación mediado por IRES, existen diversos modelos de mRNA virales que poseen una estructura 5'cap pero que carecen de cola poly(A) (ver sección 1.5). Entre estos, en este trabajo de Tesis se seleccionó el mRNA del segmento S (SmRNA) del *Orthohantavirus Andes* (ANDV) como modelo para estudiar el impacto de estructuras de RNA en el inicio de la traducción de mRNAs virales que presentan estructura 5'cap pero que carecen de cola 3'poly(A). A la fecha el impacto de estructuras secundarias de RNA, así como el mecanismo que media la circularización del SmRNA de ANDV, aún no han sido reportados.

El SmRNA de ANDV es traducido de forma cap-dependiente y PABP-independiente (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Sin embargo, la región 3'UTR del SmRNA participa en el proceso de iniciación de la traducción (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Por tanto, el inicio de la traducción de ANDV es dependiente de las regiones 5' y 3'UTR (J. Vera-Otarola, et al., 2010). El SmRNA es trunco en su extremo 3', siendo 50 bases más corto en su región 3'UTR respecto al RNA genómico correspondiente (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Esta región 3'UTR trunca es capaz de reemplazar funcionalmente a la cola poly(A) en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas, por un mecanismo, a la fecha, desconocido (J. Vera-Otarola, et al., 2010). El SmRNA codifica para la Nucleoproteína (N) y para la proteína no estructural del segmento S (NSs), cuyos marcos de lectura se encuentran inscritos uno dentro del otro, con una diferencia de +1, y su secuencia aminoacídica es diferente (J. Vera-Otarola, et al., 2012). Para poder expresar ambas proteínas desde un mismo transcrito, debe ocurrir un proceso denominado *leaky scanning*, en donde las subunidades ribosomales que fueron reclutadas en el 5'cap del mRNA, realizan el proceso de

*scanning* normal, en busca de un codón de inicio apropiado. En el caso del SmRNA, el primer codón de inicio encontrado es el del marco de lectura de la proteína N, el cual no es reconocido de forma óptima por todos los complejos de inicio realizando *scanning*. Al no ser reconocido, el proceso de búsqueda continúa, hasta encontrar un segundo codón de inicio río abajo, correspondiente al marco de lectura de NSs. De esta forma, ambas proteínas pueden ser sintetizadas desde un mismo transcrito (Kozak, 1999; J. Vera-Otarola, et al., 2012; Jorge Vera-Otarola, 2009).

Estos procesos relacionados a la regulación de la síntesis de proteínas en ANDV aún no son comprendidos completamente. Sin embargo, se postula que estructuras secundarias de RNA presentes en las regiones 5' y 3' UTR del SmRNA estarían jugando un rol principal en la regulación de la síntesis de proteínas a partir de este mRNA viral. En el caso de la región 5'UTR, las estructuras de RNA jugarían un rol crucial en la regulación del mecanismo de *leaky scanning*, el cual hace posible la expresión de la proteína NSs. Evidencia de esto fue observada en datos contenidos en la Tesis Doctoral del Dr. Jorge Vera-Otarola (Jorge Vera-Otarola, 2009), en donde la modificación del contexto del codón de inicio de NSs, tiene efectos regulatorios sobre el reconocimiento del codón de inicio para N, ubicado río arriba en el mRNA, lo cual bajo el modelo de *scanning* tradicional no sería posible, a menos que sean estructuras de RNA las que intervengan en dicho proceso, modificando el mecanismo en que ocurre el *scanning*. En el caso de la región 3'UTR del SmRNA se propone que las estructuras de RNA presentes en la región, por sí solas o en asociación con proteínas, podrían mediar el proceso de circularización y el exitoso inicio de la síntesis de proteínas. Se desconoce por completo las estructuras presentes tanto en el 5'UTR como en el 3'UTR del SmRNA.

## 1.7.Trabajo propuesto

Basados en los antecedentes expuestos en las secciones anteriores, nos surgen dos preguntas respecto a los mecanismos de control del inicio de la síntesis de proteínas no canónica:

¿Cómo influye la estructura del RNA en la actividad de un elemento IRES?

¿Qué estructuras de RNA regulan el inicio de la traducción poli(A) independiente?

Para resolver estas interrogantes, en este trabajo de Tesis se propuso estudiar el impacto de las estructuras secundarias de RNA en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas. Para ello, se utilizará como primer modelo de estudio el mRNA genómico de HIV-1, en particular el elemento IRES localizado en su región 5'UTR, y como segundo modelo el mRNA del segmento S del *Orthohantavirus Andes*, identificando las estructuras presentes en las regiones 5' y 3' UTR y caracterizando su función en el proceso de inicio no canónico de la síntesis de proteínas.

En el caso de HIV-1, muchos estudios se han enfocado en la caracterización de la actividad del elemento HIV-1 IRES (Amorim, et al., 2014; Brasey, et al., 2003; Gendron, et al., 2011; Monette, et al., 2009, 2013; T.-D. M. Plank, et al., 2013; Vallejos, et al., 2012, 2011). Sin embargo, se conoce muy poco sobre el mecanismo utilizado para reclutar la maquinaria celular de traducción, y cómo proteínas celulares influyen en la actividad del elemento HIV-1 IRES (Liu, et al., 2011; Monette, et al., 2009; Rivas-Aravena, et al., 2009; Vallejos, et al., 2011). Adicionalmente, existen pocos antecedentes que aborden cómo los distintos elementos estructurales dentro de la región 5'UTR de HIV-1 participan en el mecanismo de iniciación interna de la traducción, y a su vez, no existe claridad sobre su similitud con los IRES de origen

celular (Gendron, et al., 2011; T.-D. M. Plank, et al., 2013; T. M. Plank, et al., 2014; Vallejos, et al., 2011).

En el caso de ANDV, se busca establecer la estructura que adoptan sus regiones 5' y 3'UTR, sentando así las bases para estudios funcionales basados en la influencia de la estructura en el inicio de la traducción. Se ahondará en particular en la influencia de las estructuras presentes en la región 5'UTR, y cómo estas pueden regular la síntesis de proteínas desde el SmRNA.

Para resolver de mejor manera estas dos interrogantes, se decidió formular dos hipótesis, que permitan indagar en los dos modelos de inicio de la traducción no canónica abordados.

## 2.1. HIPÓTESIS 1

- El elemento IRES presente en la región 5' no traducida del mRNA genómico de HIV-1 está constituido por módulos funcionales de RNA.

### Objetivo general 1

- Evaluar la influencia funcional de los módulos estructurales presentes en la región 5' no traducida del mRNA genómico de HIV-1 sobre el inicio de la síntesis de proteínas mediada por IRES.

## 2.2. HIPÓTESIS 2

- Las regiones 5' y 3' no traducidas del SmRNA del *Orthohantavirus Andes* poseen estructuras secundarias estables que participan en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas.

### Objetivo general 2

- Determinar las estructuras secundarias presentes en las regiones 5' y 3' no traducidas del SmRNA, y evaluar su posible influencia en la síntesis de proteínas no canónica del mRNA viral.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES

Para estudiar la actividad IRES dependiente de HIV-1, se utilizó el plásmido bicistronico, dual luciferasa (dl) previamente caracterizado (Brasey, et al., 2003; Vallejos, et al., 2011, 2009). Este plasmidio posee el promotor SV40 y codifica para las enzimas reporteras luciferasa de *Renilla* (RLuc), y luciferasa de luciérnaga (Firefly, FLuc). En la región intercistronica entre ambos reporteros se localiza un sitio múltiple de clonamiento. El plasmidio dl HIV-1 IRES posee en la región intercistronica la región 5'UTR (nucleótidos 1 al 336) del mRNA completo de HIV-1 (Brasey, et al., 2003; Vallejos, et al., 2011) (GenBank AF324493). Para las distintas mutantes y controles realizados, el clonamiento de las regiones a evaluar su actividad IRES se realiza utilizando los sitios de restricción EcoRI y NcoI del plásmido. Los plásmidos dl  $\Delta$ EMCV, dl HIV-1 1-996, dl VAR 2 IRES, dl HTLV-1 IRES, dl HCV IRES y dl PV IRES han sido descritos anteriormente (Brasey, et al., 2003; Olivares, et al., 2014; Vallejos, et al., 2012; Wilson, et al., 2000). Para construir el plásmido dl HIV-1 1-353, la región 5'UTR de HIV-1 seguido de los primeros 18 nucleótidos de la región codificante para Gag fueron amplificados desde el plásmido pNL4.3 (GenBank AF324493) utilizando los oligonucleótidos 5'-TTTGAAAAACACGAATTCGGTCTCTCTG-3' y 5'-CCATGGGCGACGCTCTCGCACCCATC-3'. La región amplificada fue digerida con las enzimas EcoRI y NcoI, e insertada en la región intercistronica del plasmidio reportero.

Para los ensayos de promotor críptico, se utiliza el mismo plasmidio dl descrito anteriormente, al cual se deletiona el promotor SV40 mediante digestión con las enzimas de restricción MluI y StuI. Posteriormente se re-circulariza el plásmido, sin el fragmento correspondiente al promotor.

### **3.2. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES de mutaciones puntuales**

Las mutaciones dentro de la región 5'UTR del mRNA completo de HIV-1 a evaluar en estos ensayos se seleccionaron a partir de información de mutaciones encontradas en variantes naturales publicadas previamente (Vallejos, et al., 2012). Estas construcciones se realizaron mediante la estrategia de *overlapping-extension* PCR (OE-PCR), utilizando los oligonucleótidos externos EMCVF (5'-TGGATCCCCCCTCTCCCTCCCCCTAACG-3') y TOEFluc120 (5'-GTCCACCTCGATATGTGCATC-3'), y los oligonucleótidos específicos para cada mutación descritos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para mutaciones puntuales del elemento HIV-1 IRES.** Se muestra la secuencia y la orientación de los oligonucleótidos utilizados para realizar mutaciones puntuales sobre el elemento HIV-1 IRES, en contexto bicistrónico. Se muestra el nombre de la mutante realizada con cada par de oligonucleótidos. En la secuencia se destaca en negrita la mutación realizada.

Mutante realizada	Orientación	Secuencia oligonucleótido (5' – 3')
U71A	Sentido	GCTTAAGCC <b>CA</b> ATAAAGCTTG
	Antisentido	CAAGCTTTATTG <b>T</b> GGCTTAAGC
U71G	Sentido	GCTTAAGCC <b>G</b> CAATAAAGCTTG
	Antisentido	CAAGCTTTATTG <b>C</b> GGCTTAAGC
U71C	Sentido	GCTTAAGCC <b>CC</b> ATAAAGCTTG
	Antisentido	CAAGCTTTATTG <b>GG</b> GCTTAAGC
A73G	Sentido	GCTTAAGCCT <b>C</b> GATAAAGCTTG
	Antisentido	CAAGCTTTAT <b>C</b> GAGGCTTAAGC
C95U	Sentido	CTTGAGTGCT <b>T</b> AAAGTAGTGTG
	Antisentido	CACACTACTTT <b>A</b> AGCACTCAAG
150InsUAAUACU	Sentido	CCCTCAGAT <b>TAATACT</b> CCCTTTAGTC
	Antisentido	GACTAAAAG <b>AGTATTA</b> TCTGAGGG
156InsAGAA	Sentido	CAGACCCTTT <b>AGAA</b> AGTCAGTGTGG
	Antisentido	CCACACTGACT <b>TTCT</b> AAAAGGGTCTG
156InsUAGAA	Sentido	CAGACCCTTT <b>TAGAA</b> AGTCAGTGTGG
	Antisentido	CCACACTGACT <b>TTCT</b> AAAAGGGTCTG
A161C	Sentido	CCTTTTAGT <b>CCG</b> TGTGGAAAATC
	Antisentido	GATTTTCCACAC <b>GG</b> ACTAAAAGG
U200C	Sentido	GAACAGGGAC <b>CT</b> GAAAGCGAAAG
	Antisentido	CTTTCGCTT <b>CAG</b> GTCCCTGTTC
G202A	Sentido	CAGGGACT <b>T</b> AAAAGCGAAAG
	Antisentido	CTTTCGCTT <b>T</b> AAGTCCCTG
A209G	Sentido	CTTGAAAGC <b>GGA</b> AGTAAAGCC
	Antisentido	GGCTTTACT <b>TCC</b> GCTTTCAG
A227C	Sentido	GCCAGAGGAG <b>CT</b> CCTCTGACG
	Antisentido	CGTCGAGAG <b>ACT</b> CCTCTGGC
256InsA/G257A	Sentido	CTTGCTGAA <b>AAA</b> CGCGCACGG
	Antisentido	CCGTGCGC <b>GT</b> TTTCAGCAAG
InsA256/G257A/A263G	Sentido	GCTTGCTGAA <b>AAA</b> CGCGC <b>GCGG</b> CAAGAGG
	Antisentido	CCTCTTGCC <b>GCGCGC</b> <b>GT</b> TTTCAGCAAGC
InsA256/A263G	Sentido	GCTTGCTGAA <b>AG</b> CGCGC <b>GCGG</b> CAAGAGG
	Antisentido	CCTCTTGCC <b>GCGCGC</b> <b>GT</b> TTTCAGCAAGC
C175U/InsGAAGAA256/A263G	Sentido	GCTTGCTGAA <b>GAAGAA</b> GCGCGC <b>GCGG</b> CAAGAGG
	Antisentido	CCTCTTGCC <b>GCGCGC</b> <b>TTCTTC</b> TTTCAGCAAGC
A263G	Sentido	GAAGCGCGC <b>GCGG</b> CAAGAGG
	Antisentido	CCTCTTGCC <b>GCGCGC</b> TTTC
G265A	Sentido	GAAGCGCGC <b>AC</b> AGCAAGAGGAGG
	Antisentido	CCTCCTCTG <b>CT</b> TGTGCGCGCTTC
G270A	Sentido	GCGCACGGC <b>AAA</b> AGGCGAG
	Antisentido	CTCGCCT <b>TTT</b> GCCGTGCGC
G279A	Sentido	GGCGAG <b>AG</b> CGGCGACTGG
	Antisentido	CCAGTCGCC <b>GCT</b> CCTCGCC
G283A	Sentido	GCGAGGGC <b>CA</b> CGACTGGTG
	Antisentido	CACCAGTC <b>CT</b> CGCCCCTCGC
G283A/DelA286	Sentido	GGGGC <b>AC</b> CGTGGTGAGTACG
	Antisentido	CGTACTCACCAG <b>CT</b> CGCCCC
A286G	Sentido	GGGGCGC <b>GCT</b> GGTGAGTAC
	Antisentido	GTACTCACCAG <b>CCG</b> CCGCC
DelA286	Sentido	GGGGCGC <b>G</b> _CTGGTGAGTACG
	Antisentido	CGTACTCACCAG_ <b>CG</b> CCGCC

Posteriormente, el amplicón que presenta la región mutada correspondiente fue digerido e insertado entre los sitios EcoRI y NcoI del plasmidio bicistrónico reportero. Se puede observar la lista completa de las mutaciones puntuales evaluadas en la **Figura 14**.

### **3.3. Construcciones de DNA para ensayos de actividad IRES de mutaciones de delección**

Las construcciones utilizadas para evaluar el impacto de los dominios estructurales de RNA en la actividad IRES de HIV-1 se diseñaron considerando la información estructural de la región 5'UTR del mRNA completo de HIV-1 (Vallejos, et al., 2012, 2011). Las construcciones se realizaron en el contexto de la región 5'UTR de una variante de HIV-1 aislada y caracterizada previamente en el laboratorio denominada VAR2 IRES (Carvajal & Vallejos, et al., 2016; Vallejos, et al., 2012). Las construcciones se realizaron mediante la estrategia de OE-PCR utilizando los oligonucleótidos externos EMCVF (5'-TGGATCCCCCCTCTCCCTCCCCCTAACG-3') y TOEFluc120 (5'-GTCCACCTCGATATGTGCATC-3'), y los oligonucleótidos específicos para cada mutación descritos en la **Tabla 2**. Se puede observar la lista de mutaciones evaluadas, y su localización dentro del elemento IRES en la **Figura 15**.

Dominio asociado	Mutante realizada	Orientación	Secuencia oligonucleótido (5' – 3')	
TAR	$\Delta$ TAR	Sentido	GAATTCCACTGCTTAAGCC	
Poly(A)	$\Delta$ Poli(A)	Sentido	GGAACCTGTGCCCGTCTGTTG	
		Antisentido	CACAGGTTCCCTAGTCAGCC	
	$\Delta$ Poly(A)-AL	Sentido	GCCTCAATTGAGTGCTTAAAG	
		Antisentido	CTCAATTGAGGCTTAAGCAGTGGGTTC	
	$\Delta$ D-loop	Sentido	GAGGTAGTGTGTGCCCGTC	
		Antisentido	CACTACCTCAAGGCAAGCTTTATTG	
PBS	$\Delta$ PBS	Sentido	GTGTGAAAGATCTCTCGACGCAG	
		Antisentido	GATCTTTCACACAACAGACGGG	
	$\Delta$ ARM	Sentido	GTAGCTAGCAGTGGCGCCCG	
		Antisentido	CTGCTAGCTACCAGAGTCAC	
	$\Delta$ ShortARM	Sentido	CCCTCGAAAATCTCTAGCAGTGGC	
		Antisentido	GATTTTCGAGGGATCTCTAG	
	$\Delta$ 4N	Sentido	GACTCTGGAGAGATCCCTCAG	
		Antisentido	CTCTCCAGAGTCACACAACAGAC	
	$\Delta$ ssPBS-DIS	Sentido	CCAGATCTCTCGACGCAGGACTC	
		Antisentido	CGAGAGATCTGGTTTTACTTTC	
	DIS/SD/Psi	$\Delta$ SL	Sentido	GACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
			Antisentido	TCTTCCATGGTCATCTTCTCTGG
DIS	$\Delta$ DIS	Sentido	CTCGACGCGGCTGGTGAGTACGC	
		Antisentido	CAGCCGCGTCGAGAGATCTTCTC	
	$\Delta$ DIS-AL	Sentido	GCTGCGGCAAGAGGCGAGGAG	
		Antisentido	CTTGCCGCGAGCAAGCCGAGTCC	
SD	$\Delta$ SD	Sentido	GAGCGGAATTTTTGACTAGCGGAG	
		Antisentido	CAAAAATTCCGCTCCTCGCCTCTTGC	
	$\Delta$ SD-AL	Sentido	GCGGCTGCCAATTTTTGACTAGCGGAG	
		Antisentido	CAAAAATTGGCAGCCGCCGCTCCTCGC	
Psi	$\Delta$ Psi	Sentido	CAATTTTTGAGGAGAGACCATGGAAGAC	
		Antisentido	CTCTCCTCAAAAATTGGCGTACTCACC	

**Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para mutaciones de delección de dominios del elemento VAR2 IRES.** Se muestra la secuencia y la orientación de los oligonucleótidos utilizados para realizar delecciones sobre el elemento VAR2 IRES, en contexto bicistrónico. Se muestra el nombre de la mutante realizada con cada par de oligonucleótidos. Se destaca el dominio estructural modificado o eliminado con cada mutación.

### 3.4. Construcciones utilizadas a partir del Segmento S de Andes virus

Para el estudio del SmRNA de ANDV se utilizaron las construcciones previamente reportadas (Jorge Vera-Otarola, 2009), y publicadas (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Dichos plásmidos contienen la región 5' UTR del mRNA del segmento S de Andes virus (NC\_003466), desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 127, conteniendo el codón de inicio de la región codificante para la proteína N, y abarcando hasta el segundo codón de la región codificante para la proteína NSs. Río abajo, está la región codificante del reportero FLuc, el cual fue insertado en dos versiones: con el reportero en fase con el codón de inicio para N (denominado "2R"), o en fase con el codón de inicio para NSs (denominado "2F"). Así, cada uno de estos reporteros dará cuenta del reconocimiento de uno u otro codón de inicio. En la región 3' no traducida del reportero, se encuentra la región 3' no traducida del mRNA del Segmento S de Andes virus, desde el nucleótido 1330 al nucleótido 1821 (región 3'UTR denominada como "-50")(J. Vera-Otarola, et al., 2010). Así, las construcciones finales, según la fase del reportero FLuc con los codones de inicio virales, se denominan "2R-50" y "2F-50".

En este trabajo de tesis, se realizaron nuevas construcciones reporteras, basadas en las construcciones 2R-50 y 2F-50. Estas nuevas construcciones permiten reconstituir de forma más exacta el contexto de secuencia y estructura que rodea al codón de inicio para NSs. Utilizando los oligonucleótidos NSs\_EcoRI\_F y NSs\_EcoRI\_R (**Tabla 3**), se realizó una reacción de PCR con el mRNA del Segmento S viral como molde, con el fin de extraer la región codificante para NSs, flanqueada por los sitios de restricción EcoRI. Este fragmento del PCR fue clonado en dicho sitio de restricción en los plásmidos 2R-50 y 2F-50. De este modo, se obtuvieron los plásmidos 2RNS-50 y 2FNS-50, los cuales poseen la región codificante para NSs, reconstituyendo de forma correcta el contexto de secuencia y estructura río abajo del codón de

inicio para Nss. En este trabajo de tesis, se utilizó la denominación “N<sup>AUG</sup>NS” y “NSs<sup>AUG</sup>NS” para 2RNS-50 y 2FNS-50 respectivamente (**Figura 25C**).

### 3.5. Mutaciones sitio-dirigidas región 5'UTR ANDV

A partir de la estructura secundaria obtenida en este trabajo de tesis (**Figura 22**), se realizaron mutaciones dirigidas para alterar la estructura de la región 5'UTR del SmRNA. Utilizando los oligonucleótidos ANDMUT\_1AF, ANDMUT\_1AR, AND\_TAR\_HP2F y AND\_TAR\_HP2R (**Tabla 3**), se realizaron las mutaciones mediante la estrategia de OE-PCR (Heckman, et al., 2007).

Nombre Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
ANDMUT_1AF	AGTAGTAGACT GTTACAG AGAAGCTAC
ANDMUT_1AR	GTAGCTTCT CTGTAAC AGTCTACTACT
AND_TAR_HP2F	CAAGAATTG G AGG GTGC CATCACAGCACACG
AND_TAR_HP2R	CGTGTGCTGTGATG GCAC CCT C CAATTCTTG
NSs_EcoRI_F	AACCCGAATTC GAGAAGGCAGTGGAGGTG
NSs_EcoRI_R	AACCCGAATTCCT GATGATCATCAGGCTCAAGC

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para nuevas construcciones de Andes virus, y para mutaciones dirigidas sobre la región 5'UTR del SmRNA de Andes virus.**

### 3.6. Western Blot

Las células fueron lisadas utilizando tampón *Radioimmunoprecipitation Assay* (RIPA, 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycolate de sodio, 1 mM EDTA, 0.1% SDS). Se resolvieron 10 µg de Proteína total en un Gel de Tricina-SDS al 16%, y se transfirió a una membrana Immobilon-FL polyvinylidene difluoride (EMD Millipore Co, Milford, MA,

USA), usando el sistema de transferencia semi-seca Genie (Idea Scientific Company, Minneapolis, MN, USA). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti RPSS25 (generado en la Unidad de Imagenología analítica e Inmunoreactivos, University of Alabama at Birmingham, UAB), o el anticuerpo anti  $\beta$ -actina (Rockland Immunochemical Inc, Limerick, PA, USA) como anticuerpo primario, y se utilizó anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Las membranas fueron visualizadas y cuantificadas utilizando el sistema de imágenes ODYSSEY CLx (Li-Cor).

### **3.7. Transfecciones de DNA**

Las transfecciones de DNA, para el análisis de la actividad traduccional IRES dependiente, se realizó sobre células HeLa o COS-7, en placas de 12 pocillos. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células por cada pocillo, en un volumen total de 1mL de medio DMEM por pocillo. Al día siguiente, con las células cercanas al 60% de confluencia, fueron transfectadas, utilizando el sistema JetPEI (Polyplus-transfection). Para la mezcla de transfección, 500 ng de DNA, diluidos en 50 uL de Cloruro de Sodio 150 mM, se mezclaron con 1 uL de reactivo JetPEI diluido en 50uL de Cloruro de Sodio 150 mM. Ambos componentes fueron mezclados mediante vortex, incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente la mezcla total, 100  $\mu$ L, fueron adicionados gota a gota a cada pocillo con células.

### 3.8. Transfecciones de RNA

La evaluación del efecto sobre el inicio de la traducción, de las mutantes estructurales de la región 5'UTR del SmRNA del *Orthohantavirus Andes*, se realizó mediante la transfección con los correspondientes RNAs sintetizados *in vitro*, en células 293T. Se sembró  $6 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 48 pocillos. Luego de 48 horas, se transfectó con los RNAs experimentales, utilizando 0,2 pmol de cada uno, junto a 0,15 pmol del vector control pCI-Neo-RLuc, que codifica para la Luciferasa de *Renilla*. Los RNAs fueron mezclados con 1  $\mu$ L de Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer) en 50  $\mu$ L de OptiMEM (Thermo Fischer), para ser posteriormente adicionados a cada pocillo de células. Luego de 6 horas, la actividad Luciferasa fue evaluada.

### 3.9. Transcripciones *in vitro*

Para sintetizar los RNAs utilizados en las reacciones de traducción *in vitro*, y en los experimentos de transfección de RNA, se tomó 1  $\mu$ g de DNA linealizado con la enzima de restricción correspondiente, de modo tal de realizar una transcripción del tipo *run-off*. El molde de DNA lineal se incubó con 20U de T7 RNA Polimerasa (Thermo Scientific), en presencia de un mix a 2 mM de NTPs (Thermo Scientific), 40U Ribolock (Thermo Scientific), y Buffer Ribomax 1X (400 mM Hepes-KOH, 120 mM  $MgCl_2$ , 10 mM spermidine, 200 mM DTT). Las reacciones son incubadas por 3 a 4 horas a 37°C, para posteriormente adicionar 2U de TURBO DNAsa (Ambion) y continuar la incubación a 37°C durante 30 minutos. Finalizada la incubación, se adiciona LiCl a una concentración final de 2,5M, y se incubó durante 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifuga durante 20 minutos a 16000g y 4°C. Se realizan dos lavados con 200  $\mu$ L de EtOH 75%, y posterior centrifugación durante 10 minutos a 16000g y 4°C. Luego

del segundo lavado, se remueve completamente el sobrenadante, y el precipitado se seca mediante vacío a temperatura ambiente durante 5 minutos. El precipitado de RNA se resuspende en 25  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y es cuantificado mediante equipo espectrofotométrico Nanodrop (Thermo Scientific). Se verifica la integridad del transcrito mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, calentando la muestra a 65°C por 5 minutos, en presencia de tampón de carga de RNA con formamida previo a la carga en el gel de agarosa. Luego de la migración de las moléculas de RNA en el gel, se visualizan mediante tinción con el reactivo SYBR Safe (ThermoFischer) en un transiluminador con luz UV.

### **3.10. Modificación del RNA para análisis de SHAPE**

El protocolo utilizado para realizar SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension) fue adaptado desde Low et al (Low, et al., 2010). En éste, 6 pmol de RNA transcrito *in vitro* fueron incubados en 24  $\mu$ L de agua MiliQ. Se denatura a 80°C por 2 minutos, se adiciona 3  $\mu$ L de tampón de renaturación (Hepes 400 mM, KCl 1M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) y se permite la renaturación del RNA a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez renaturado el RNA, se incuba la mezcla a 37°C por 10 minutos, y posteriormente se adiciona 3  $\mu$ L del químico modificador 1M7 (Mortimer, et al., 2007) a 20 mM en DMSO (2mM final en la reacción), o dicho solvente en ausencia de 1M7 como control negativo, permitiendo la reacción durante 3 minutos. Posteriormente se adiciona 3  $\mu$ L de Acetato de amonio 5M, 1  $\mu$ L de Glicógeno 20 mg/mL y 85  $\mu$ L de Etanol 100%, para detener la reacción y precipitar el RNA modificado. Se incuba a -20°C durante 30 minutos, se centrifuga 30 minutos a 4°C, se lava dos veces el precipitado con Etanol 70%, y el pellet obtenido se resuspende en 10  $\mu$ L de agua MiliQ.

### 3.11. Reacción de transcripción reversa para análisis de SHAPE

10  $\mu$ L de RNA modificado son mezclados con 1  $\mu$ L de DMSO, posteriormente incubados por 3 minutos a 95°C y luego 3 minutos en hielo. Se adicionan 3  $\mu$ L de una solución 2  $\mu$ M de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (**Tabla 4**), incubándose la mezcla por 5 minutos a 65°C y luego por 10 minutos a 35°C. La mezcla se depositó en hielo, y se adicionó 4  $\mu$ L de Buffer RT y 1  $\mu$ L de una mezcla de dNTPs a 10mM (dATP, dCTP, dUTP, dITP). Para las reacciones de secuenciación, se adicionó además el nucleótido dideoxi UTP a 10mM (ddUTP). Luego se adicionó 1  $\mu$ L de la transcriptasa reversa M-MLV, y se incubó por 2 minutos a 35°C, luego 30 minutos a 42°C, y finalmente 5 minutos a 55°C. Una vez finalizada la transcripción reversa, se incubó en hielo y se agregaron 5  $\mu$ L de solución de stop (Glicógeno 20%, EDTA 40 mM, Acetato de Sodio 1,2 M). Se combinaron las reacciones experimentales con la de secuenciación, y se realizó precipitación etanólica. El precipitado fue resuspendido en 40  $\mu$ L de formamida y posteriormente cargado en un secuenciador capilar para su análisis (CEQ 8000, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Nombre Oligonucleótido	Secuencia Nucleotídica (5' – 3')
Rev_5' NCR	ACAGCTGCCCCGTCTACTTTGTAG
Rev_3' NCR	TAGTAGTATGCTCCTTGAAAAGCAATCAAGAAAAATCAAATGTGAGG TAGTATGTG
Rev_3'UTR	TATGTGTTGAGGTAGAATAGGGGAGG
5_UTR_DS_ANDV	GAGATGATTTTTTCCTTTAGATGAT
3_UTR_INT_ANDV_R	TAACCTAAAAATAGCCAATCAATC

**Tabla 4: Oligonucleótidos marcados fluorescentemente para análisis de SHAPE.**

### **3.12. Análisis datos de SHAPE**

Los datos obtenidos desde la secuenciación capilar fueron ordenados y analizados utilizando el software QuSHAPE (Karabiber, et al., 2013). En dicho software, se asignó los valores de reactividad a cada base de la secuencia analizada, gracias a la presencia de una reacción de secuenciación dentro de cada análisis. Los valores de reactividad obtenidos fueron filtrados de forma manual desde las tablas de datos en el software Excel, conservándose un n experimental de al menos 2 para cada base de las secuencias analizadas.

### **3.13. Predicción de estructura secundaria utilizando información experimental**

La predicción de estructuras secundarias, utilizando la reactividad de SHAPE como restricciones para el modelamiento, fue realizada utilizando el software RNAStructure (Mathews, 2014). En dicho software, se utilizó como parámetros para el plegamiento de las moléculas la información de secuencia, la reactividad de SHAPE para cada posición, y la restricción de no aparear nucleótidos a más de 200 bases de distancia lineal dentro de la secuencia. Las estructuras obtenidas por el software fueron curadas manualmente, o bien validadas funcionalmente en este trabajo de tesis.

### 3.14. Ensayo de medición de actividad Luciferasa

La medición de la luminiscencia RLuc y FLuc, proveniente de las células transfectadas con los DNAs o RNAs experimentales, se efectuó con los materiales del kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega Corporation), con algunas modificaciones al protocolo. Primero, a cada pocillo de una placa de 12 pocillos con células transfectadas, se agregó 100  $\mu$ L de Buffer Pasivo de Lisis 1X (Promega Corporation), dejando actuar el buffer de lisis por 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente, se recolectó el lisado celular, y se determinó la actividad de cada una de las enzimas reporteras, mezclando 20 $\mu$ L de lisado celular con 15  $\mu$ L del sustrato de cada enzima (*LAR II* y *Stop&Glo*, para *Firefly* y *Renilla* respectivamente). La actividad de cada una de las enzimas reporteras fue medida en el luminómetro *Sirius Single Tube Luminometer Lumat 9507* (Berthold Detection Systems).

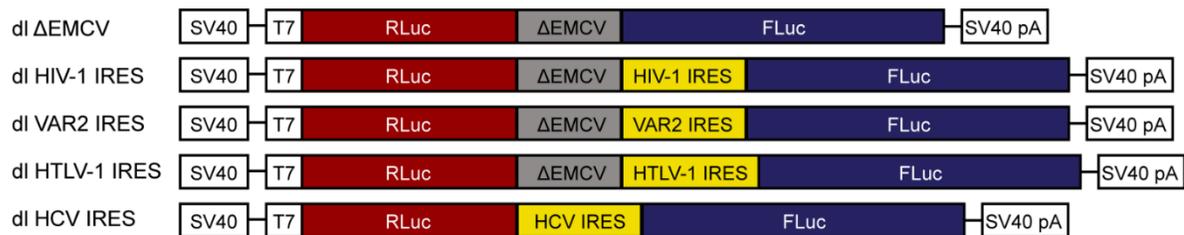
## 4.1. RESULTADOS PARTE 1

### *EL IRES PRESENTE EN LA REGION 5' NO TRADUCIDA DEL MRNA GENÓMICO DE HIV-1 ESTÁ CONSTITUIDO POR MÓDULOS ESTRUCTURALES DE RNA.*

#### **4.1.1. El IRES de HIV-1 es activo en células HeLa y COS-7**

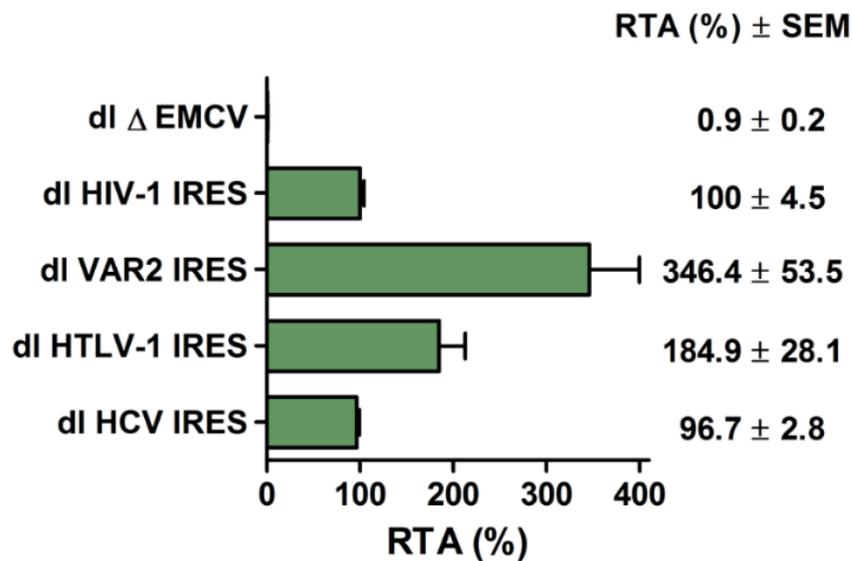
La región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1 posee actividad IRES (Amorim, et al., 2014; Brasey, et al., 2003; Gendron, et al., 2011; Monette, et al., 2013; T.-D. M. Plank, et al., 2013; Vallejos, et al., 2012, 2011). Con el fin de establecer si la actividad del IRES de HIV-1 reportada previamente en células HeLa (Brasey, et al., 2003; Vallejos, et al., 2012), podía ser reproducida en otro sistema celular, se decidió evaluar la actividad traduccional de la región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1 prototipo (pNL4.3) (Adachi, et al., 1986; Brasey, et al., 2003), o de una variante natural de HIV-1 (VAR2) (Vallejos, et al., 2012) en células COS-7. Para evaluar la actividad traduccional de los elementos IRES (pNL4.3 y VAR2) se utilizó construcciones bicistrónicas (Brasey, et al., 2003; Johannes, et al., 1999), esquematizadas en la **Figura 1**. Dichas construcciones bicistrónicas presentan las regiones codificantes para los reporteros, luciferasa de *Renilla*, (RLuc) y luciferasa de luciérnaga (FLuc), separadas por una región intercistónica. La región 5'UTR del mRNA genómico de HIV-1 (pNL4.3 o VAR2) se posicionó en la región intercistónica. Esta estrategia experimental permite determinar la síntesis de proteínas mediada por la estructura 5'cap o cap-dependiente (RLuc) y la traducción mediada por el IRES de HIV-1 o IRES-dependiente (FLuc) de manera independiente (Brasey, et al.,

2003; Johannes, et al., 1999; Pelletier, et al., 1988). La presencia de ambos reporteros en un mismo RNA mensajero permite además independizar los ensayos de la concentración de mRNA en el sistema, al poder expresar la actividad IRES como la razón entre la actividad de FLuc y RLuc (FLuc/RLuc) o actividad traduccional relativa (RTA). Como control negativo de estos ensayos se utilizó una construcción bicistrónica que entre los dos reporteros posee una secuencia mutante de la región 5'UTR del virus EMCV ( $\Delta$ EMCV), defectiva en su actividad IRES (Barría, et al., 2009; Brasey, et al., 2003). Los controles positivos de actividad IRES fueron los reporteros bicistrónicos que contienen el elemento IRES del virus linfotrópico T de humanos de tipo 1 (HTLV-1) (Olivares, et al., 2014), y el elemento IRES de HCV (Angulo, et al., 2016; Wang, et al., 1993).

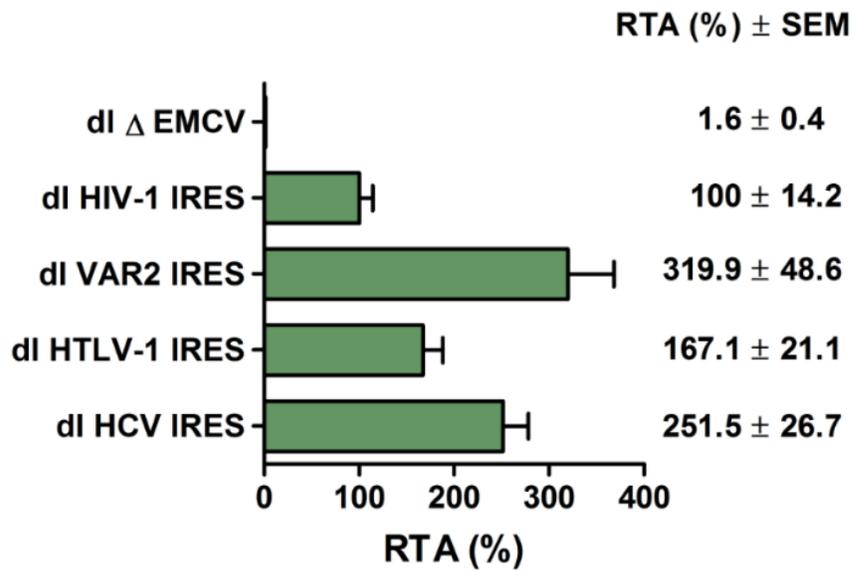


**Figura 1. Construcciones bicistrónicas utilizadas.** Las construcciones utilizadas poseen un reportero para células eucariotas, que permite la síntesis del mRNA bicistrónico dentro de la célula. El RNA mensajero bicistrónico contiene dos regiones codificantes para los reporteros Luciferasa de *Renilla* (RLuc), y Luciferasa de *Firefly* (FLuc), cuya síntesis da cuenta de la actividad traduccional cap-dependiente o IRES-dependiente respectivamente. En la región intercistrónica, cada construcción contiene: dl  $\Delta$ EMCV, la región 5'UTR de EMCV, sin actividad IRES. dl HIV-1 IRES, la región 5'UTR del mRNA completo de HIV-1. dl VAR2 IRES, la región 5'UTR de la Variante 2 del HIV-1 IRES (Vallejos, et al., 2012). dl HTLV-1 la región 5' UTR del mRNA completo de HTLV-1. dl HCV, la región 5'UTR del mRNA de HCV.

Los plasmidios bicistrónicos, esquematizados en la **Figura 1**, se transfectaron en células HeLa (Rivas-Aravena, et al., 2009; Vallejos, et al., 2012, 2009) o en células COS-7. Los resultados expresados como la razón entre la actividad de los reporteros FLuc y RLuc obtenidos en células HeLa se grafican en la **Figura 2**, mientras que los resultados obtenidos en células COS-7 se presentan en la **Figura 3**.



**Figura 2. Actividad de reporteros bicistrónicos en línea celular HeLa.** Células HeLa transfectadas con las construcciones bicistrónicas ya descritas, fueron lisadas 24 horas posterior a la transfección, y se midió la actividad de los reporteros. Se muestra la actividad traduccional relativa (RTA) como la razón entre las actividades obtenidas para los reporteros FLuc y RLuc, con la actividad de HIV-1 IRES (pNL4.3) arbitrariamente en 100%.

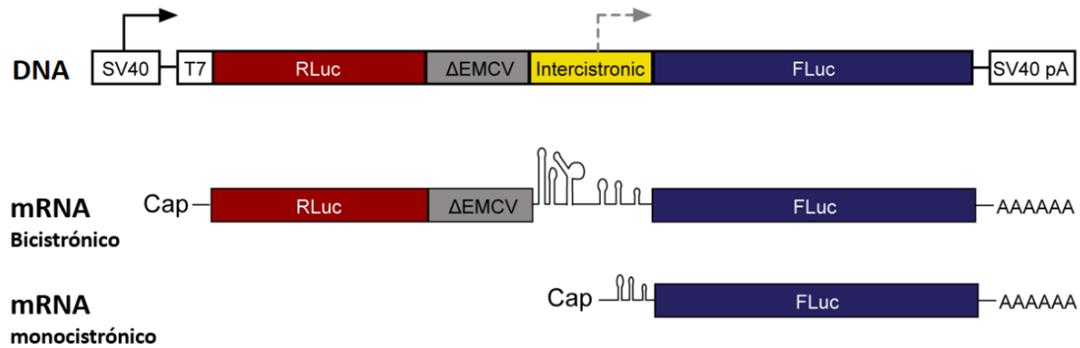


**Figura 3. Actividad de reporteros bicistrónicos en línea celular COS-7.** Células COS-7 transfectadas con las construcciones bicistrónicas ya descritas, fueron lisadas 24 horas posterior a la transfección, y se midió la actividad de los reporteros. Se muestra la RTA como la razón entre las actividades obtenidas para los reporteros FLuc y RLuc, con la actividad de HIV-1 IRES (pNL4.3) arbitrariamente en 100%.

Como se observa en las **Figura 2** y **Figura 3**, la región 5'UTR de mRNA genómico de pNL4.3 y VAR2 presenta actividad traduccional (expresada como RTA) por sobre el control negativo del  $\Delta$ EMCV. Se observa además una actividad traduccional menor del elemento HCV IRES en la línea celular COS-7, respecto a la línea celular HeLa. Sin embargo, de estos resultados se puede inferir que las regiones 5'UTR del mRNA genómico pNL4.3 y la región denominada VAR2 presentan actividad IRES. Además, en acuerdo a lo previamente reportado la actividad IRES del mRNA VAR2 es mayor a la actividad IRES de pNL4.3 (Vallejos, et al., 2012).

#### **4.1.2. La actividad FLuc asociada a la construcción bicistronica no se debe la generación de mRNAs alternativos.**

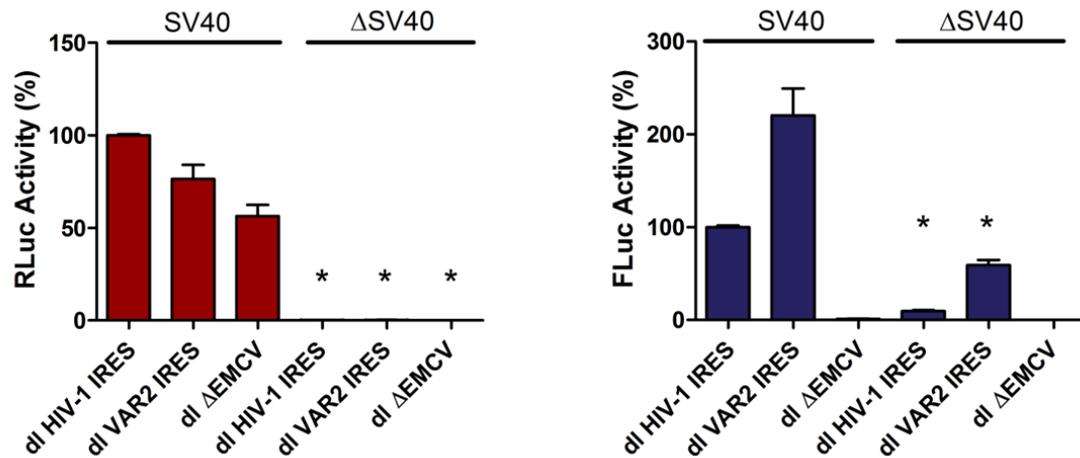
Un problema asociado a la conclusión anterior es que la actividad FLuc observada puede estar asociada a un artefacto experimental (Mäkeläinen, et al., 2007; Vopa, et al., 2008), como puede ser por ejemplo, la presencia de un promotor críptico en el DNA. De existir un promotor críptico en el plasmidio utilizado, éste puede dar origen a la transcripción de un mRNA monocistrónico que codifique para FLuc (**Figura 4**). En tal caso no habría un elemento IRES en la región evaluada, ya que la expresión de FLuc desde este mRNA monocistrónico sería cap-dependiente.



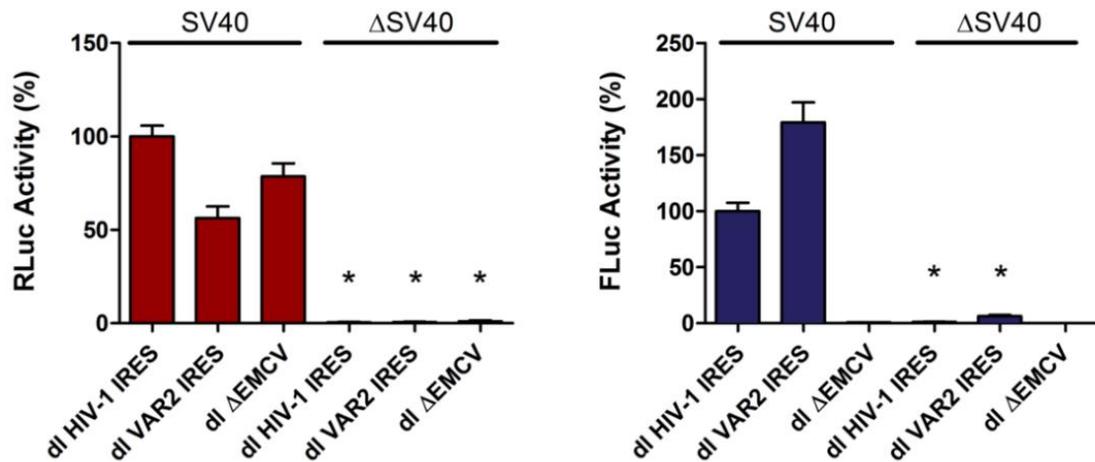
**Figura 4. Esquema del transcrito producido desde un posible promotor críptico presente en una construcción bicistrónica.** A partir de una construcción bicistrónica, mediante la transcripción desde el promotor SV40 (flecha negra sobre el DNA), se espera obtener un mRNA bicistrónico, codificante para ambos reporteros, lo cual permitirá evaluar de forma correcta las actividades cap e IRES-dependiente. Sin embargo, la presencia de la región intercistrica puede dar origen a un promotor críptico (flecha gris sobre el DNA), en cual podría generar un segundo transcrito monocistrónico que represente una sobreestimación de la actividad de FLuc, y con esto un sesgo en la actividad IRES.

Para descartar la presencia de un promotor críptico en nuestro sistema experimental, se decidió eliminar el promotor SV40 desde las construcciones bicistrónicas. En ausencia del promotor SV40 ( $\Delta$ SV40), no debiera generarse el mRNA bicistrónico, y con ello eliminarse la expresión de RLuc y de FLuc. Sin embargo, de ser detectada actividad de alguno de los reporteros, esto sería indicativo de la presencia de un mRNA sintetizado a partir de un promotor críptico presente en la construcción utilizada en los ensayos, especialmente en la región intercistrica de interés.

La presencia de un promotor críptico putativo fue evaluada tanto en la línea celular HeLa (**Figura 5**) como en la línea celular COS-7 (**Figura 6**), para comparar la posible presencia de este mecanismo en ambos contextos celulares, utilizando las construcciones dl HIV-1 IRES, dl VAR2 IRES y dl  $\Delta$ EMCV.



**Figura 5: Presencia de promotor críptico en células HeLa.** Actividad RLuc y FLuc en presencia (SV40) o ausencia ( $\Delta$ SV40) del promotor SV40 en el DNA, como se indica en la parte superior. En el panel izquierdo se observa la actividad RLuc, que da cuenta de la actividad cap-dependiente. En el panel derecho se observa la actividad FLuc, que da cuenta de la actividad IRES-dependiente. Se muestra la actividad relativa de los reporteros RLuc y FLuc, normalizada con la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y la actividad de HIV-1 IRES arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre las condiciones SV40 y  $\Delta$ SV40 con  $P < 0,05$ .



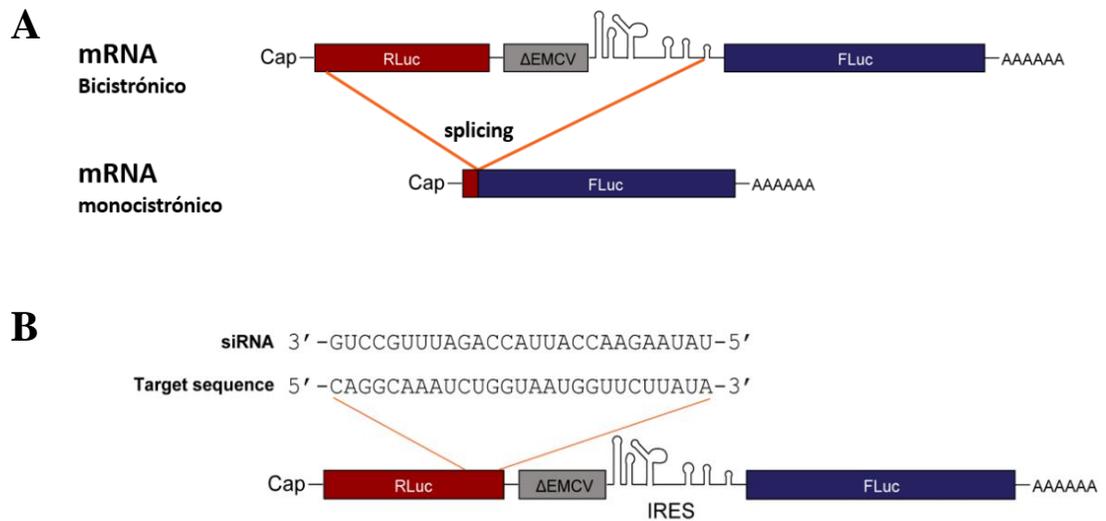
**Figura 6: Presencia de promotor críptico en células COS-7.** Actividad RLuc y FLuc en presencia (SV40) o ausencia ( $\Delta$ SV40) del promotor SV40 en el DNA, como se indica en la parte superior. En el panel izquierdo se observa la actividad del reportero RLuc, que da cuenta de la actividad cap-dependiente. En el panel derecho se observa la actividad de FLuc, que da cuenta de la actividad IRES-dependiente. Se muestra la actividad relativa de RLuc y FLuc, normalizada con la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y la actividad de HIV-1 IRES arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre las condiciones SV40 y  $\Delta$ SV40 con  $P < 0,05$ .

Al eliminar el promotor SV40 y evaluar los plasmidios en el contexto celular HeLa (**Figura 5**) y COS-7 (**Figura 6**), el reportero *Renilla* no presenta actividad, lo que da cuenta de la necesidad del promotor para la expresión del mRNA bicistrónico que codifica para dicho reportero. Sin embargo, en ausencia del promotor SV40 se observa un 10% y 27% de actividad de FLuc respecto a la construcción con el promotor, desde las construcciones  $\Delta$ SV40 dl HIV-1 IRES y  $\Delta$ SV40 dl VAR2 IRES respectivamente en células HeLa. Esto indica que en células HeLa sólo el 90 % y 73% de la actividad FLuc observada desde los plasmidios  $\Delta$ SV40 dl HIV-1 IRES y  $\Delta$ SV40 dl VAR2 IRES respectivamente es dependiente de un elemento IRES, mientras que un 10 % y 27% de actividad FLuc en estos plasmidios se asocia a una actividad de promotor críptico. En el contexto celular COS-7, no se observa actividad de promotor críptico. Estos resultados dan cuenta de la presencia de un promotor críptico en las construcciones dl HIV-1 IRES y dl VAR2 IRES, el cual sería activo en el contexto celular HeLa, y no en el contexto de COS-7.

Un segundo fenómeno que puede representar un sesgo al momento de evaluar la actividad de un IRES es la posibilidad de un evento de *splicing* alternativo al sintetizarse el mRNA bicistrónico. El *splicing* es el mecanismo por el cual los mRNAs eucariontes son procesados en el núcleo para remover intrones, dejando sólo los exones en el transcrito maduro, el cual será exportado al citoplasma para su traducción (De Conti, et al., 2013). Este procesamiento se puede predecir, dado que posee secuencias consenso en el mRNA donde ocurrirá el *splicing*. Sin embargo, hay mRNAs que pueden procesarse por el mecanismo de *splicing* alternativo, proceso que no es comprendido a cabalidad, dado que las señales en el mRNA que lo originan no están del todo definidas (De Conti, et al., 2013; Lee, et al., 2015).

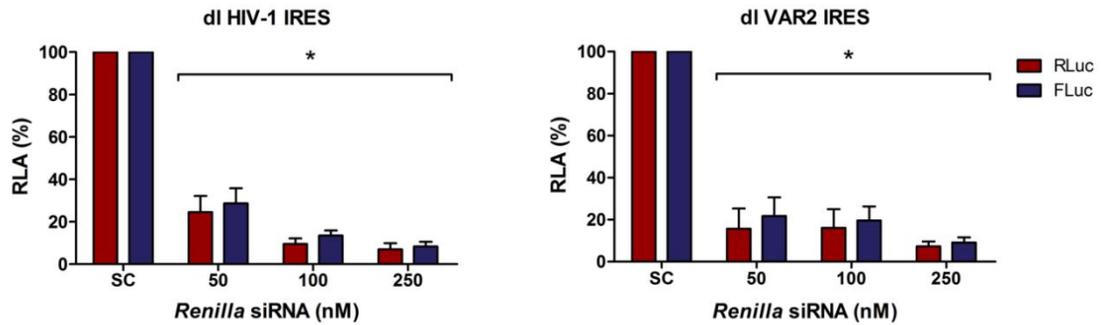
Debido a que en estos ensayos se utiliza un mRNA artificial exógeno, puede existir la posibilidad de que se generen sitios de *splicing* alternativo en los transcritos bicistrónicos. Dichos transcritos putativos, originados desde el *splicing* alternativo, podrían originar mRNAs monocistrónicos que codifiquen para FLuc, como se esquematiza en la **Figura 7A**. Por tanto, de existir *splicing* alternativo asociado a la región intercistrónica de interés, la actividad FLuc observada podría no deberse a la presencia de un elemento IRES.

Para evaluar la generación de transcritos monocistrónicos que pudieran dar cuenta de la actividad FLuc, se utilizó la estrategia de silenciamiento del mRNA bicistrónico por siRNA (**Figura 7B**), mediante la utilización de un siRNA diseñado para hibridar con la región codificante de RLuc (Renilla siRNA). Si toda la actividad de los reporteros RLuc y FLuc proviene de un transcrito bicistrónico único, se espera que al silenciar este mRNA con cantidades crecientes de Renilla siRNA, se observe una disminución en magnitudes similares de la actividad de ambos reporteros, ya que ambos estarían dejando de expresarse. Sin embargo, si se observa sólo la disminución del reportero RLuc, y no del reportero FLuc, esto dará cuenta de la presencia de un transcrito monocistrónico, que codifica sólo para FLuc, dando cuenta de una actividad no proveniente de un elemento IRES (**Figura 7A**).

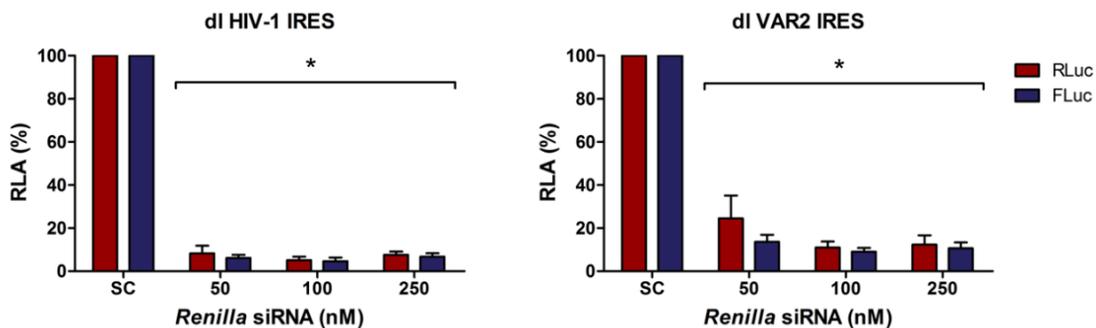


**Figura 7. Esquema del transcrito generado a partir de un posible proceso de splicing alternativo desde el mRNA bicistrónico.** A) A partir de un mRNA bicistrónico, debido a la presencia de una señal de splicing alternativo, podría generarse un mRNA monocistrónico, que dé cuenta de parte de la actividad FLuc, B) Para evaluar la generación de un transcrito monocistrónico proveniente de un posible splicing alternativo, se utiliza la estrategia de silenciamiento de RLuc mediante un siRNA. De existir actividad FLuc en presencia del siRNA contra RLuc se sospecha de la presencia de un mRNA monocistrónico que codifica para FLuc.

Para evaluar la presencia de *splicing* alternativo, se co-transfectaron en células HeLa o COS-7 las construcciones bicistrónicas en estudio, con concentraciones crecientes de Renilla siRNA, dirigido contra RLuc. Los resultados muestran una reducción en igual proporción de la actividad RLuc y FLuc en las dos construcciones evaluadas, dl HIV-1 IRES y dl VAR2 IRES, tanto en el contexto celular HeLa (**Figura 8**) como en el contexto celular COS-7 (**Figura 9**).



**Figura 8. Evaluación de splicing alternativo en mRNAs bicistrónicas expresados en células HeLa.** Actividad RLuc (rojo) y FLuc (azul) en células HeLa en presencia de un siRNA inespecífico (SC) o un siRNA contra RLuc (Renilla siRNA) en distintas concentraciones. Se evaluó la presencia de un splicing alternativo en la expresión de los mRNAs desde las construcciones dI HIV-1 IRES (panel izquierdo) y dI VAR2 IRES (Panel derecho). Se muestra la actividad relativa de RLuc y FLuc, con la actividad del siRNA inespecífico (SC) arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre las condiciones SC y las distintas concentraciones de siRNA contra RLuc con un  $P < 0,05$ .



**Figura 9. Evaluación de splicing alternativo en mRNAs bicistrónico expresados en células COS-7.** Actividad RLuc (rojo) y FLuc (azul) en células COS-7 en presencia de un siRNA inespecífico (SC) o un siRNA contra RLuc (Renilla siRNA) en distintas concentraciones. Se evaluó la presencia de un splicing alternativo en la expresión de los mRNAs desde las construcciones dI HIV-1 IRES (panel izquierdo) y dI VAR2 IRES (Panel derecho). Se muestra la actividad relativa de RLuc y FLuc, con la actividad del siRNA inespecífico (SC) arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre las condiciones SC y las distintas concentraciones de siRNA contra RLuc con un  $P < 0,05$ .

De estos ensayos se infiere que durante el procedimiento experimental no se genera un mRNA monocistrónico mediante splicing alternativo que pueda dar cuenta de la actividad FLuc observada, en ninguno de los dos modelos celulares.

Con los resultados obtenidos hasta este punto, descartando toda fuente de artefactos experimentales, se concluye que la región 5'UTR de pNL4.3 y VAR2 posee actividad IRES en los modelos celulares estudiados.

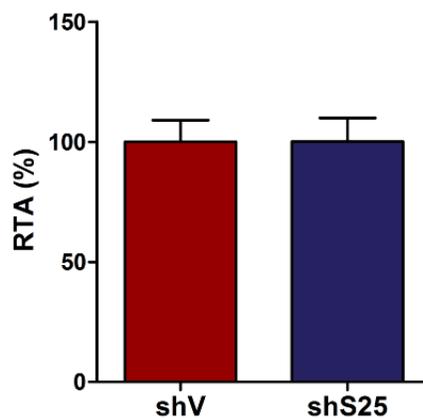
#### **4.1.3. La actividad del elemento HIV-1 IRES depende de la presencia de la proteína ribosomal S25**

Luego de confirmar la presencia de un IRES en la región 5'UTR de los mRNAs genómicos de pNL4.3 y VAR2 decidimos evaluar si la proteína ribosomal S25 (eS25) participaba en la función IRES de HIV-1, experimentos realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. S.R. Thompson, de la University of Alabama at Birmingham, USA.

La proteína ribosomal S25 es uno de los múltiples componentes proteicos de la subunidad ribosomal 40S eucariótica. Esta proteína se encuentra localizada en las cercanías del canal de unión al mRNA en el ribosoma (Rabl, et al., 2011). Se ha demostrado que eS25 es una proteína no esencial para la actividad traduccional cap-dependiente (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009), siendo sin embargo fundamental para la actividad de diversos elementos IRES presentes tanto en mRNAs virales como en mRNAs celulares (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009; Olivares, et al., 2014). Basados en estas observaciones, decidimos validar la actividad del elemento HIV-1 IRES en función de su dependencia por eS25.

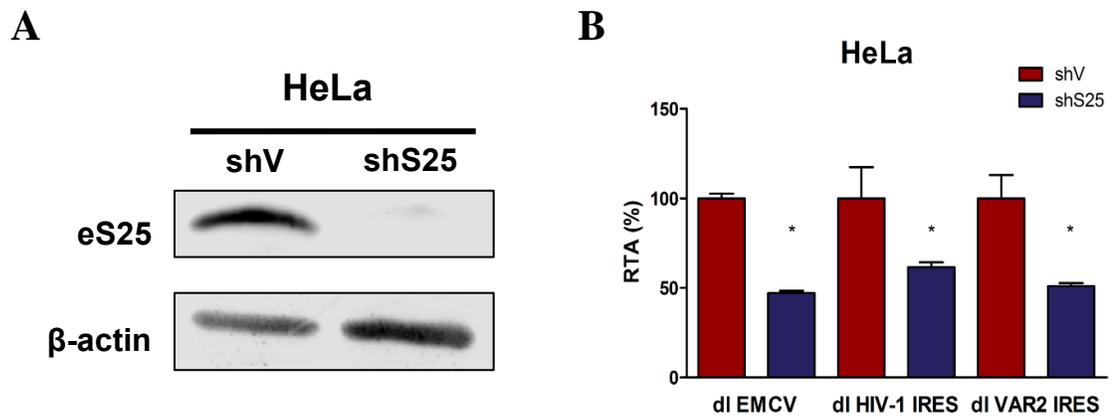
Para concretar este objetivo, se utilizó células HeLa, que expresa de forma constitutiva un shRNA dirigido contra la región codificante para eS25 (shS25) (Hertz, et al., 2013). De este modo, se evaluó la actividad traduccional de los elementos HIV-1 IRES y VAR2 IRES en un contexto celular que es carente de eS25. Como control se utilizó una segunda línea estable HeLa, la cual expresa el vector base del shRNA, pero que no expresa el shRNA contra S25, denominada shV (Hertz, et al., 2013). Se confirmó el silenciamiento de eS25 en células shS25 y la expresión de eS25 en células shV mediante *western blot* (**Figura 11A**).

Como control del sistema las células shV y shS25 se transfectaron con un plasmidio que codifica para un mRNA monocistrónico que expresa de manera cap-dependiente al reportero  $\beta$ -galactosidasa. En acuerdo a resultados publicados previamente (Hertz, et al., 2013) se observa que la traducción cap-dependiente no se ve alterada por la ausencia de eS25 (**Figura 10**).



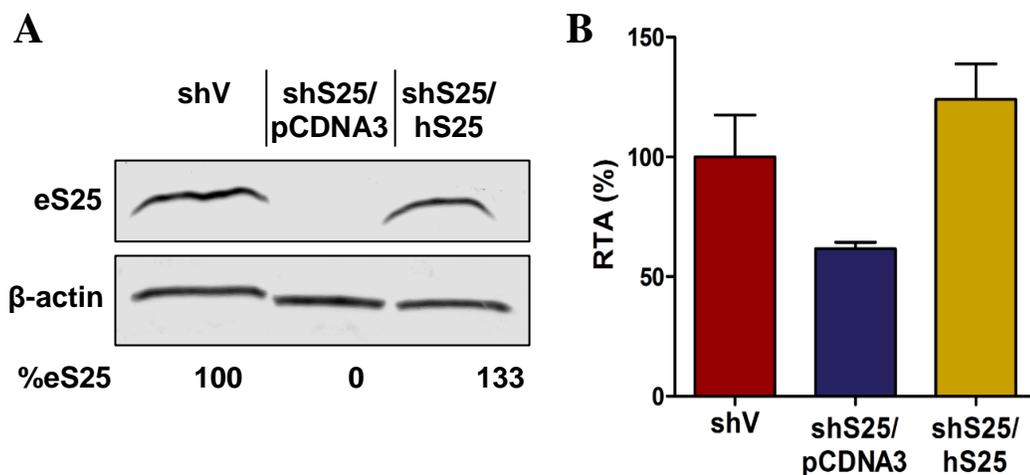
**Figura 10. Efecto de la ausencia de la Proteína Ribosomal S25 en la síntesis de proteínas cap-dependiente.** Actividad del reportero  $\beta$ -galactosidasa en líneas celulares HeLa que expresan de forma estable un shRNA dirigido contra S25 endógena (shS25) o el vector vacío (shV). La ausencia de S25 no afecta la síntesis cap-dependiente de la proteína reportera.

Luego, las células shV y shS25 fueron transfectadas con los reporteros bicistrónicos dl EMCV, dl HIV-1 IRES y dl VAR2 IRES. Al determinar la actividad IRES (FLuc/RLuc, expresada como RTA) (**Figura 11B**) se observa una disminución significativa de la actividad IRES al silenciar eS25, respecto a las células con expresión normal de eS25, para los tres elementos IRES evaluados.



**Figura 11. Efecto del silenciamiento de eS25 en la actividad IRES en el contexto celular HeLa.** A) Para determinar el correcto silenciamiento de eS25 endógeno, en la línea celular HeLa shS25, se detectó mediante *western blot* dicha proteína, y como control de carga de la muestra se detectó la proteína  $\beta$ -actina. B) La actividad IRES-dependiente de los elementos EMCV, HIV-1 IRES y VAR2 IRES en contexto bicistrónico, fue evaluada en presencia o ausencia de un shRNA contra S25 expresado de forma estable. Los resultados se muestran como actividad IRES relativa al reportero  $\beta$ -galactosidasa, con la actividad en la línea celular shV arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre la línea celular shV y la línea celular shS25 con un  $P < 0,05$ .

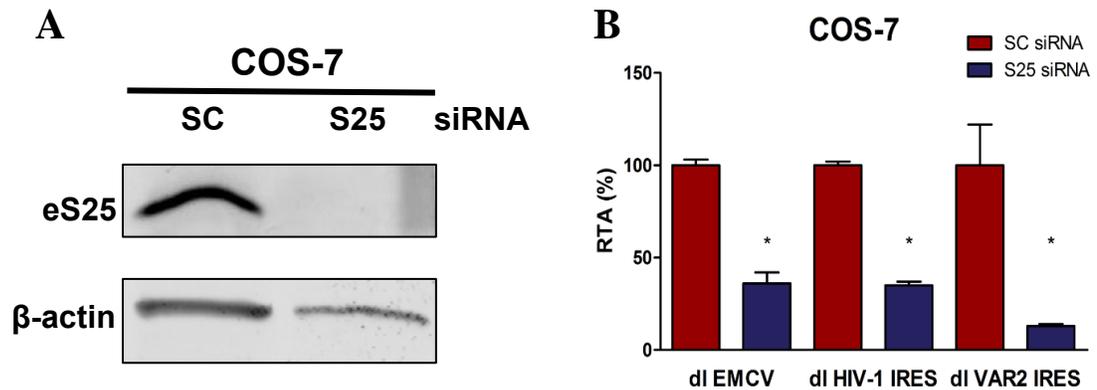
Con el fin de establecer si el fenómeno observado se asocia al silenciamiento de eS25, se realizó un ensayo de recuperación de función de eS25. Para dicho experimento, se utilizó un plásmido de expresión de eS25 (hS25) con mutaciones puntuales en su región codificante, las cuales le impiden ser reconocido por el shRNA contra eS25. La transfección de la línea celular HeLa shS25 con el plasmidio hS25 permite recuperar la expresión de eS25 (**Figura 12A**). Como control de la recuperación de expresión, se transfectó el plásmido base utilizado para expresar S25, pero carente de la región codificante de eS25 (pcDNA3). Junto con la recuperación de la expresión de eS25 se observa que la actividad del elemento HIV-1 IRES se reestablece (**Figura 12B**).



**Figura 12: Recuperación de expresión y funcionalidad de eS25.** A) Para determinar el correcto silenciamiento de eS25 endógeno, en la línea celular HeLa shS25 (shS25/pCDNA3), y luego observar la recuperación de la expresión de eS25 recombinante (shS25/hS25), se detectó mediante *western blot* dicha proteína. Como control de carga de la muestra se detectó la proteína  $\beta$ -actina. B) La actividad IRES-dependiente del elemento HIV-1 IRES en contexto bicistrónico, fue evaluada en los distintos contextos de expresión de la proteína eS25. Los resultados se muestran como actividad IRES relativa al reportero  $\beta$ -galactosidasa, con la actividad en la línea celular shV arbitrariamente en 100%.

Para descartar que el efecto observado en ausencia de eS25 sobre los elementos IRES era exclusivo del contexto celular HeLa, se decidió determinar el impacto del silenciamiento de eS25 en células COS-7. Por carecer de una línea celular COS-7 que expresara el shRNA contra eS25 de forma estable en contexto (como la línea HeLa-shS25), se diseñó un siRNA dirigido contra la región codificante de eS25, el cual fue transfectado en células COS-7. Como control las células COS-7 fueron también transfectadas con un siRNA control comercial, cuya secuencia no está dirigida contra ninguna región del genoma celular (SC siRNA). Posterior a la transfección del siRNA junto al DNA bicistrónico de interés, se confirmó el silenciamiento de la expresión de eS25 en el contexto celular COS-7, mediante la detección por *western blot* (**Figura 13A**).

Utilizando el modelo COS-7 silenciado para eS25, se evaluó la actividad traduccional de los elementos EMCV, HIV-1 IRES y VAR2 IRES. Se observa en la **Figura 13B** que la actividad IRES es significativamente menor en células donde se ha silenciado eS25.

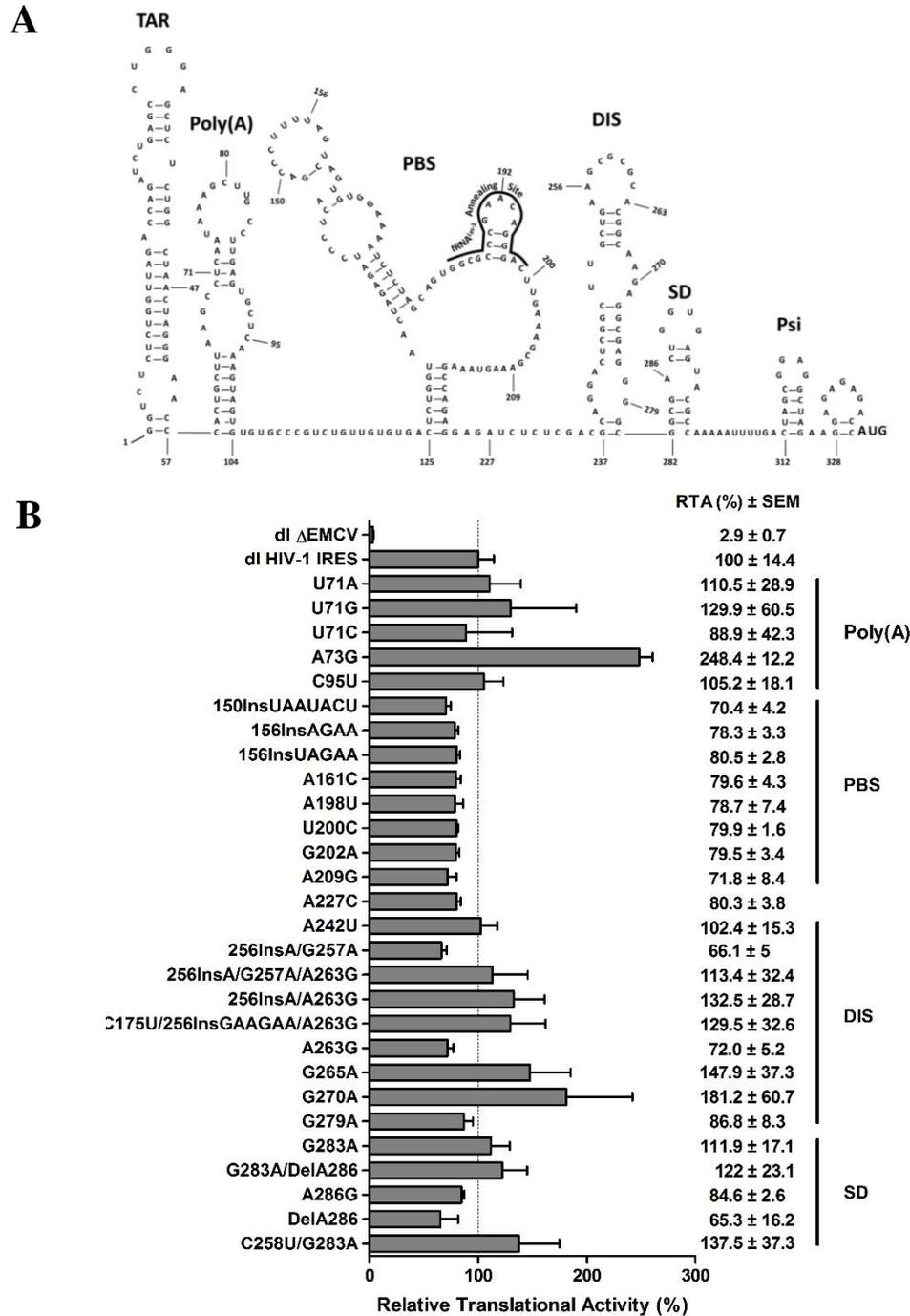


**Figura 13. Efecto del silenciamiento de eS25 en la actividad IRES en el contexto celular COS-7.** A) Para determinar el correcto silenciamiento de eS25 endógeno, en la línea celular COS-7 transfectada con un siRNA dirigido contra eS25 (S25 siRNA), se detectó mediante western blot dicha proteína, y como control se utilizó un siRNA no dirigido contra transcritos celulares (SC siRNA). Como control de carga de la muestra se detectó la proteína  $\beta$ -actina. B) La actividad IRES-dependiente de los elementos EMCV, HIV-1 IRES y VAR2 IRES en contexto bicistrónico, fue evaluada en presencia o ausencia del siRNA contra S25 transfectado transientemente. Los resultados se muestran como actividad IRES relativa al reportero  $\beta$ -galactosidasa, con la actividad en la línea celular COS-7 transfectada con el SC siRNA arbitrariamente en 100%. \* ANOVA entre la línea celular transfectada con SC siRNA y la línea celular transfectada con S25 siRNA con un  $P < 0,05$ .

A partir de estos resultados, se concluye en primera instancia, que tanto la línea celular HeLa, como la línea COS-7 son modelos en donde mediante el silenciamiento por distintas metodologías, es posible reducir significativamente la expresión de la proteína eS25. Esta baja en la expresión de eS25 impacta de manera negativa (reducción de aproximadamente un 50%) en la actividad de los elementos IRES evaluados. Este hallazgo establece que la actividad óptima de los IRESs evaluados requiere de eS25. Esta conclusión se confirma al restablecer la expresión de eS25 en células donde dicha proteína está experimentalmente reducida, recuperando la actividad de síntesis de proteínas IRES dependiente. Por lo tanto, la dependencia por eS25 observada es un hallazgo adicional que indica que la región 5'UTR de pNL4.3 y VAR 2 posee actividad IRES en el contexto de células HeLa y COS-7.

#### 4.1.4. Mutaciones estructurales influyen en la actividad del elemento HIV-1 IRES

Estudios previos han propuesto que el elemento HIV-1 IRES se asemeja a un IRES celular (Gendron, et al., 2011; T. M. Plank, et al., 2014). Habiendo confirmado que la región 5'UTR de HIV-1 posee actividad IRES en nuestro sistema experimental, decidimos explorar cómo la secuencia primaria de RNA impacta en la actividad IRES de HIV-1. Primero se decidió evaluar si mutaciones sobre la secuencia de la región 5'UTR de HIV-1 impactan su función en traducción. La racional de esta aproximación se basa en estudios previos que establecen que los IRESs celulares presentan una menor dependencia en la secuencia primaria de RNA que los IRESs virales (Baird, et al., 2007; Barría, et al., 2009; Guest, et al., 2004; Hellen, et al., 2001). Se realizaron mutaciones puntuales en la secuencia de la región 5'UTR de HIV-1. Las distintas posiciones modificadas fueron seleccionadas por estar presentes en alguna de las variantes naturales (VAR) de la región 5'UTR de HIV-1 obtenidas en un estudio previo (Vallejos, et al., 2012). Dentro de estas secuencias VAR, las cuales presentan múltiples modificaciones a lo largo de la región 5'UTR, se aisló algunas de estas mutaciones presentes en regiones doble hebra en la estructura de la región 5'UTR, evaluando así la influencia de modificaciones puntuales en la secuencia del elemento HIV-1 IRES en su actividad en contexto bicistrónico. Los resultados de estos ensayos confirman resultados previos (Brasey, et al., 2003; Gendron, et al., 2011; Vallejos, et al., 2012, 2011), e indican que la actividad del elemento HIV-1 IRES es resistente a mutaciones puntuales en la secuencia del RNA (**Figura 14**).

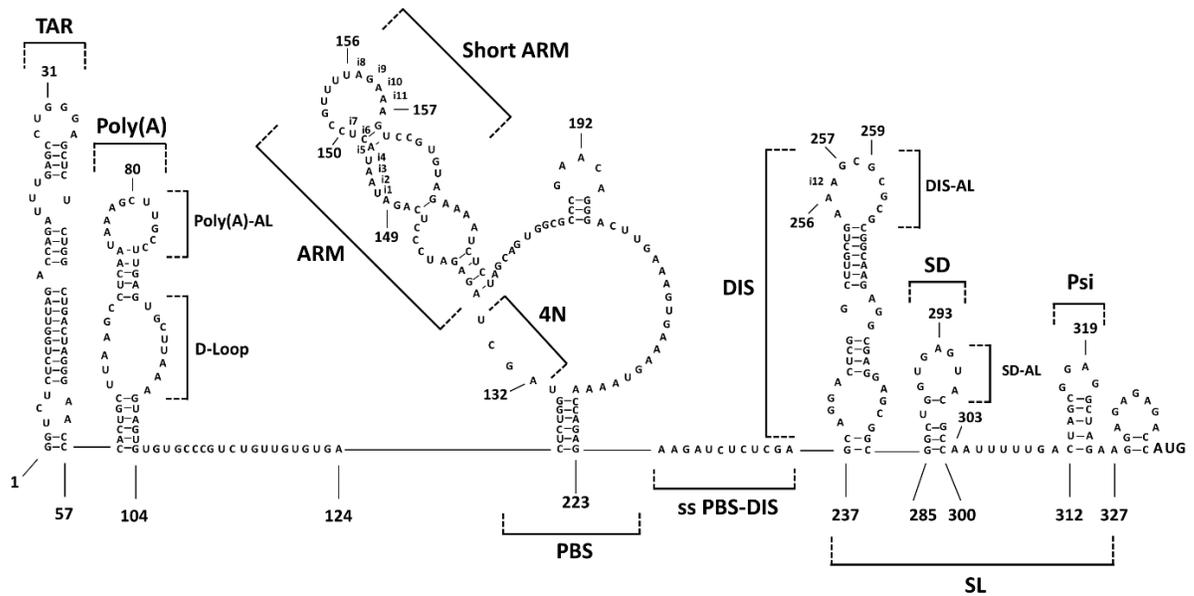


**Figura 14: Efecto de mutaciones puntuales en la región 5'UTR de HIV-1 sobre la actividad del elemento HIV-1 IRES.** A) Esquema de la estructura secundaria adoptada por la región 5'UTR de HIV-1, la cual contiene al elemento HIV-1 IRES. Se destacan los distintos dominios funcionales, y la localización de las mutaciones puntuales evaluadas. B) Actividad IRES observada para las mutaciones puntuales realizadas. Se señala la modificación exacta realizada, junto a su posición dentro de la región 5'UTR. Se destaca el dominio funcional en dónde se encuentran dichas mutaciones. La actividad está representada como RTA, la razón entre la actividad RLuc y FLuc, con la actividad de HIV-1 IRES arbitrariamente en 100%.

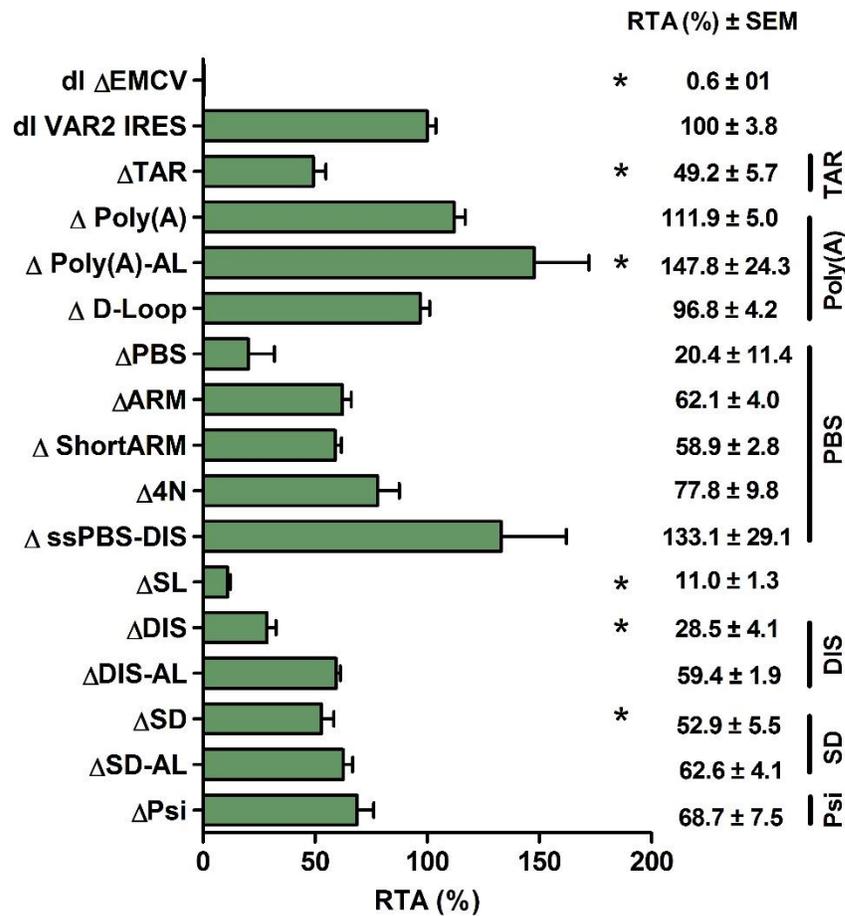
Una característica importante de los IRES celulares es que estos están constituidos por módulos estructurales de RNA (Baird, et al., 2007; Hellen, et al., 2001), por cuanto mutaciones puntuales no impactan de manera importante su actividad (Vallejos, et al., 2011; Yang, et al., 1997). Dado que al realizar los ensayos de mutaciones puntuales sobre la región 5'UTR de HIV-1 se observa que ninguna mutación puntual fue capaz de disminuir significativamente la actividad IRES (Vallejos, et al., 2012, 2011 y **Figura 14**), decidimos evaluar si la actividad del elemento HIV-1 IRES podía asociarse a módulos estructurales de RNA. Para evaluar esto, se decidió realizar deleciones en la región 5'UTR de HIV-1, basadas en la presencia de los distintos dominios estructurales encontrados en dicha región (Frankel, et al., 1998; Gendron, et al., 2011; Vallejos, et al., 2011 y **Figura 14A**). Dichos dominios estructurales fueron eliminados, con el fin de determinar la influencia de cada uno de estos módulos estructurales en la actividad global del elemento HIV-1 IRES.

En estos ensayos se utilizó el elemento VAR2 IRES, el cual presenta una actividad 4 veces mayor que el elemento HIV-1 IRES (pNL4.3). Cabe indicar que estudios previos han establecido que la estructura que adopta la región 5'UTR de VAR2 y pNL4.3 son equivalentes (Vallejos, et al., 2012), observado al comparar las **Figuras Figura 14A y Figura 15**. El supuesto que justifica el uso de VAR2 es que su mayor actividad IRES, relativo al IRES de pNL4.3, permitirá detectar de mejor manera las diferencias de actividad entre los vectores con las distintas deleciones estructurales.

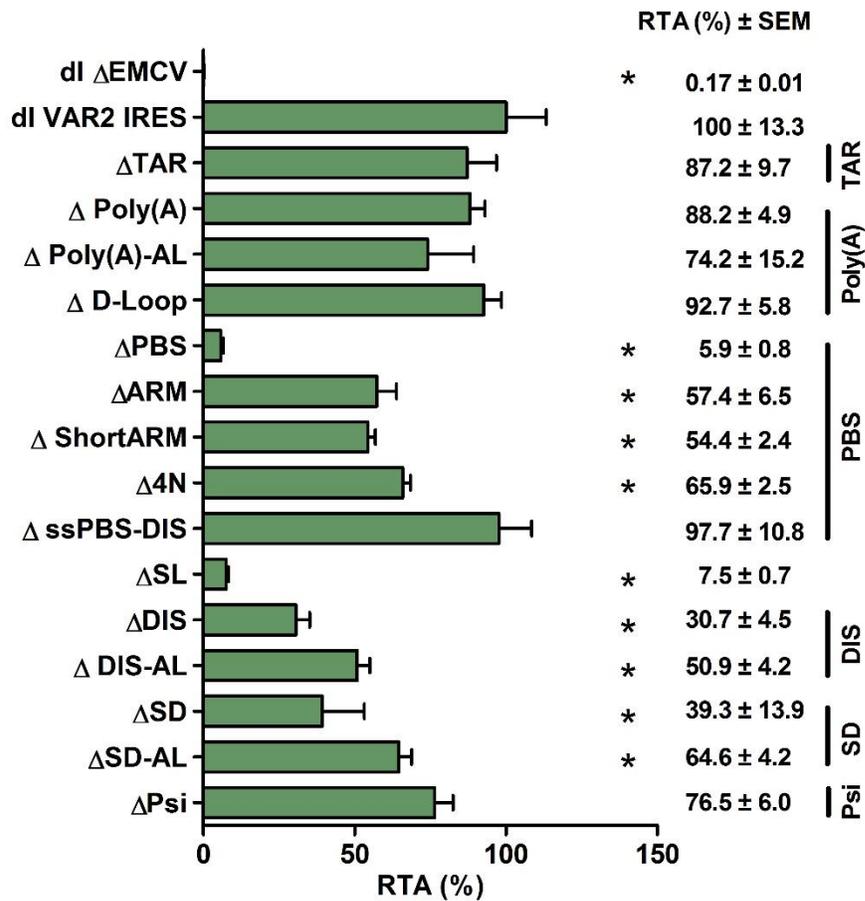
Los ensayos funcionales con las distintas mutaciones de dominios estructurales fueron realizados en las líneas celulares HeLa (**Figura 16**) y COS-7 (**Figura 17**).



**Figura 15: Esquema de la estructura secundaria de la región 5'UTR de VAR2.** Se muestra la secuencia y estructura secundaria de la región 5'UTR de VAR2, utilizada para los ensayos de deleciones estructurales. Las regiones modulares putativas que fueron eliminadas para los ensayos posteriores son nombradas y señaladas mediante corchetes sobre la estructura. Se indican algunas inserciones de secuencia (i1-i11), respecto a la secuencia del elemento HIV-1 IRES (pNL4.3). La numeración de las bases es respecto a la secuencia de la región 5' UTR de pNL4.3.



**Figura 16: Efecto de deleciones estructurales en la actividad del elemento VAR2 IRES, en contexto celular HeLa.** Una serie de deleciones, basadas en los dominios estructurales presentes en la región 5'UTR, fueron realizadas sobre el elemento VAR 2 IRES, con el fin de alterar la contribución de los módulos funcionales putativos en la actividad IRES total. Se nombra la región correspondiente eliminada, indicando el dominio estructural al que corresponde, junto al valor en porcentaje de actividad IRES  $\pm$  el error estándar de la media, con el elemento VAR2 IRES sin mutaciones arbitrariamente en 100%. Los resultados se presentan como RTA, la razón (FLuc/RLuc). \* ANOVA y posterior análisis de Dunnet comparando con el control VAR 2 IRES, con un  $P < 0,05$ .



**Figura 17. Efecto de deleciones estructurales en la actividad del elemento VAR2 IRES, en contexto celular COS-7.** Una serie de deleciones, basadas en los dominios estructurales presentes en la región 5'UTR, fueron realizadas sobre el elemento VAR 2 IRES, con el fin de alterar la contribución de los módulos funcionales putativos en la actividad IRES total. Se nombra la región correspondiente eliminada, indicando el dominio estructural al que corresponde, junto al valor en porcentaje de actividad IRES ± el error estándar de la media, con el elemento VAR2 IRES sin mutaciones arbitrariamente en 100%. Los resultados se presentan como RTA. \* ANOVA y posterior análisis de Dunnett comparando con el control VAR 2 IRES, con un  $P < 0,05$ .

Con el estudio de la actividad IRES de las distintas mutantes estructurales del elemento VAR2 IRES en un contexto bicistrónico, podemos observar que, en los dos contextos celulares evaluados, se observan efectos diferenciales según qué dominio es el eliminado de la región intercistrónica, con una clara baja en la actividad ante la delección de los dominios PBS, DIS, SD y SL.

Dentro de las diferencias observadas entre los dos modelos celulares, destaca la disminución en la actividad de la mutante  $\Delta$ TAR, de un 13% en células COS-7, y un 51% en células HeLa. También se observa que al eliminar el dominio Poly(A) no hay grandes diferencias en la actividad, pero al diseccionar dicho dominio, se comienzan a observar diferencias. La ausencia de la región apical ( $\Delta$ PolyA-AL) muestra efectos diferenciales en ambos contextos celulares, ya que al eliminarlo en el contexto HeLa la actividad aumenta en un 48%, mientras que en el contexto COS-7, la actividad se ve disminuida en un 26% (**Figura 16** y **Figura 17**). Esta diferencia en la actividad puede deberse a la existencia de un elemento regulatorio del IRES presente en el dominio Poly(A), descrito para el elemento HIV-1 IRES en contexto pNL4.3 (Gendron, et al., 2011), el cual podría funcionar mediante la unión diferencial de proteínas al RNA, lo cual ya ha sido demostrado para el dominio Poly(A) (Vallejos, et al., 2011), explicando así las diferencias observadas en las actividades entre los dos modelos celulares utilizados.

En línea con la descripción del IRES mínimo para HIV-1, que comprende desde el dominio PBS hasta el codón de inicio para Gag, el dominio PBS resulta ser fundamental para la actividad IRES: su eliminación reduce en un 80% su actividad en el modelo HeLa, y en un 94% para el modelo COS-7.

Dado que la delección del dominio PBS implica la eliminación considerable de 100 nucleótidos de los 336 que comprende el elemento HIV-1 IRES, es que se decidió eliminar dominios locales dentro de la región PBS, que han sido descritos como regiones con unión diferencial de proteínas celulares (Vallejos, et al., 2011). Para las mutantes  $\Delta$ ARM y  $\Delta$ ShortARM, que implican a eliminación del tallo que sobresale en el dominio PBS (**Figura 15**), se observa una disminución cerca al 40% en la actividad IRES, para ambos contextos celulares. Para la región simple hebra de 4 nucleótidos existente en el inicio del dominio PBS ( $\Delta$ 4N), se observa una reducción de 21% y 34% en la actividad IRES para los contextos HeLa y COS-7 respectivamente, reducción importante considerando que son sólo 4 nucleótidos los involucrados (**Figura 16 y Figura 17**).

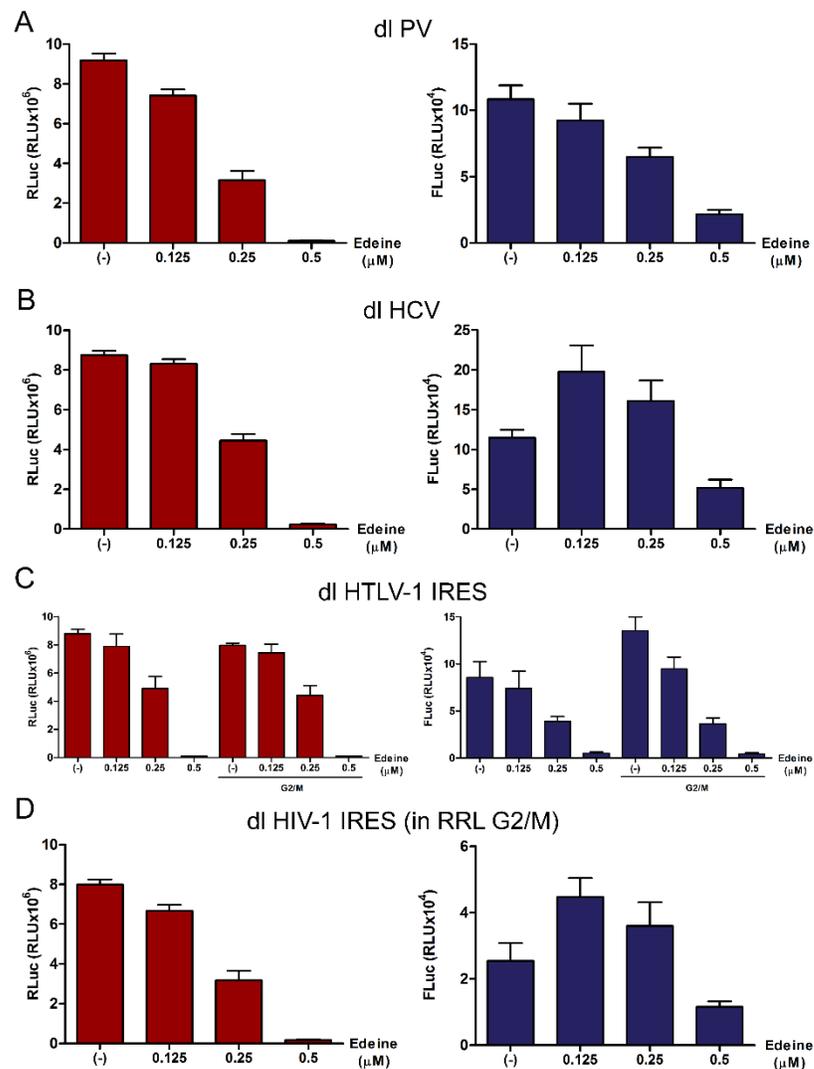
Al eliminar la región denominada *stem-loops* (SL), que comprende los tallos DIS, SD y Psi, se observa una reducción de un 89% en células HeLa, y un 93% en células COS-7. Esta zona del elemento HIV-1 IRES se asocia diferencialmente con proteínas celulares en condiciones favorables para la traducción IRES dependiente, lo cual da cuenta de la importancia de estos dominios en la actividad de este elemento IRES (Vallejos, et al., 2011). Al eliminar uno a uno los dominios DIS, SD y Psi, se observa que todos son capaces de disminuir la actividad del elemento HIV-1 IRES entre un 35% y un 60%, en ambos contextos celulares.

Cabe destacar que según lo observado en las mutantes  $\Delta$ PBS y  $\Delta$ SL, ninguno de los dos dominios posee la actividad IRES por sí solos, dando cuenta de que ambos dominios, PBS y SL, son necesarios para el funcionamiento del elemento HIV-1 IRES.

#### 4.1.5. El elemento HIV-1 IRES no realiza *scanning* ribosomal.

Dado que la región más 3' del 5'UTR del mRNA de VAR2 exhibe parte de los módulos esenciales para la actividad IRES (región SL), y estos se encuentran próximos al codón de inicio, una interrogante que surgió con los resultados obtenidos compete al lugar de reclutamiento del complejo de inicio de la traducción. Nos preguntamos si el complejo de inicio es reclutado río arriba del codón de inicio correspondiente, lo cual conllevará un proceso de *scanning* ribosomal, o bien directamente sobre el codón de inicio, sin realizar el proceso de *scanning* (Filbin, et al., 2009).

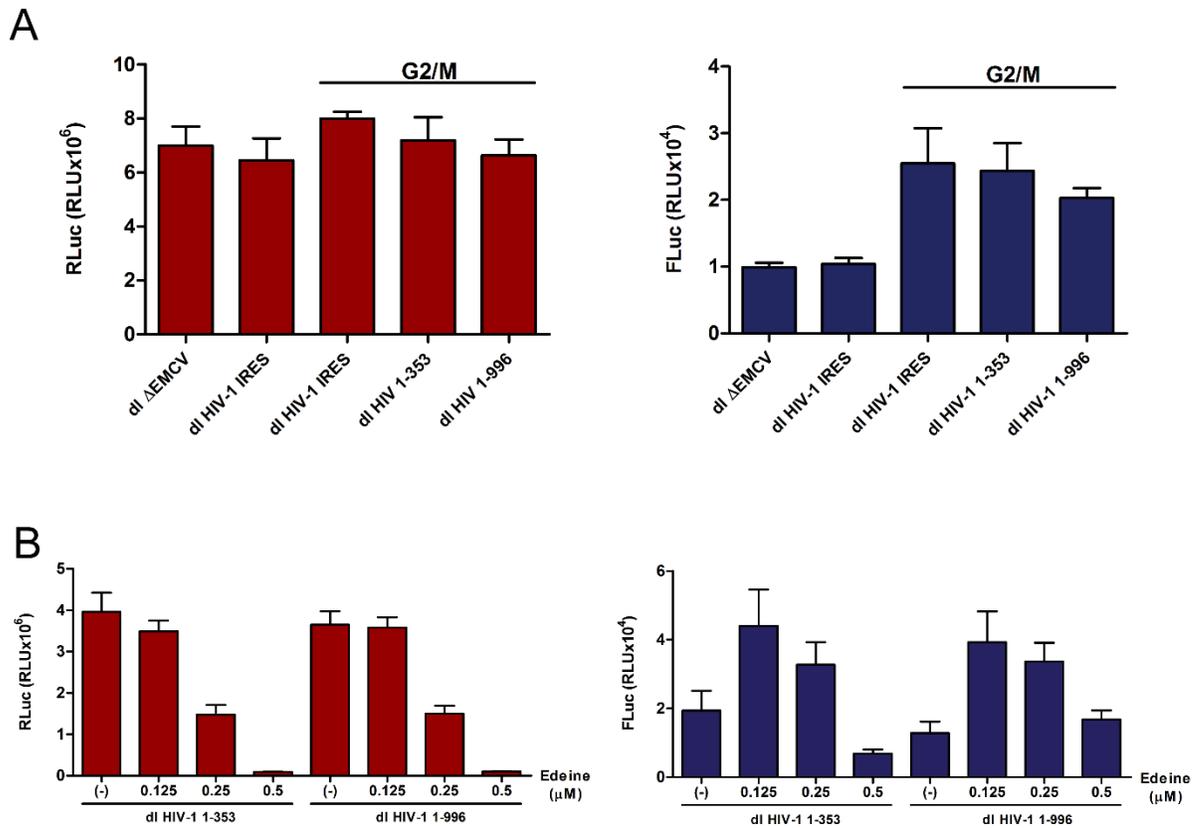
Para abordar el mecanismo que utilizaría el elemento HIV-1 IRES, se utilizó la droga edeína, antibiótico peptídico que en bajas concentraciones es capaz de inhibir el reconocimiento del codón de inicio, y con ello inhibir el proceso de *scanning*, y en altas concentraciones inhibe la síntesis de proteínas completamente al afectar el proceso de elongación (Kozak, et al., 1978). Estos ensayos funcionales fueron realizados en un modelo de síntesis de proteínas *in vitro* en el sistema RRL suplementado con extractos celulares (Vallejos, et al., 2011). Los controles utilizados en el ensayo fueron el elemento IRES de PV que realiza *scanning*, el elemento IRES de HCV, el cual no realiza *scanning*, y el elemento IRES del virus HTLV-1 que realiza *scanning* (Olivares, et al., 2014). Los resultados de estos ensayos se pueden ver en la **Figura 18**.



**Figura 18: Actividad IRES en condiciones de inhibición del scanning ribosomal.** La actividad IRES fue evaluada en plasmidios bicistrónicos, en un contexto *in vitro* en el sistema RRL. Se adicionó la droga edeína en concentraciones crecientes para observar la actividad de los distintos IRES evaluados. En la izquierda de cada panel se muestra la actividad del reportero RLuc y en la derecha la actividad del reportero FLuc. A) Actividad de los reporteros en presencia del elemento IRES de PV. B) Actividad de los reporteros en presencia del elemento IRES de HCV. C) Actividad de los reporteros en presencia del elemento IRES de HTLV-1, en ausencia de extractos celulares, o complementado con extractos celulares HeLa sincronizados en estadio G2/M. D) Actividad de los reporteros en presencia del elemento IRES de HIV-1 en presencia de extractos celulares HeLa sincronizados en estadio G2/M.

Se observa que en presencia de concentraciones crecientes de la droga edeina en un sistema *in vitro*, la traducción cap-dependiente (gráfico izquierdo en cada panel de la **Figura 18**) se ve inhibida en todo el rango de concentraciones, indicando la dependencia del *scanning* ribosomal para la expresión del reportero RLuc de forma cap-dependiente. En el caso de la traducción IRES dependiente (gráfico derecho en cada panel de la **Figura 18**), en acuerdo a resultados previamente reportados, se observa que PV, el cual depende del *scanning*, es sensible a edeína en todo el rango de concentraciones, al igual que HTLV-1 (Olivares, et al., 2014; J. Vera-Otarola, et al., 2012). El elemento IRES de HCV, el cual no realiza *scanning* (Balvay, et al., 2009), aumenta su actividad en presencia de 0,25  $\mu\text{M}$  de edeína pero su actividad disminuye a una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  de la droga (**Figura 18C**). Esto indica que a 0.5  $\mu\text{M}$  de edeina se inhibe el proceso de elongación. Al igual que el elemento IRES de HCV el IRES de HIV-1 incrementa su actividad a 0.125 y 0.25  $\mu\text{M}$  de edeina, dando cuenta de que este elemento no requiere que los complejos de inicio realicen *scanning*.

Dado que en el contexto del mRNA viral la región 5'UTR, que contiene al IRES, está acompañada de la región codificante para la proteína viral Gag, y no de la región codificante para FLuc como en el reportero bicistrónico, es que se decidió evaluar la actividad IRES y el funcionamiento del mecanismo de *scanning* en nuestro modelo de estudio, agregando porciones de 18 o 660 nucleótidos de la región codificante para Gag, recapitulando mejor el contexto en que se encuentra el IRES en el mRNA viral (**Figura 19**). Antecedentes previos sostienen que la presencia de la región codificante para Gag tendría un efecto regulatorio sobre el IRES, por la presencia de un elemento inhibitorio del IRES (Valiente-Echeverría, et al., 2013), y por la potencial participación de la proteína viral Gag en la síntesis de proteínas mediada por el IRES (Keane, et al., 2015).



**Figura 19: Scanning ribosomal y actividad del elemento HIV-1 IRES en presencia de la región codificante para Gag.** Se muestra la actividad de los reporteros RLuc y FLuc para las distintas construcciones analizadas, en un contexto *in vitro* en el sistema RRL. En la izquierda de cada panel se muestra la actividad de RLuc y en la derecha la actividad FLuc. A) Actividad de los elementos HIV-1 IRES en presencia de la región codificante para Gag, en ausencia o presencia de extractos celulares HeLa sincronizados en estadio G2/M B) Actividad en presencia de concentraciones crecientes de la droga edeína, para observar la actividad de *scanning* de las distintas construcciones del elemento HIV-1 IRES en presencia de la región codificante para Gag, complementado con extractos celulares HeLa sincronizados en estadio G2/M.

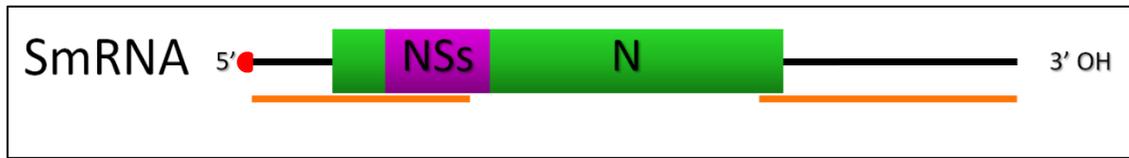
Los resultados muestran que, en presencia de la región codificante para Gag, la actividad IRES de HIV-1 aumenta frente a bajas concentraciones de la droga edeína, indicando que el complejo de iniciación es reclutado directamente sobre el codón de inicio sin requerir del proceso de *scanning*.

## 4.2. RESULTADOS PARTE 2

LAS REGIONES 5' Y 3' NO-TRADUCIDAS DEL MRNA DEL SEGMENTO S DEL ORTHOHANTAVIRUS ANDES POSEEN ESTRUCTURAS SECUNDARIAS ESTABLES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE INICIO DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

### 4.2.1. Las regiones no traducidas del SmRNA son altamente estructuradas

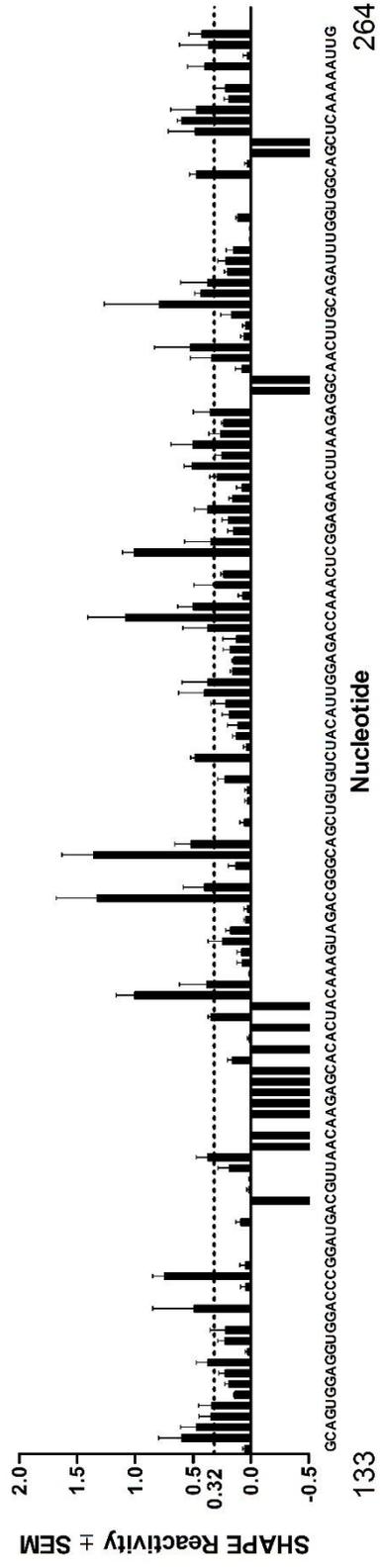
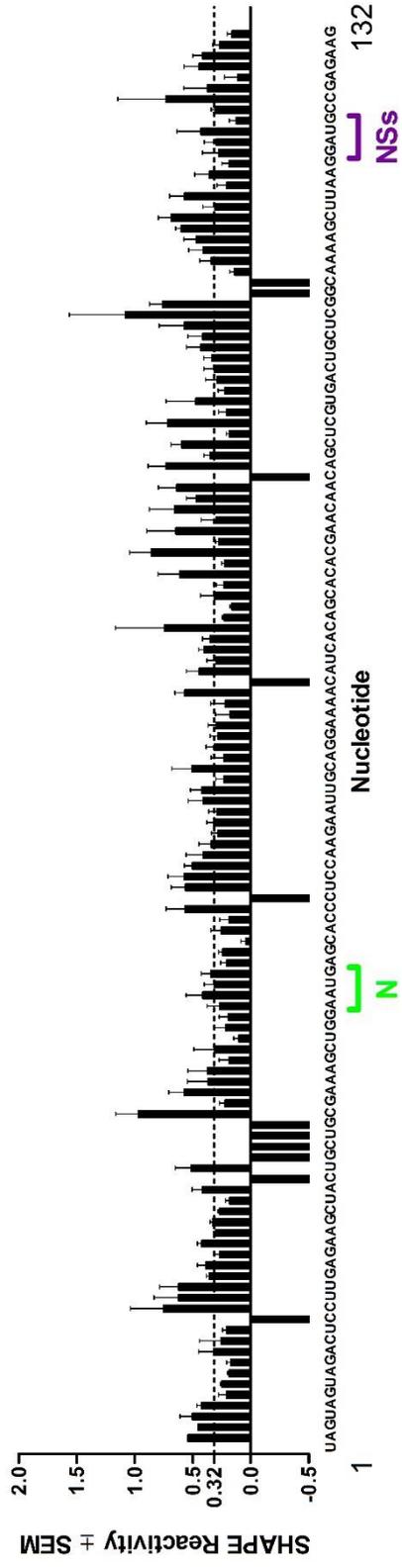
El mRNA del segmento S (SmRNA) del *Orthohantavirus Andes* se caracteriza por presentar una estructura 5' cap, una región 5'UTR, la región codificante para las proteínas N y NSs y una región 3'UTR, la cual no posee una cola poly(A) (J. Vera-Otarola, et al., 2010; Walter, et al., 2011). A la fecha, las estructuras secundarias de las regiones 5' y 3'UTR no han sido determinadas. Por tanto y con el fin de establecer las estructuras secundarias de RNA presentes en las regiones 5' y 3'UTR se utilizó la estrategia de *Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension* (SHAPE) (Angulo, et al., 2016; Leonard, et al., 2013; Low, et al., 2010; Merino, et al., 2005; Mortimer, et al., 2007; Siegfried, et al., 2014; Vallejos, et al., 2011). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. Bruno Sargueil (Université Paris Descartes, Francia). Para estos ensayos se decidió utilizar como molde el SmRNA completo, y se determinó la estructura de la región que comprenden tanto la región 5'UTR y parte de la región codificante del mRNA, así como la estructura de la región 3'UTR, zonas destacadas con línea amarilla en la **Figura 20**.



**Figura 20: Esquema del SmRNA del virus andes.** Se muestra el esquema del mRNA del segmento S del virus andes, con la estructura 5'cap en rojo, las regiones 5' y 3' UTR en negro, y las regiones codificantes de N y NSs en verde y morado respectivamente. Se observa destacado en amarillo la localización de las regiones UTR analizadas, abarcando para la región 5'UTR desde el extremo 5' del mRNA, hasta la región río abajo del codón de inicio de NSs, y para la región 3'UTR desde 50 bases antes del codón Stop de N, hasta el extremo 3' del SmRNA.

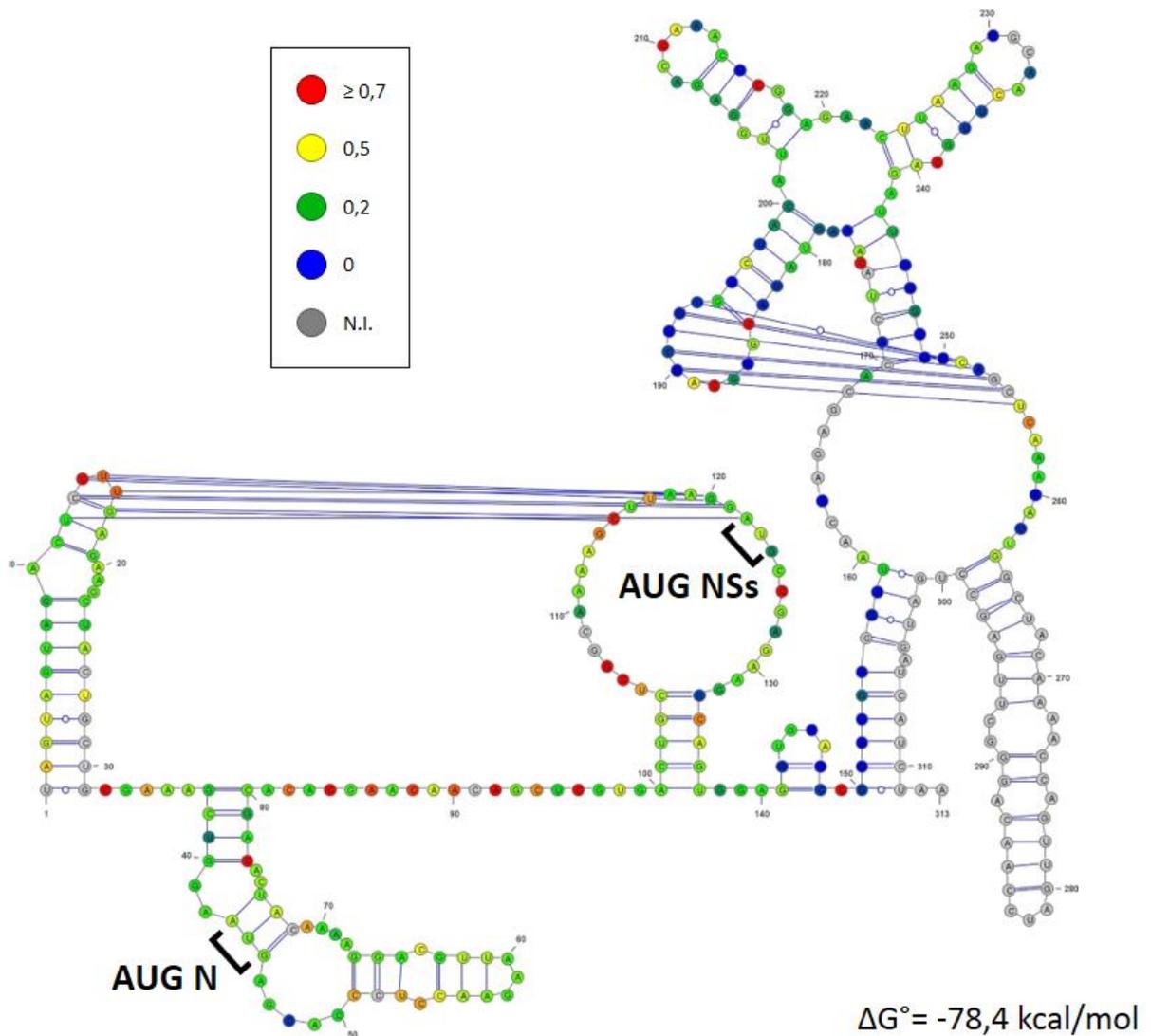
Utilizando una serie de oligonucleótidos marcados fluorescentemente, diseñados para abarcar la región completa a analizar, se procedió al ensayo de SHAPE. Para el análisis de la región 5'UTR del SmRNA del virus Andes (ANDV), se utilizó dos oligonucleótidos, denominados “Rev\_5'NCR” y “5\_UTR\_DS\_ANDV” (**Tabla 4**), los cuales hibridan con la molécula del SmRNA de ANDV en regiones distintas, río abajo del codón de inicio de la proteína NSs, y cercano al codón de término de la región codificante de NSs respectivamente. Los datos obtenidos del análisis de la región 5'UTR del SmRNA, mediante la estrategia de SHAPE, se presentan en la **Figura 21**

**Figura 21: Histograma de la reactividad SHAPE de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV.** En los gráficos se observa la reactividad de SHAPE de la región analizada, desde la posición 1 a 132 en el gráfico superior, y desde la posición 133 a la 264 del SmRNA, abarcando la región 5'UTR. Se muestra la secuencia nucleotídica y la reactividad SHAPE de cada base. En verde se indica la localización del codón de inicio para la proteína N, y en morado el codón de inicio para la proteína NSs. Se destaca con una línea punteada sobre los histogramas el promedio de reactividad SHAPE de la región analizada, con un valor de 0,32.



En el histograma de la reactividad SHAPE de la región 5'UTR se observa que la reactividad es superior a 0, con un promedio de 0,32, lo cual indica la existencia de estructuras secundarias (Low, et al., 2010). Cabe destacar que se encuentran regiones con baja reactividad, lo que implica un alto grado de estructuración, especialmente en toda la sección río abajo del codón de inicio de NSs (destacado en morado), y en las regiones inmediatamente cercanas a los codones de inicio de N (destacado en verde) y de NSs. La información experimental obtenida fue analizada utilizando el software QuSHAPE (Karabiber, et al., 2013), como se detalla en la sección Métodos. Dichos datos fueron utilizados para la predicción de estructuras secundarias, mediante herramientas informáticas.

Utilizando el software de predicción de estructuras secundarias RNAStructure (Mathews, 2014), se procedió a modelar *in silico* la estructura secundaria de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV. La información estructural obtenida experimentalmente mediante SHAPE, se utilizó para incorporar restricciones al modelamiento del software RNAStructure, optimizando así el modelamiento. La información experimental da cuenta del grado de estructuración de cada una de las bases analizadas. Con la información experimental representada en la **Figura 21**, en conjunto con la secuencia de la región analizada incorporada en el software RNAStructure (Mathews, 2014), se modeló la estructura secundaria de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV. El modelo obtenido se puede observar en la **Figura 22**.



**Figura 22: Estructura secundaria de RNA de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV.** Representación de la estructura secundaria de RNA predicha por software, en donde se indica la secuencia y la posición dentro de la secuencia. Las bases dentro de la cadena de RNA se encuentran unidas entre ella por líneas grises. Las interacciones predichas entre bases nitrogenadas son representadas por líneas azules. La escala continua de colores superpuesta en el modelo, representa la reactividad SHAPE obtenida experimentalmente (ver **Figura 21**), con los siguientes significados: gris para nucleótidos no informativos experimentalmente, azul para nucleótidos sin reactividad, verde para nucleótidos con baja reactividad, amarillo para nucleótidos con reactividad media, rojo nucleótidos con alta reactividad. Se destaca la posición en la estructura de los codones de inicio de N y NSs.

El modelo de estructura secundaria obtenido para la región 5'UTR destaca por la presencia de una primera estructura de horquilla en el inicio del SmRNA, incorporando la región que rodea a la estructura 5'cap, y una segunda horquilla en la región que incluye al codón de inicio de la proteína N. La región que rodea al codón de inicio de NSs se encuentra en regiones de simple hebra, dentro de un loop en la tercera horquilla de la estructura. A su vez, el codón de inicio para NSs se encuentra en una interacción de larga distancia con la región apical de la primera horquilla presente en la estructura.

Río abajo de los codones de inicio, se encuentra una región altamente estructurada, con múltiples horquillas ramificadas, y que también participan en interacciones entre tallos de forma local, lo cual ayudaría a otorgarle rigidez a dicha zona.

La región 3'UTR también se estudió, dado que se ha reportado que es fundamental para el inicio de la síntesis de proteínas a partir del SmRNA de ANDV (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Para el análisis estructural de la región 3'UTR del SmRNA, se diseñaron dos oligonucleótidos marcados fluorescentemente (**Tabla 4**) capaces de reconocer la región 3'UTR (492 bases). El histograma con la reactividad SHAPE para la región 3'UTR se observa en la **Figura 23**.

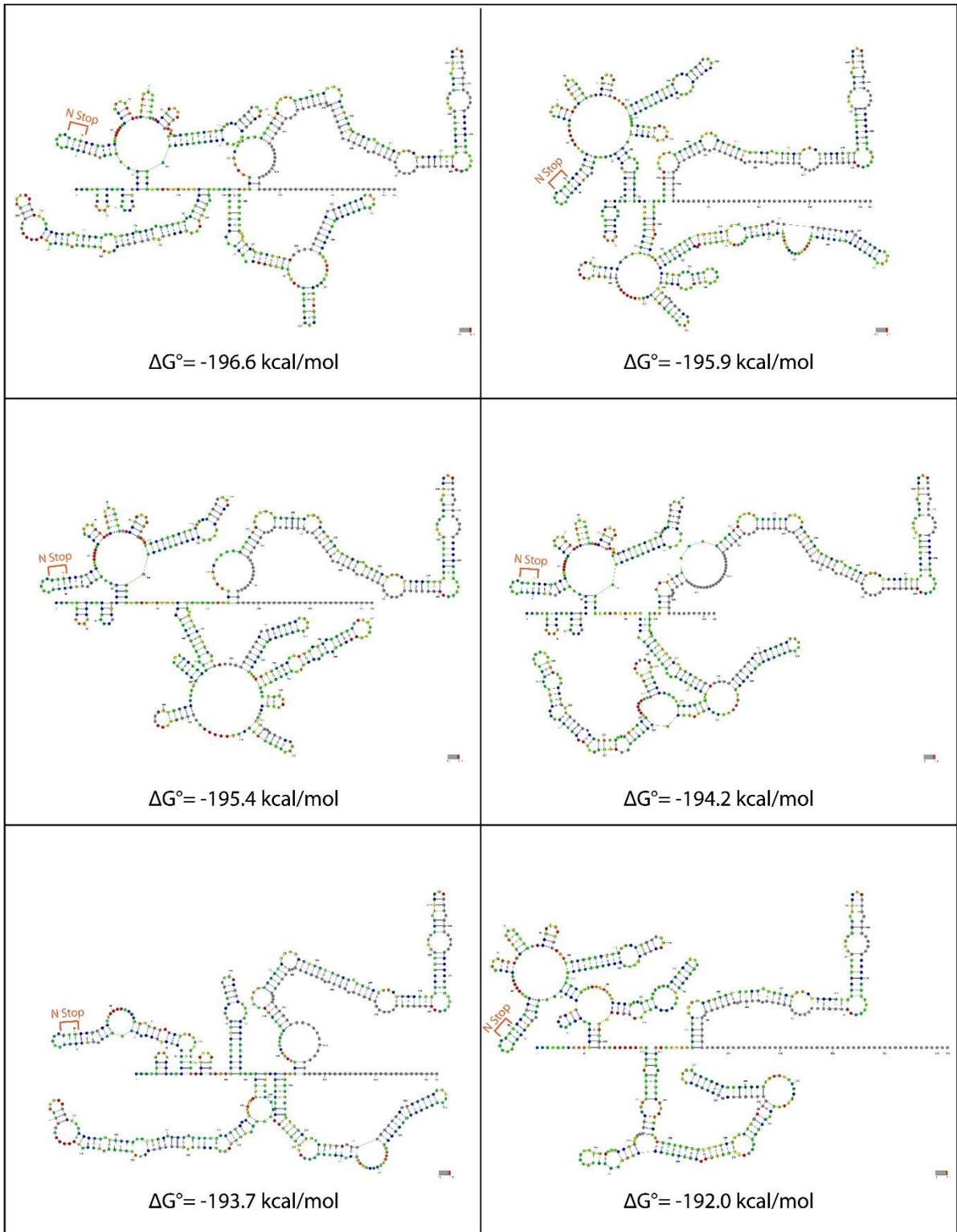
**Figura 23: Histograma de la reactividad SHAPE de la región 3'UTR del SmRNA de ANDV.** En los gráficos se observa la reactividad de SHAPE de la región analizada, desde la posición 1280 a 1433 en el gráfico superior, desde la posición 1434 a 1587 en el gráfico central, y desde la posición 1588 a 1739 en el gráfico inferior, enumerado según la secuencia del SmRNA, abarcando desde las últimas 50 bases de la región codificante de N, hasta la base 1739 del SmRNA, 83 bases antes del término de la región 3'UTR. Se muestra la secuencia nucleotídica y la reactividad SHAPE de cada base. En naranja se indica la localización del codón de término para la proteína N, marcando el inicio de la región 3'UTR desde la base siguiente. Se destaca con una línea punteada sobre los histogramas el promedio de reactividad SHAPE de la región analizada, con un valor de 0,30.



En el histograma correspondiente a la reactividad SHAPE observada para la región 3-UTR del SmRNA, se aprecia un promedio de reactividad de 0,30, similar al observado para la región 5'UTR, con zonas dentro de la región que presentan menor reactividad por extensiones mayores que la región 5'UTR, dando cuenta de zonas altamente estables a nivel estructural, y zonas con reactividad superior al promedio, lo cual da cuenta de regiones simple hebra o estructuras débiles en la región.

Con el fin de determinar la estructura secundaria de esta región de RNA, se realizó un modelamiento utilizando el software *RNAStructure*, en conjunto con las restricciones al modelamiento impuestas por la reactividad SHAPE de cada posición de la secuencia. Los resultados de este modelamiento podemos observarlos en la **Figura 24**, donde se destacan las estructuras potenciales más óptimas desde el punto de vista energético.

**Figura 24: Estructuras secundarias de RNA propuestas para la región 3'UTR del SmRNA de ANDV.** Representación de las estructuras secundarias de RNA predicha por software, en donde se indica la secuencia y la posición dentro de la secuencia. Las bases dentro de la cadena de RNA se encuentran unidas entre ella por líneas grises. Las interacciones predichas entre bases nitrogenadas son representadas por líneas azules. La escala continua de colores superpuesta en los modelos representa la reactividad SHAPE obtenida experimentalmente (ver **Figura 23**), con los siguientes significados: gris para nucleótidos no informativos experimentalmente, azul para nucleótidos sin reactividad, verde para nucleótidos con baja reactividad, amarillo para nucleótidos con reactividad media, rojo nucleótidos con alta reactividad. Se destaca la posición en cada estructura del codón de término de N.



● N.I.

● 0

● 0,2

● 0,5

●  $\geq 0,7$

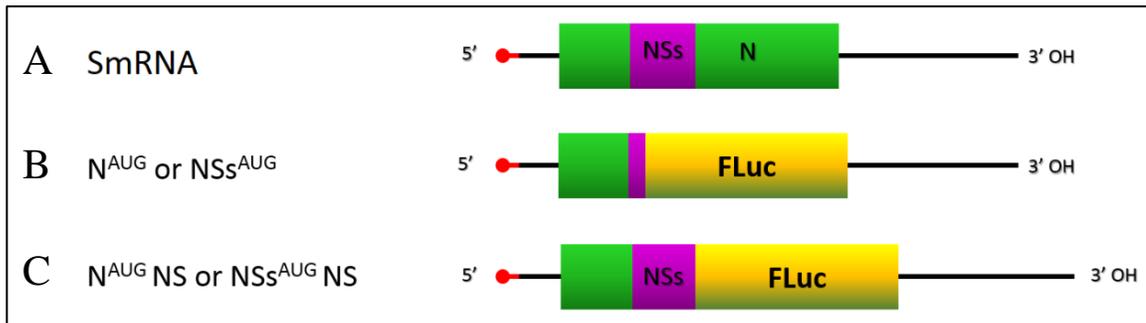
Dada la complejidad de la región 3'UTR, en términos de su extensión, lo cual se traduce en la alta probabilidad de múltiples interacciones entre distintas regiones de su secuencia, es que el software de modelamiento RNAStructure no nos permite establecer una sola estructura como la más probable en términos energéticos, más bien nos lleva a sugerir que la región 3'UTR es un elemento de RNA dinámico, esto ya que hay múltiples estructuras posibles que cumplen con las restricciones experimentales observadas tras el análisis de SHAPE. Si bien algunas de las 6 estructuras más óptimas comparten ciertas características estructurales, como tallos de gran extensión y horquillas ramificadas similares en ambos extremos de la región analizada, a partir solamente del modelamiento y posterior análisis de las estructuras es complejo designar cuál de ella(s) posee mayor relevancia funcional para la síntesis de proteínas. Dada la complejidad observada en la región 3'UTR se decidió marginar su análisis como parte del trabajo de esta Tesis.

#### 4.2.2. Estructuras en el 5'UTR modulan el reconocimiento de los codones de inicio del SmRNA

Una vez establecidas las estructuras de RNA presentes en la región 5'UTR, decidimos determinar su posible participación en el inicio de la síntesis de proteínas no canónica. Con este fin se realizaron mutaciones sitio-dirigidas en la región 5'UTR, basadas en la información estructural obtenida en la **Figura 22**.

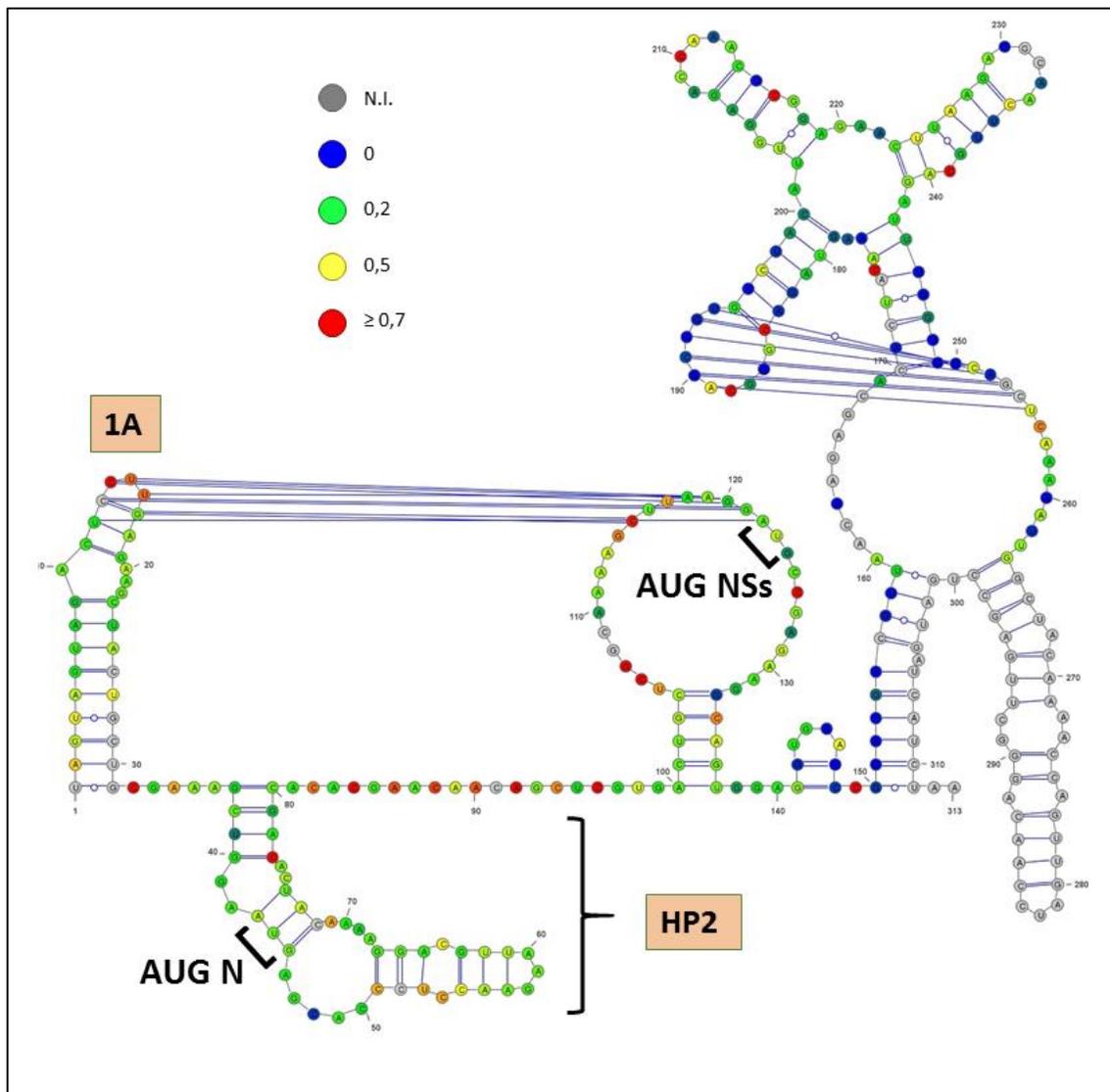
Los estudios funcionales realizados hasta ahora sobre la región 5'UTR, se centran solamente en la función de los codones de inicio de N y NSs (J. Vera-Otarola, et al., 2012), sin hacer hincapié en el contexto estructural en que dichos codones de inicio de la traducción se encuentran. El reportero original del SmRNA con que se describió el mecanismo de *leaky scanning*, posee en su región 5'UTR, río arriba del gen reportero FLuc, la región 5'UTR desde el nucleótido 1 del SmRNA, hasta el segundo codón de la región codificante para NSs. Dicho reportero no contempla las estructuras de RNA presentes en la región codificante de NSs, observadas en la **Figura 22**. Para mejorar el modelo de estudio, dado que esta vez contamos con una estructura secundaria completa de la región 5'UTR del SmRNA, se decidió extender la construcción reportera original, para que pueda contener los nucleótidos correspondientes a la región codificante de NSs hasta justo antes de su codón de término, reconstituyendo así el contexto de secuencia y estructura del codón de inicio de NSs. De este modo, se completó la región 5'UTR del reportero hasta alcanzar una extensión de 337 bases (24 bases más que en el SmRNA original, debido a la adición de sitios de restricción para el clonamiento).

En la **Figura 25** se muestra de forma esquemática la complementación y mejoramiento del contexto de la región 5'UTR del reportero, para incluir el contexto de secuencia y estructura alrededor de los codones de inicio del SmRNA.



**Figura 25: Representación esquemática de los reporteros utilizados y su contexto.** A) Esquema del RNA mensajero del Segmento S de ANDV. B) Reportero anteriormente utilizado para los estudios funcionales de la síntesis de proteínas a partir de la región 5'UTR del SmRNA de ANDV. Río arriba del gen reportero FLuc, se localizan los elementos propios del SmRNA, como la región 5'UTR, el codón de inicio de la proteína N junto a parte de su región codificante, y sólo dos codones de la región codificante de NSs, contando con una construcción reportera que no considera el contexto de secuencia y estructura que rodea a los codones de inicio. N<sup>AUG</sup> da cuenta del reportero FLuc en fase con el codón de inicio de N. NSs<sup>AUG</sup> da cuenta del reportero FLuc en fase con el codón de inicio de NSs. C) Esquema de la nueva construcción reportera, optimizada para estudiar la influencia del contexto de secuencia y estructura alrededor de los codones de inicio de la proteína N y NSs, al agregarse la región codificante para la proteína NSs, la cual es parte fundamental de la estructura de la región en estudio.

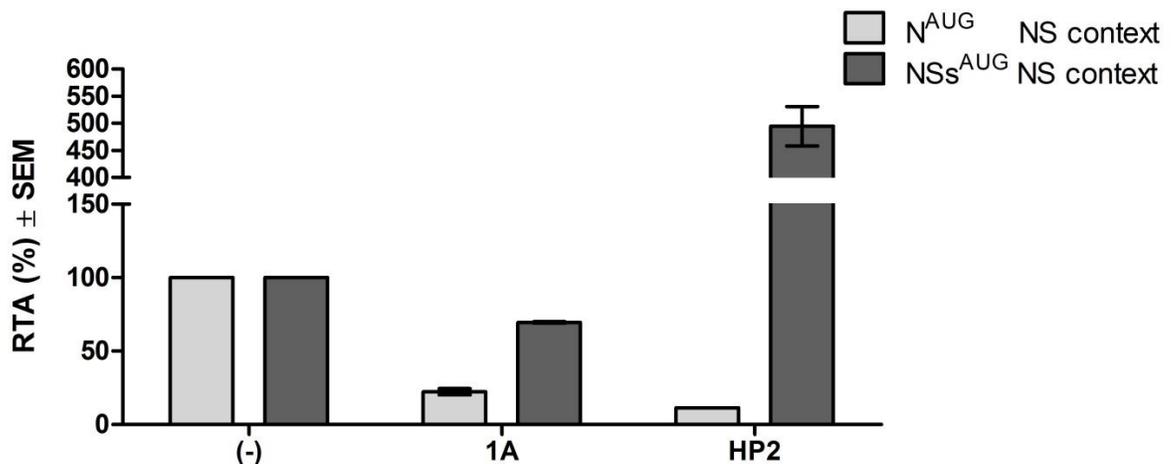
Utilizando la información obtenida desde la estructura secundaria de RNA de la región 5'UTR del SmRNA, determinada mediante la estrategia de SHAPE, decidimos realizar mutaciones dirigidas con el objetivo de modificar la estructura secundaria. Las secciones de la región 5'UTR que fueron sometidas a modificación se esquematizan en la **Figura 26**. Se eligieron dichos dominios dentro de la estructura completa dado que involucran tanto al codón de inicio de N, o bien la nueva interacción de larga distancia que está vinculada estructuralmente con el codón de inicio de NSs (**Figura 22**).



**Figura 26: Localización de mutaciones dirigidas contra la estructura de la región 5'UTR del SmRNA.** Esquema de la estructura secundaria de la región 5'UTR del SmRNA en estudio. Se indica en cajas rosadas la localización de los dominios estructurales que serán modificados, con el fin de evaluar funcionalmente su efecto sobre el inicio de la síntesis de proteínas. **1A** corresponde al primer tallo de la estructura, en donde se modificará la región apical, interrumpiendo la interacción de larga distancia de dicho tallo. **HP2** Corresponde al segundo tallo, el cual será modificado para aumentar su estabilidad, a un valor de  $\Delta G$  cercano al tallo Tar presente en la región 5'UTR del mRNA completo de HIV-1, el cual debido a su estabilidad es capaz de inhibir el *scanning* ribosomal (Parkin, et al., 1988).

Como se muestra en la **Figura 26**, los dominios estructurales a ser modificados involucran tanto al codón de inicio de N como al codón de inicio de NSs. La mutación denominada **1A** modifica el primer tallo presente en la estructura de la región, de modo tal que se impide la interacción de larga distancia con la región que rodea al codón de inicio de NSs. La mutación denominada **HP2** modifica la estabilidad del segundo tallo, donde está contenido el codón de inicio para N, haciéndola más estable y con un valor de  $\Delta G$  capaz de inhibir el proceso de *scanning* ribosomal (Parkin, et al., 1988).

Las mutaciones se introdujeron en el contexto de los reporteros  $N^{AUG}NS$  y  $NSs^{AUG}NS$  (ver **Figura 25**), para evaluar su efecto sobre la iniciación a partir de los codones de inicio de N y NSs por separado. Los ensayos funcionales se realizaron en cultivo celular, mediante la transfección de los respectivos mRNAs sintetizados *in vitro*. Los resultados de estos ensayos se observan en la **Figura 27**.



**Figura 27: Actividad traduccional relativa (RTA) de las mutantes dirigidas contra la estructura secundaria de la región 5'UTR, para los codones de inicio de N y Nss.** Para cada construcción, dependiendo de la detección del inicio desde el codón N ( $N^{AUG}$ ) o NSs ( $NSs^{AUG}$ ), se realizó la medición de la actividad traduccional relativa, en las condiciones sin mutaciones (-) o con las mutaciones en el primer tallo (1A) o en el segundo tallo (HP2) de la estructura. El valor de RTA para cada contexto, en condición sin mutación, fue situado en un 100% de actividad.

Para el contexto del codón de inicio N (contexto N<sup>AUG</sup>NS), observamos que la mutación **1A** reduce en un 77% la expresión del reportero. A su vez, al modificar la estabilidad del segundo tallo en la mutante **HP2**, tallo que incluye la región que rodea al codón de inicio de N, observamos que se reduce en un 88% la expresión del reportero. Esto sugiere que ambas estructuras participan en el proceso de inicio de la traducción desde el codón de inicio de N.

Para el contexto del codón de inicio NSs (contexto NSs<sup>AUG</sup>NS), se observa que la primera mutación en la zona apical del primer tallo de la estructura (**1A**) reduce solo en un 30% la expresión del reportero. Sorpresivamente, la estabilización del segundo tallo en la mutante **HP2**, el cual no está directamente involucrado estructuralmente con el codón de inicio de NSs, conduce un incremento cercano a un 500% en la actividad del reportero respecto al control sin mutación. Estos resultados sugieren un efecto diferencial de ambas mutaciones sobre el reconocimiento del codón de inicio de NSs.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis anterior sugieren que las estructuras de RNA presentes en la región 5'UTR del SmRNA impactan en el reconocimiento de ambos codones de inicio, destacando el rol de las estructuras de RNA en la regulación del inicio de la síntesis de proteínas desde este mRNA viral.

## 5. DISCUSIÓN

Las estructuras de RNA son cruciales en el control del inicio de la síntesis de proteínas en eucariontes (Babendure, et al., 2006; Hinnebusch, et al., 2016; Kozak, 1989). Estructuras estables en la región 5'UTR pueden reducir o bloquear tanto el reclutamiento de la maquinaria de inicio, como el proceso de *scanning*, lo que permite controlar el inicio canónico de la traducción. A su vez, los mecanismos de inicio no-canónicos estudiados en esta Tesis se sustentan en la existencia de estructuras de RNA capaces de reemplazar las funciones de los componentes de la maquinaria canónica de inicio. La existencia de estructuras de RNA que pueden reclutar de forma interna los complejos de inicio, sin depender del cap, hacen posible la existencia de mecanismos de control y de expresión génica en condiciones de inhibición global de la síntesis de proteínas canónica (Jackson, et al., 2010).

Los principales organismos que han hecho uso de estos mecanismos alternativos han sido los virus, ya que dependen exclusivamente de la maquinaria celular para sintetizar exitosamente sus proteínas (Condit, 2013). Estos mecanismos no canónicos existentes previamente dentro de la célula han sido adoptados y aprovechados por los patógenos virales, donde usualmente son necesarios para sintetizar proteínas en condiciones de estrés celular, cuando la traducción canónica se encuentra inhibida, o para modular la expresión de un gen en un momento del ciclo celular determinado.

Se decidió estudiar la influencia de estructuras de RNA en la síntesis de proteínas no canónica utilizando dos mRNAs modelo para inicio de la traducción IRES-dependiente, y poli(A) independiente, provenientes de patógenos virales humanos, dado que el estudio de la síntesis de proteínas es mucho más abordable utilizando mRNAs exógenos en un contexto celular.

### 5.1. Discusión parte 1

El RNA genómico de HIV-1, que posee estructura 5'cap y cola poly(A), codifica para las proteínas estructurales Gag y Gag-Pol (Frankel, et al., 1998). El inicio de la traducción de este mRNA puede ocurrir por el mecanismo canónico cap-dependiente (Berkhout, et al., 2011; Ricci, et al., 2008), por un mecanismo no-canónico cap-dependiente pero eIF4E independiente (Sharma, et al., 2012; Soto-Rifo, et al., 2012), o por un mecanismo dependiente de IRES (Brasey, et al., 2003; Buck, et al., 2001; Gendron, et al., 2011; T.-D. M. Plank, et al., 2013; T. M. Plank, et al., 2014; Vallejos, et al., 2012, 2011). Interesantemente, los datos sugieren que la síntesis de Gag, pero no la de Gag-Pol puede proceder mediante un mecanismo cap-independiente (Monette, et al., 2013). Esta redundancia en la expresión de Gag, utilizando diversos mecanismos canónicos y no canónicos, sugiere que la regulación de la síntesis de esta proteína es crucial en el ciclo replicativo de HIV-1. Esta observación es sostenida por artículos que muestran a Gag como la proteína responsable de la mayoría de las etapas tardías del ciclo viral (Göttlinger, 2001). Por ejemplo, Gag selecciona y captura el RNA genómico viral desde el citoplasma para ser encapsidado (Poole, et al., 2005), dirige el ensamblaje de la partícula viral, y por si sola es suficiente para la organización, gemación y liberación de partículas tipo viral desde una célula (Göttlinger, 2001). Luego de la liberación de la partícula viral, Gag es

procesada dentro de la partícula, dando origen a las proteínas estructurales del virión, esenciales durante la infección (Scarlata, 2003). Basados en la gran cantidad de funciones esenciales de Gag dentro del ciclo replicativo, es que es posible que el virus haya seleccionado evolutivamente diferentes estrategias para asegurar la traducción del mRNA genómico y garantizar la expresión de Gag a lo largo del ciclo replicativo. Es de notar que la redundancia de mecanismos cap-dependientes e IRES-dependientes está conservada en otros retrovirus (Amorim, et al., 2014; Balvay, et al., 2007; Brasey, et al., 2003; Monette, et al., 2013; Theophile Ohlmann, et al., 2000; Olivares, et al., 2014; Ricci, et al., 2008; Vallejos, et al., 2009).

Debido a la aparente relevancia de asegurar la expresión de Gag cuando la síntesis de proteínas cap-dependiente esta inhibida, en este trabajo de tesis nos enfocamos en entender el mecanismo de traducción mediado por el elemento IRES localizado en la región 5'UTR del mRNA completo viral, denominado HIV-1 IRES (Brasey, et al., 2003; Gendron, et al., 2011; T.-D. M. Plank, et al., 2013). A la fecha, los detalles moleculares del funcionamiento del elemento HIV-1 IRES no son completamente conocidos (Guerrero, et al., 2015; T. Ohlmann, et al., 2014).

El elemento HIV-1 IRES es activo en células HeLa y COS-7 (**Figura 2 a Figura 9**), aunque en relación con otros elementos IRES, su actividad es baja en células HeLa (**Figura 2**) (Olivares, et al., 2014; T.-D. M. Plank, et al., 2013). De todos modos, la actividad del elemento HIV-1 IRES es 100 veces superior a la del control negativo, por lo que el modelo celular HeLa sigue siendo válido para caracterizar los mecanismos que median la iniciación IRES-dependiente en HIV-1. Estos resultados sugieren que el elemento HIV-1 IRES es activo en distintos tipos celulares, aunque su nivel de actividad varía entre ellos. Este elemento IRES presenta mayor actividad en líneas celulares de linfocitos T (T.-D. M. Plank, et al., 2013), pero dicho modelo es

transfectado de forma poco eficiente, lo cual lo hace un modelo poco atractivo para estudios moleculares y funcionales, al diferencia de los modelos HeLa y COS-7 mostrados en este trabajo. Aunque la magnitud de la actividad del elemento HIV-1 IRES varía entre los modelos Hela y las líneas de linfocitos T, los datos y las conclusiones obtenidas son consistentes entre ellos (Brasey, et al., 2003; T.-D. M. Plank, et al., 2013), sugiriendo que el mecanismo central de la traducción mediada por el elemento HIV-1 IRES es el mismo, sin importar el modelo celular utilizado.

Usando líneas celulares HeLa y COS-7, establecimos que la traducción mediada por el elemento HIV-1 IRES es dependiente de eS25 (**Figura 10 a Figura 13**). Interesantemente, todos los elementos IRES, desde los presentes en mRNAs celulares hasta los presentes en mRNAs virales, han mostrado ser dependientes de eS25 para su actividad (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009; Olivares, et al., 2014). Tanto la línea celular HeLa shS25 con la expresión de eS25 silenciada constitutivamente (**Figura 11**), y la línea celular COS-7 con silenciamiento transitorio de eS25 (**Figura 13**), muestran una reducción en la actividad del elemento HIV-1 IRES. Se ha caracterizado previamente el efecto de la ausencia de eS25 en el metabolismo de la línea celular HeLa, sin mostrar efectos en el crecimiento, morfología ni en la síntesis global de proteínas (Hertz, et al., 2013). Más relevante para este estudio, es que el silenciamiento de eS25 no tiene impacto alguno en la síntesis de proteínas cap-dependiente (**Figura 10**) (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009). Dado esto, el hecho de mostrar una reducción en la síntesis de proteínas modulada por la región 5'UTR de HIV-1, provee de evidencia de la existencia de un elemento IRES en dicha región, y se valida aún más la presencia de este elemento en dos contextos celulares diferentes (HeLa y COS-7, **Figura 11 y Figura 13**).

Luego, el foco de nuestro estudio se volcó a entender de mejor manera el mecanismo molecular del funcionamiento de este elemento. Estudios previos han mostrado que mutaciones de nucleótidos únicos en la región 5'UTR de HIV-1 no tienen impacto en la función IRES (T.-D. M. Plank, et al., 2013; Vallejos, et al., 2012, 2011). Adicionalmente, algunas publicaciones proponen que la región 5'UTR es una región estructuralmente plástica, capaz de adoptar múltiples conformaciones, lo cual va en línea con su rol en múltiples procesos del ciclo replicativo (Huthoff, et al., 2002; Keane, et al., 2015; Lu, et al., 2011). Estas observaciones nos llevaron a evaluar la contribución de los dominios estructurales definidos en la región 5'UTR de HIV-1 en la actividad IRES. Al realizar mutaciones secuenciales desde los extremos 5' y 3' de la región 5'UTR, Brasey, et al. mostraron que el dominio Poli(A) no era parte del elemento IRES mínimo, pero identificaron los dominios PBS, SD y Psi como cruciales para la actividad IRES. Recientemente, Plank, et al. confirmaron estas observaciones. Ambos estudios muestran que tanto los dominios PBS y SL por sí solos carecen de actividad IRES. Usando una estrategia diferente, hemos identificado los elementos estructurales necesarios para la actividad IRES óptima (**Figura 16** y **Figura 17**). Estos hallazgos se condicen con la noción de una “estructura IRES central” (*core IRES structure*), el cual está definido por la presencia de los dominios PBS, DIS y SD (**Figura 16** y **Figura 17**) (Brasey, et al., 2003; T. M. Plank, et al., 2014).

En el año 2014, Plank, et al. establecieron que el inicio de la traducción mediado por el elemento HIV-1 IRES es dependiente de eIF4A. Este factor es una helicasa de RNA, sugiriendo un mecanismo de iniciación interna del tipo “reclutamiento y *scanning*” (*land and scan*), en donde la subunidad ribosomal 40S es reclutada río arriba del codón de inicio, y procede a un proceso de búsqueda de un codón de inicio en sentido 5' a 3'. De todos modos, el solo requerimiento de eIF4A no es en sí mismo un indicio de *scanning* ribosomal. Por ejemplo, los elementos IRES

de EMCV, del virus de la fiebre aftosa (*foot and mouth disease virus*; FMDV), y el virus de la encefalomyelitis murina de Theiler reclutan el ribosoma directamente sobre el codón de inicio, sin realizar *scanning*, y aun así su actividad es dependiente de la presencia de eIF4A (Kieft, 2008; Kolupaeva, et al., 2003). En el caso de EMCV, el factor eIF4A induce cambios conformacionales en el extremo 3' del elemento IRES, para facilitar la unión del complejo de inicio 43S al codón de inicio (Kolupaeva, et al., 2003).

Dado que los elementos centrales de HIV-1 IRES están localizados río arriba del codón de inicio, este ordenamiento sugiere que este IRES puede reclutar los complejos de inicio directamente sobre el codón de inicio. Por esta razón, un análisis del modo de reclutamiento sobre el codón de inicio se nos hizo necesario. Con la utilización de edeina, una droga peptídica capaz de inhibir la etapa de inicio de la síntesis de proteínas, mediante el bloqueo del reconocimiento del codón de inicio por parte de los ribosomas que están realizando el proceso de *scanning* (Dinos, et al., 2004; Kozak, et al., 1978; Lancaster, et al., 2006), pudimos revelar que la subunidad ribosomal 40S es cargada en la región 5'UTR en (o muy cerca de) el codón de inicio para Gag, sin necesidad de realizar *scanning* (**Figura 18** y **Figura 19**), observación contraria a lo sugerido previamente (Berkhout, et al., 2011; T. M. Plank, et al., 2014). Un mecanismo libre de *scanning* fue observado independiente del contexto en que se sitúa el codón de inicio de la región 5'UTR de HIV-1, ya sea seguido inmediatamente de la región codificante del reportero FLuc, o seguido de la región codificante para Gag (**Figura 18** y **Figura 19**). Esto sugiere que la región codificante para Gag no afecta el mecanismo empleado por el elemento HIV-1 IRES en el sistema RRL complementado con extractos celulares G2M.

En su conjunto, estos hallazgos dan nuevos antecedentes en el funcionamiento a nivel molecular del elemento HIV-1 IRES, mostrando que su naturaleza es modular, con las estructuras PBS, DIS y SD como elementos del RNA centrales para su funcionamiento. Por primera vez se muestra la dependencia del elemento HIV-1 IRES por la presencia de la proteína eS25, cuya importancia ha sido demostrada para diversos elementos IRES tanto virales como celulares (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009; Olivares, et al., 2014), sin importar su mecanismo de reclutamiento del ribosoma ni su requerimiento por factores de inicio de la traducción. Es de destacar que la proteína eS25 no es esencial para la síntesis de proteínas cap-dependiente, lo cual valida nuestros ensayos como reflejo de la actividad del elemento HIV-1 IRES, dado que la actividad resultante de artefactos como promotor críptico o *splicing* alternativo, no sería afectada por el silenciamiento de eS25, ya que ocurrirían de forma cap-dependiente. De hecho, la actividad del elemento HIV-1 IRES se ve reducida en un 50% en ausencia de eS25, en ambos modelos celulares evaluados, lo cual es similar en magnitud a la disminución observada para otros elementos IRES (Hertz, et al., 2013). El fundamento molecular que explicaría el requerimiento de eS25 por parte de los elementos IRES es desconocido, pero se han intentado plantear modelos sobre cómo podría ocurrir (Hertz, et al., 2013; Landry, et al., 2009). Experimentos que continúen con estudiar este mecanismo se requerirán para comprender el rol de eS25 en la actividad del elemento HIV-1 IRES.

En su conjunto, estos hallazgos son consistentes con un modelo en donde la proteína viral Gag es sintetizada en estadios tardíos de la infección, con la traducción cap-dependiente inhibida (Amorim, et al., 2014; Monette, et al., 2013), haciendo uso del elemento IRES modular presente en la región 5'UTR de su mRNA completo, que consiste de múltiples elementos que son capaces de reclutar al ribosoma directamente sobre el codón de inicio.

## 5.2. Discusión parte 2

El mRNA del segmento S del *Orthohantavirus Andes* posee una estructura 5'cap, desde la cual se puede iniciar la síntesis de proteínas de forma canónica, pero este mRNA carece de la segunda estructura fundamental encontrada en los mRNAs eucarióticos canónicos: no posee cola poliadenilada en su extremo 3'. A pesar de no contar con dicha estructura, este mRNA de igual forma es capaz de ser traducido y dar origen a las proteínas virales codificadas en él, ya que la región 3' no traducida (3'UTR) reemplaza funcionalmente a la cola poliadenilada (J. Vera-Otarola, et al., 2010). Este fenómeno no es extremadamente excepcional, ya que existen diversos mRNAs virales y celulares que son capaces de circularizar sin tener cola poly(A), con la ayuda de distintas proteínas no canónicas para poder llevar a cabo el inicio de la traducción (Dengue virus (Polacek, et al., 2009), Histonas (Marzluff, et al., 2008)) o con la ayuda de estructuras de RNA e interacciones de larga distancia entre ellas (F. Gao, et al., 2014; Simon, et al., 2013).

El *Orthohantavirus Andes* también posee una peculiaridad en la región codificante del mRNA del segmento S: presenta dos marcos de lectura abiertos en distinta fase, uno contenido dentro del otro, que darán origen a dos proteínas de secuencia diferente: La Nucleoproteína (N), y la proteína No Estructural del segmento S viral (NSs), con su marco de lectura contenido dentro del de N (**Figura 20**). Se sabe a la fecha que ambas proteínas son expresadas en un contexto de infección viral *in vitro* (J. Vera-Otarola, et al., 2012), y mediante estudios con diversas construcciones de DNA, se estableció que el mecanismo por el cual se reconoce el codón de inicio de NSs es mediante el *leaky scanning* del codón de inicio de N. Este modelo supone la existencia de un *scanning* lineal por parte de los ribosomas, es decir, los complejos de inicio comienzan a recorrer desde el extremo 5' del mRNA, hasta encontrarse con el primer codón de inicio de N, y algunos complejos no reconocerán dicho codón, y continuarán su proceso de

*scanning* hasta encontrar río abajo el codón de inicio de NSs. Dentro de los datos no publicados de la tesis Doctoral de Jorge Vera-Otarola, 2009, se observa una discordancia respecto a este mecanismo, en donde la ausencia del codón de inicio de NSs, afecta el reconocimiento del codón de inicio de N, río arriba en el mRNA. Esta observación no pudo ser explicada en su momento, pero se cree que se debería a la presencia de estructuras de RNA presentes en el SmRNA, las cuales afectarían el modo en que son reconocidos tanto el codón de inicio de N como el de NSs, regulando así a nivel estructural el proceso de *leaky scanning* y con ello la expresión de ambas proteínas.

Dentro de este trabajo de tesis, se caracterizaron las estructuras secundarias presentes alrededor de ambos codones de inicio (**Figura 22**), y se observa que efectivamente hay estructuras estables asociadas a ambos codones de inicio, parte de las cuales fueron analizadas mediante mutaciones que afectarían su estabilidad, con el fin de conocer la influencia de dichas estructuras en el reconocimiento de ambos codones por los complejos de inicio de la traducción (**Figura 26**). Estos ensayos funcionales permiten inferir que efectivamente hay una regulación que estaría mediada por la estabilidad de las estructuras presentes, tanto locales como de larga distancia. Como es de suponer, observando el reconocimiento del codón de inicio de N, la mutación estabilizante denominada **HP2** disminuye la expresión desde ese codón de inicio, probablemente por la imposibilidad de los complejos de inicio de realizar correctamente el *scanning* e iniciar la síntesis de proteínas desde ese codón. A su vez, la mutación denominada **A1**, la cual interrumpe una interacción de larga distancia que no involucran directamente al contexto inmediato del codón de inicio de N (se modifica entre 25 y 70 nucleótidos de distancia en la secuencia) disminuye considerablemente el reconocimiento de dicho codón. Esta observación indica la necesidad de esta interacción de larga distancia, en que participa el codón

de inicio de NSs, para la correcta expresión de la proteína N. Los datos sugieren que, para el correcto reconocimiento del codón de inicio de N, la integridad estructural de la región 5'UTR es necesaria.

Distinto es el caso cuando las mismas mutaciones se observan desde el reconocimiento del codón de inicio de NSs, en donde la mutación denominada **A1** disminuye levemente la expresión desde este codón, lo cual es esperable, dado que en dicha mutante se ve afectada directamente la interacción de larga distancia que involucra a este codón de inicio. Caso distinto ocurre cuando observamos la mutación **HP2** en el mismo contexto, donde la estabilización del tallo que contiene el codón de inicio N, resulta en un aumento significativo del reconocimiento del codón NSs. Esto no sorprende desde el punto de vista del mecanismo descrito de *leaky scanning* en este mRNA, dado que es normal que modificaciones río arriba afecten al reconocimiento de codones de inicio río abajo. Lo novedoso respecto a este resultado, radica en que la estructura estabilizada del tallo **HP2 (Figura 26)** debiera ser incapaz de permitir el paso de los complejos de inicio, dada su alta estabilidad ( $\Delta G = -29,8$  kcal/mol), tal como se observa en la estructura Tar presente en la región 5'UTR del mRNA de HIV-1 (Parkin, et al., 1988) (Tar  $\Delta G = -23,8$  kcal/mol). A pesar de esto, el reconocimiento del codón de inicio de NSs se ve aumentado. Se desconoce el mecanismo por el cual los complejos de inicio podrían atravesar esta estructura. Es posible que sea gracias a la presencia de alguna helicasa de RNA, enzimas capaces de desestructurar tallos o interacciones de RNA, para hacer accesible la secuencia en cuestión. Si este proceso fuera inespecífico, debiera también estimularse el reconocimiento del codón de inicio de N, lo cual no ocurre (**Figura 27**). Una segunda explicación al fenómeno observado, puede ser la existencia del proceso denominado *Ribosome shunting* o salto del ribosoma, en donde bajo un contexto determinado de secuencia y estructura, los complejos de inicio son

capaces de “saltar” en el mRNA, sin atravesar ni desestructurar un tallo de RNA. Esta situación también es poco probable, dado que dicho contexto necesario para que ocurra el *Ribosome shunting* no se encuentra presente en la región 5'UTR del SmRNA (Ryabova, et al., 2006). Cabe destacar que existen ejemplos en que el mecanismo de *Ribosome shunting* ocurre de formas no esperadas, abarcando distancias mayores, sin necesariamente posicionar los complejos de inicio en la proximidad del codón de inicio río abajo (Racine, et al., 2010).

También como parte de este trabajo se caracterizaron las estructuras de RNA presentes en la región 3'UTR del SmRNA, bajo la misma estrategia de SHAPE utilizada para la región 5'UTR. Del análisis de los datos obtenidos, mediante el software RNAstructure (Mathews, 2014), se pudo establecer 6 estructuras de RNA probables para la región 3'UTR (**Figura 24**). Con los datos obtenidos, no fue posible determinar cuál de las estructuras probables mostradas se acerca a la estructura real, debido a la extensión de la región y la ausencia de datos funcionales que permitan corroborar una estructura por sobre otra. De todos modos, en las 6 estructuras obtenidas se observa algunas características estructurales en común, como la presencia de horquillas múltiples ramificadas hacia el extremo 5' de la zona analizada, y la existencia de una gran horquilla con zonas simple hebra internas hacia el extremo 3' de la región modelada (**Figura 24**). Dichas estructuras podrían estar asociadas al reemplazo funcional de la cola Poly(A) que realiza esta región 3'UTR.

Los resultados mostrados en este trabajo de tesis permiten comenzar a entender la influencia de las estructuras del RNA en la expresión de las proteínas N y NSs, más allá de los análisis realizados previamente que consideraron sólo el contexto de secuencia de los codones de inicio del SmRNA. Para confirmar o descartar la existencia de *Ribosome shunting* en este contexto, se

deben realizar estudios adicionales, con mutantes que abarquen todo el contexto que rodea a los codones de inicio, a las estructuras río abajo del codón de inicio de NSs (**Figura 22**) que podrían influir en la expresión génica desde este mRNA, y realizar ensayos moleculares que permitan localizar los sitios específicos en que se encuentran los complejos de inicio en las distintas mutantes diseñadas.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, podemos concluir:

- El elemento HIV-1 IRES es de naturaleza modular, similar a lo que se ha observado para elementos IRES celulares.
- Los dominios estructurales PBS, DIS, SD y Psi son esenciales para la actividad del elemento HIV-1 IRES.
- La actividad del elemento HIV-1 IRES depende de la presencia de la proteína ribosomal S25 (eS25), al igual que otros elementos IRES virales y celulares.
- El elemento HIV-1 IRES recluta el ribosoma directamente sobre el codón de inicio, sin requerir del proceso de *scanning*.
- Las regiones 5'UTR y 3'UTR del SmRNA de ANDV presentan estructuras secundarias estables.
- No es posible asignar una estructura única a la región 3'UTR del SmRNA.
- La región 5'UTR del SmRNA posee estructuras que modulan diferencialmente la síntesis de proteínas desde los codones de inicio para N y NSs.

Este trabajo de tesis permite resaltar la importancia de las estructuras de RNA en la síntesis de proteínas, desde la mirada de estructuras presentes en mRNAs pertenecientes a patógenos virales. Estos hallazgos permitirán ahondar nuestro entendimiento del proceso de inicio de la síntesis de proteínas en células eucariontes.

## 7. PROYECCIONES

Este trabajo de tesis se ha encargado de caracterizar la relación estructura-función del elemento HIV-1 IRES, por lo que se propone continuar su estudio con foco en las proteínas asociadas al elemento HIV-1 IRES, y su influencia en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas no canónica. Se conoce la influencia positiva de extractos proteicos celulares sobre la actividad del elemento HIV-1 IRES, pero actualmente los estudios en el laboratorio de virología molecular se están enfocando en la caracterización de las proteínas específicas que forman parte del complejo ribonucleoprotéico encargado de dar su funcionalidad al elemento HIV-1 IRES.

Para el SmRNA, la caracterización estructural de sus regiones UTR es el primer paso para conocer los mecanismos regulatorios asociados al inicio de su traducción. Con este trabajo de tesis se presentan nuevas interrogantes, asociadas al estudio funcional de los dominios estructurales de RNA no analizados en este trabajo, que podrían estar regulando también el reconocimiento de los codones de inicio para N y NSs. Estos ensayos permitirían conocer el mecanismo exacto de su regulación, y se podría evaluar la influencia de proteínas virales o celulares sobre este proceso. También se propone realizar ensayos funcionales que permitan dilucidar la o las estructuras definitivas para la región 3'UTR, así como los dominios de RNA y posibles proteínas asociadas responsables de su función de reemplazo de la cola poliadenilada. Actualmente en el laboratorio de virología molecular se está trabajando en discriminar entre las distintas estructuras de la región 3'UTR mediante un enfoque funcional, ya que se ha descrito una proteína celular (Mex3A) que es capaz de interactuar con la región 3'UTR, y podría participar en el proceso de estructuración de la región 3'UTR.

## 8. APÉNDICE

Artículo generado a partir de este trabajo de tesis (Carvajal & Vallejos, et al., 2016)





### Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation

Felipe Carvajal<sup>1,\*</sup>, Maricarmen Vallejos<sup>1,\*</sup>, Beth Walters<sup>2</sup>, Nataly Contreras<sup>1</sup>, Marla I. Hertz<sup>2</sup>, Eduardo Olivares<sup>1</sup>, Carlos J. Cáceres<sup>1</sup>, Karla Pino<sup>1</sup>, Alejandro Letelier<sup>1</sup>, Sunnie R. Thompson<sup>2</sup> and Marcelo López-Lastra<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, Departamento de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátrica, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile  
2 Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, AL, USA

**Keywords**  
HIV-1; internal ribosomal entry site; protein synthesis; RNA

**Correspondence**  
M. López-Lastra, Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391, Santiago 8330024, Chile  
Tel: 56 2 2354 3410  
E-mail: malopez@med.puc.cl

\*Equal contribution.

(Received 1 October 2013, revised 28 April 2016, accepted 13 May 2016)

doi:10.1111/febs.13756

The 5' leader of the HIV-1 genomic RNA is a multifunctional region that folds into secondary/tertiary structures that regulate multiple processes during viral replication including translation initiation. In this work, we examine the internal ribosome entry site (IRES) located in the 5' leader that drives translation initiation of the viral Gag protein under conditions that hinder cap-dependent translation initiation. We show that activity of the HIV-1 IRES relies on ribosomal protein S25 (eS25). Additionally, a mechanistic and mutational analysis revealed that the HIV-1 IRES is modular in nature and that once the 40S ribosomal subunit is recruited to the IRES, translation initiates without the need of ribosome scanning. These findings elucidate a mechanism of initiation by the HIV-1 IRES whereby a number of highly structured sites present within the HIV-1 5' leader leads to the recruitment of the 40S subunit directly at the site of initiation of protein synthesis.

---

### Introduction

Translation initiation of most eukaryotic mRNAs occurs by a cap-dependent mechanism [1], whereby the 5' cap structure (m<sup>7</sup>GpppN) is recognized by eukaryotic translation initiation factors (eIFs): the cap-binding protein (eIF4E), the ATP-dependent RNA helicase (eIF4A), and the scaffolding protein (eIF4G), which forms the eIF4F complex. The eIF4F complex bridges

the 5' and the 3' ends of the mRNA by also binding to the polyadenylation domain (poly(A))-binding protein (PABP) bound to the poly(A) tail [1]. These factors recruit the 40S ribosomal subunit as a 43S preinitiation complex composed of the 40S subunit, eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> (ternary complex), eIF1A, eIF1, and eIF3, which scans the 5' untranslated region

**Abbreviations**  
 'dl', bicistronic reporter vector; 5' UTR, 5' untranslated region; AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; DIS, dimerization domain; eIFs, eukaryotic translation initiation factors; EMCV, encephalomyocarditis virus; eS25, ribosomal protein S25; FLuc, Firefly luciferase; G2/M, G2/M cell cycle stage arrested cells extract; HCV, hepatitis C virus; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HTLV-1, human T-cell lymphotropic virus type 1; IRES, internal ribosomal entry site; ORF, open reading frame; PBS, primer binding site domain; PEI, polyethyleneimine; poly(A), polyadenylation domain; Psi, encapsidation domain; PV, poliovirus; RLA, relative luciferase activity; RLuc, *Renilla* luciferase; RRL, rabbit reticulocyte lysate; RTA, relative translation activity; SC, scrambled control; SD, splicing donor domain; shRNA, small hairpin RNA; siRNA, short interfering RNA; SL, stem-loop region; SHAPE, Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension; SV40, simian virus 40; TAR, trans-activating region; UV, ultraviolet.

2508
The FEBS Journal 283 (2016) 2508–2527 © 2016 Federation of European Biochemical Societies

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbink, T. E. M., Ooms, M., Haasnoot, P. C. J., & Berkhout, B. (2005). The HIV-1 leader RNA conformational switch regulates RNA dimerization but does not regulate mRNA translation. *Biochemistry*, *44*(25), 9058–9066.
- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., & Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of Virology*, *59*(2), 284–291.
- Álvarez, E., Castelló, A., Menéndez-Arias, L., & Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochemical Journal*, *396*(2), 219–226.
- Amorim, R., Costa, S. M., Cavaleiro, N. P., Da Silva, E. E., & Da Costa, L. J. (2014). HIV-1 transcripts use ires-initiation under conditions where cap-dependent translation is restricted by poliovirus 2A protease. *PLoS ONE*, *9*(2), 1–13.
- Angulo, J., Ulryck, N., Deforges, J., Chamond, N., Lopez-Lastra, M., Masquida, B., & Sargueil, B. (2016). LOOP IIIId of the HCV IRES is essential for the structural rearrangement of the 40S-HCV IRES complex. *Nucleic Acids Research*, *44*(3), 1309–1325.
- Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J., & Tsien, R. Y. (2006). Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *Rna*, *12*(Kozak 1994), 851–861.
- Baird, S. D., Lewis, S. M., Turcotte, M., & Holcik, M. (2007). A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research*, *35*(14), 4664–4677.
- Balvay, L., Lopez-Lastra, M., Sargueil, B., Darlix, J.-L., & Ohlmann, T. (2007). Translational control of retroviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, *5*(2), 128–140.
- Balvay, L., Rifo, R. S., Ricci, E. P., Decimo, D., & Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1789*(9–10), 542–557.
- Barría, M. I., González, A., Vera-Otarola, J., León, U., Vollrath, V., Marsac, D., ... López-Lastra, M. (2009). Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in cap-independent translation. *Nucleic Acids Research*, *37*(3), 957–971.
- Berkhout, B. (1996). Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *54*, 1–34.
- Berkhout, B., Arts, K., & Abbink, T. E. M. (2011). Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Research*,

39(12), 5232–5244.

- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L., & Sonenberg, N. (2003). The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *Journal of Virology*, 77(7), 3939–3949.
- Buck, C. B., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M., Robert, F., & Siliciano, R. F. (2001). The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Virology*, 75(1), 181–191.
- Carvajal, F., Vallejos, M., Walters, B., Contreras, N., Hertz, M. I., Olivares, E., ... López-Lastra, M. (2016). Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation. *The FEBS Journal*, 283(13), 2508–2527.
- Castelló, A., Franco, D., Moral-López, P., Berlanga, J. J., Álvarez, E., Wimmer, E., & Carrasco, L. (2009). HIV-1 protease inhibits cap-and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS ONE*, 4(11).
- Chappell, S. A., & Mauro, V. P. (2003). The Internal Ribosome Entry Site (IRES) Contained within the RNA-binding Motif Protein 3 (Rbm3) mRNA Is Composed of Functionally Distinct Elements. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33793–33800.
- Chappell, S. a, Edelman, G. M., & Mauro, V. P. (2000). A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1536–1541.
- Chen, C. Y., & Sarnow, P. (1995). Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, 268(5209), 415–417.
- Condit, R. C. (2013). Principles of Virology. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 21–51). Wolters Kluwer.
- De Conti, L., Baralle, M., & Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), 49–60.
- Dinos, G., Wilson, D. N., Teraoka, Y., Szaflarski, W., Fucini, P., Kalpaxis, D., & Nierhaus, K. H. (2004). Dissecting the Ribosomal Inhibition Mechanisms of Edeine and Pactamycin: The Universally Conserved Residues G693 and C795 Regulate P-Site RNA Binding. *Molecular Cell*, 13(1), 113–124.
- Dreher, T. W., & Miller, W. A. (2006). Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology*, 344(1), 185–197.
- Easton, L. E., Locker, N., & Lukavsky, P. J. (2009). Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research*, 37(16), 5537–

5549.

- Fernández-Miragall, O., Quinto, S. L. d, & Martínez-Salas, E. (2009). Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Research*, *139*(2), 172–182.
- Filbin, M. E., & Kieft, J. S. (2009). Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Current Opinion in Structural Biology*, *19*(3), 267–276.
- Frankel, A. D., & Young, J. A. (1998). HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 1–25.
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development*, *5*(11), 2108–2116.
- Gallie, D. R. (2001). Cap-Independent Translation Conferred by the 5' Leader of Tobacco Etch Virus Is Eukaryotic Initiation Factor 4G Dependent. *Journal of Virology*, *75*(24), 12141–12152.
- Gao, F., Kasprzak, W. K., Szarko, C., Shapiro, B. A., & Simon, A. E. (2014). The 3' Untranslated Region of Pea Enation Mosaic Virus Contains Two T-Shaped, Ribosome-Binding, Cap-Independent Translation Enhancers. *Journal of Virology*, *88*(20), 11696–11712.
- Gao, F., Kasprzak, W., Stupina, V. a, Shapiro, B. a, & Simon, A. E. (2012). A ribosome-binding, 3' translational enhancer has a T-shaped structure and engages in a long-distance RNA-RNA interaction. *Journal of Virology*, *86*(18), 9828–9842.
- Gendron, K., Ferbeyre, G., Heveker, N., & Brakier-Gingras, L. (2011). The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Research*, *39*(3), 902–912.
- Gilbert, W. V. (2010). Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(38), 29033–29038.
- Göttlinger, H. G. (2001). The HIV 1 assembly machine. *AIDS*.
- Griffiths, A., & Coen, D. M. (2005). An unusual internal ribosome entry site in the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(27), 9667–9672.
- Guerrero, S., Batisse, J., Libre, C., Bernacchi, S., Marquet, R., & Paillart, J. C. (2015). Hiv-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses*, *7*(1), 199–218.
- Guest, S., Pilipenko, E., Sharma, K., Chumakov, K., & Roos, R. P. (2004). Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *Journal of Virology*, *78*(20), 11097–11107.
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, *2*(4), 924–932.

- Hellen, C. U. T., & Sarnow, P. (2001, July 1). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes and Development*.
- Hertz, M. I., Landry, D. M., Willis, A. E., Luo, G., & Thompson, S. R. (2013). Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(5), 1016–1026.
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5' - untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*, *352*(6292), 1413–1416.
- Huthoff, H., & Berkhout, B. (2002). Multiple secondary structure rearrangements during HIV-1 RNA dimerization. *Biochemistry*, *41*(33), 10439–10445.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113–127.
- Jang, G. M., Leong, L. E. C., Hoang, L. T., Wang, P. H., Gutman, G. A., & Semler, B. L. (2004). Structurally distinct elements mediate internal ribosome entry within the 5'-noncoding region of a voltage-gated potassium channel mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47419–47430.
- Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., & Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of Virology*, *62*(8), 2636–2643.
- Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O., & Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13118–13123.
- Karabiber, F., McGinnis, J. L., Favorov, O. V, & Weeks, K. M. (2013). QuShape: rapid, accurate, and best-practices quantification of nucleic acid probing information, resolved by capillary electrophoresis. *RNA (New York, N.Y.)*, *19*(1), 63–73.
- Keane, S. C., Heng, X., Lu, K., Kharytonchyk, S., Ramakrishnan, V., Carter, G., ... Summers, M. F. (2015). Structure of the HIV-1 RNA packaging signal. *Science*, *348*(6237), 917–921.
- Kieft, J. S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(6), 274–283.
- Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pestova, T. V, & Hellen, C. U. T. (2003). Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(2), 687–698.
- Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle*, *10*(2), 229–240.

- Kozak, M. (1989). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5134–5142.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187–208.
- Kozak, M., & Shatkin, J. (1978). Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(18), 6568–6577.
- Lancaster, A. M., Jan, E., & Sarnow, P. (2006). Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Journal of Virology*, 80(1), 894–902.
- Landry, D. M., Hertz, M. I., & Thompson, S. R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Journal of Virology*, 83(12), 2753–2764.
- Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 291–323.
- Leonard, C. W., Hajdin, C. E., Karabiber, F., Mathews, D. H., Favorov, O. V., Dokholyan, N. V., & Weeks, K. M. (2013). Principles for understanding the accuracy of SHAPE-directed RNA structure modeling. *Biochemistry*, 52(4), 588–595.
- Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., & He, J. J. (2011). Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 6(2), 308–321.
- López-Lastra, M., Rivas, A., & Barría, M. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological Research*, 38(2–3), 121–146.
- López-Lastra, M., Ulrici, S., Gabus, C., & Darlix, J. L. (1999). Identification of an internal ribosome entry segment in the 5' region of the mouse VL30 retrotransposon and its use in the development of retroviral vectors. *Journal of Virology*, 73(10), 8393–8402.
- Low, J. T., & Weeks, K. M. (2010). SHAPE-directed RNA secondary structure prediction. *Methods (San Diego, Calif.)*, 52(2), 150–158.
- Lu, K., Heng, X., Garyu, L., Monti, S., Garcia, E. L., Kharytonchyk, S., ... Summers, M. F. (2011). NMR Detection of Structures in the HIV-1 5'-Leader RNA That Regulate Genome Packaging. *Science*, 334(6053), 242–245.
- Mäkeläinen, K. J., & Mäkinen, K. (2007). Testing of internal translation initiation via dicistronic constructs in yeast is complicated by production of extraneous transcripts. *Gene*, 391(1–2), 275–284.
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J., & Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nature Reviews. Genetics*, 9(11), 843–854.

- Mathews, D. H. (2014). RNA secondary structure analysis using RNAstructure. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPPL.46), 1–25.
- Meignin, C., Bailly, J. L., Arnaud, F., Dastugue, B., & Vaury, C. (2003). The 5' untranslated region and Gag product of Idefix, a long terminal repeat-retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, act together to initiate a switch between translated and untranslated states of the genomic mRNA. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8246–8254.
- Merino, E. J., Wilkinson, K. a, Coughlan, J. L., & Weeks, K. M. (2005). RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *Journal of the American Chemical Society*, 127(12), 4223–4231.
- Monette, A., Ajamian, L., López-Lastra, M., & Mouland, A. J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31350–31362.
- Monette, A., Valiente-Echeverría, F., Rivero, M., Cohen, É. A., Lopez-Lastra, M., & Mouland, A. J. (2013). Dual Mechanisms of Translation Initiation of the Full-Length HIV-1 mRNA Contribute to Gag Synthesis. *PLoS ONE*, 8(7), 1–12.
- Mortimer, S. a, & Weeks, K. M. (2007). A fast-acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry. *J Am Chem Soc*, 129(14), 4144–4145.
- Mortimer, S., Kidwell, M. A., & Doudna, J. A. (2014). Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nature Reviews. Genetics*, 15(7), 469–479.
- Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., & Darlix, J. L. (2000). An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11899–11906.
- Ohlmann, T., Mengardi, C., & Lopez-Lastra, M. (2014). Translation initiation of the HIV-1 mRNA. *Translation*, 2(2), e960242.
- Ohlmann, T., Prévôt, D., Décimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S., & Darlix, J.-L. (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *Journal of Molecular Biology*, 318(1), 9–20.
- Olivares, E., Landry, D. M., Cáceres, C. J., Pino, K., Rossi, F., Navarrete, C., ... López-Lastra, M. (2014). The 5' untranslated region of the human T-cell lymphotropic virus type 1 mRNA enables cap-independent translation initiation. *Journal of Virology*, 88(11), 5936–5955.
- Owens, G. C., Chappell, S. A., Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2001). Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98(4), 1471–1476.
- Paillart, J. C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., & Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral

- RNA genomes: An inseparable pair. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 461–472.
- Parkin, N. T., Cohen, E. A., Darveau, A., Rosen, C., Haseltine, W., & Sonenberg, N. (1988). Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *The EMBO Journal*, 7(9), 2831–2837.
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1985a). Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, 40(3), 515–526.
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1985b). Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol Cell Biol*, 5(11), 3222–3230.
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320–325.
- Perales, C., Carrasco, L., & Ventoso, I. (2003). Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Letters*, 533, 89–94.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., & Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Development*, 12(1), 67–83.
- Plank, T.-D. M., Whitehurst, J. T., & Kieft, J. S. (2013). Cell type specificity and structural determinants of IRES activity from the 5' leaders of different HIV-1 transcripts. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6698–6714.
- Plank, T. M., Whitehurst, J. T., Cencic, R., Pelletier, J., & Kieft, J. S. (2014). Internal translation initiation from HIV-1 transcripts is conferred by a common RNA structure. *Translation*, 2(1), e27694.
- Polacek, C., Friebe, P., & Harris, E. (2009). Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *Journal of General Virology*, 90(3), 687–692.
- Poole, E., Strappe, P., Mok, H. P., Hicks, R., & Lever, A. M. L. (2005). HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and fret. *Traffic*, 6(9), 741–755.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A., & Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science*, 331(6018), 730–736.
- Racine, T., & Duncan, R. (2010). Facilitated leaky scanning and atypical ribosome shunting direct downstream translation initiation on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7260–7272.

- Ricci, E. P., Soto-Rifo, R., Herbreteau, C. H., Decimo, D., & Ohlmann, T. (2008). Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochemical Society Transactions*, *36*(4), 690–693.
- Rivas-Aravena, A., Ramdohr, P., Vallejos, M., Valiente-Echeverría, F., Dormoy-Raclet, V., Rodríguez, F., ... López-Lastra, M. (2009). The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology*, *392*(2), 178–185.
- Ronfort, C., De Breyne, S., Sandrin, V., Darlix, J. L., & Ohlmann, T. (2004). Characterization of two distinct RNA domains that regulate translation of the *Drosophila* gypsy retroelement. *Rna*, *10*(3), 504–515.
- Ryabova, L. A., Pooggin, M. M., & Hohn, T. (2006). Translation reinitiation and leaky scanning in plant viruses. *Virus Research*, *119*(1), 52–62.
- Sasaki, J., & Nakashima, N. (1999). Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *Journal of Virology*, *73*(2), 1219–1226.
- Scarлата, S. (2003). Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1614*(1), 62–72.
- Sharma, A., Yilmaz, A., Marsh, K., Cochrane, A., & Boris-Lawrie, K. (2012). Thriving under stress: selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS Pathogens*, *8*(3), e1002612.
- Siegfried, N. a, Busan, S., Rice, G. M., Nelson, J. a E., & Weeks, K. M. (2014). RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-MaP). *Nature Methods*, *11*(9), 959–965.
- Simon, A. E., & Miller, W. A. (2013). 3' Cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annual Review of Microbiology*, *67*, 21–42.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., Limousin, T., de Breyne, S., Décimo, D., & Ohlmann, T. (2012). DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *The EMBO Journal*, 1–12.
- Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghigat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., & Sonenberg, N. (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *Rna*, *7*(3), 382–394.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*, *66*(3), 1476–1483.
- Valiente-Echeverría, F., Vallejos, M., Monette, A., Pino, K., Letelier, A., Huidobro-Toro, J. P., ... López-Lastra, M. (2013). A cis-Acting Element Present within the gag Open Reading Frame Negatively Impacts on the Activity of the HIV-1 IRES. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–10.

- Vallejos, M., Carvajal, F., Pino, K., Navarrete, C., Ferres, M., Huidobro-Toro, J. P., ... López-Lastra, M. (2012). Functional and structural analysis of the internal ribosome entry site present in the mrna of natural variants of the hiv-1. *PLoS ONE*, 7(4), e35031.
- Vallejos, M., Deforges, J., Plank, T.-D. M., Letelier, A., Ramdohr, P., Abraham, C. G., ... López-Lastra, M. (2011). Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Research*, 39(14), 6186–6200.
- Vallejos, M., Ramdohr, P., Valiente-Echeverría, F., Tapia, K., Rodriguez, F. E., Lowy, F., ... López-Lastra, M. (2009). The 5'-untranslated region of the mouse mammary tumor virus mRNA exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Research*, 38(2), 618–632.
- Vera-Otarola, J. (2009). *Estudio de la Traducción del mRNA del segmento S del Hantavirus Andes: Caracterización de elementos moduladores en cis y en trans*. Universidad de Santiago de Chile.
- Vera-Otarola, J., Solis, L., Soto-Rifo, R., Ricci, E. P., Pino, K., Tischler, N. D., ... Lopez-Lastra, M. (2012). The Andes Hantavirus NSs Protein Is Expressed from the Viral Small mRNA by a Leaky Scanning Mechanism. *Journal of Virology*, 86(4), 2176–2187.
- Vera-Otarola, J., Soto-Rifo, R., Ricci, E. P., Ohlmann, T., Darlix, J.-L., & Lopez-Lastra, M. (2010). The 3' Untranslated Region of the Andes Hantavirus Small mRNA Functionally Replaces the Poly(A) Tail and Stimulates Cap-Dependent Translation Initiation from the Viral mRNA. *Journal of Virology*, 84(19), 10420–10424.
- Vopa, C., & Mokrajs, M. (2008). Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter, 1720–1729.
- Walter, C. T., & Barr, J. N. (2011). Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 11), 2467–2484.
- Wang, C., Sarnow, P., & Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology*, 67(6), 3338–3344.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., & Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*, 2(1), 135–140.
- Wilkinson, K. a, Gorelick, R. J., Vasa, S. M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D. H., ... Weeks, K. M. (2008). High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biology*, 6(4), e96.
- Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., & Sarnow, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 4990–4999.
- Wong, S.-M., Koh, D. C.-Y., & Liu, D. (2008). Identification of plant virus IRES. *Methods in*

*Molecular Biology (Clifton, N.J.).*

- Xia, X., & Holcik, M. (2009). Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS ONE*, 4(1), 4–6.
- Yang, Q., & Sarnow, P. (1997). Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA: Evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2800–2807.
- Zhang, J., Roberts, R., & Rakotondrafara, A. M. (2015). The role of the 5' untranslated regions of Potyviridae in translation. *Virus Research*, 206, 74–81.