

Tesis de Posgrado

Virus de inmunodeficiencia de simios: estudio de la participación del dominio citoplasmático de la glicoproteína viral de envoltura (Env) en la infectividad viral y en la incorporación de Env a viriones

Celma, Cristina Cecilia del Pilar

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Celma, Cristina Cecilia del Pilar. (2003). Virus de inmunodeficiencia de simios: estudio de la participación del dominio citoplasmático de la glicoproteína viral de envoltura (Env) en la infectividad viral y en la incorporación de Env a viriones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3647_Celma.pdf

Cita tipo Chicago:

Celma, Cristina Cecilia del Pilar. "Virus de inmunodeficiencia de simios: estudio de la participación del dominio citoplasmático de la glicoproteína viral de envoltura (Env) en la infectividad viral y en la incorporación de Env a viriones". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3647_Celma.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Mi profundo agradecimiento a todos aquellos que de una u otra manera han colaborado con este trabajo de tesis, en particular:

A mis directores, los Dres. Silvia González y José Luis Affranchino, por permitirme realizar este trabajo de tesis en su laboratorio y por la formación científica que me han brindado. En especial quiero agradecerle a Silvia su gran paciencia y a José Luis su especial sentido del humor.

A Mariana y a Julieta por las experiencias compartidas y por su incondicional ayuda en el laboratorio.

A toda mi familia, y en especial a Gustavo, mamá y papá que me han alentado y apoyado en todo momento.

A Caro y Ague por su amistad, ahora a distancia.

Al CONICET por las becas oportunamente otorgadas.

A las chicas del "comunitario", y en especial, a Thelma, Marina y Verónica por las largas charlas.

A todo el CEVAN: al director, Dr. José La Torre; las secretarias, Silvia, Alvina y Carmina; los "franzidos", Nora, Maxi y Rodrigo; las chicas del lavadero, Delmira y Juani; las chicas de ELISA, Irma, María, Carmen, y Marcela.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS	
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV PORTADORAS DE DELECCIONES INTERNAS	74
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV CON DOMINIOS CITOPLASMÁTICOS TRUNCADOS	91
CAPÍTULO III: REVERSIÓN DEL FENOTIPO DEFECTIVO CAUSADO POR LA MUTACIÓN Δ ENV832-837 EN EL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE LA GLICOPROTEÍNA ENV DE SIV	108
DISCUSIÓN	130
CONCLUSIONES	138
BIBLIOGRAFÍA	139

En las últimas etapas del ciclo de replicación de los virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), ocurre el ensamblado de las partículas virales en la membrana plasmática de las células infectadas. Durante la morfogénesis de los viriones se produce la incorporación de la glicoproteína viral de envoltura (Env), proceso que es esencial para la infectividad viral. La glicoproteína Env se sintetiza como un precursor proteico, el cual es clivado en las subunidades de superficie y transmembrana por proteasas celulares. A diferencia de otros retrovirus, SIV posee una proteína transmembrana con un dominio citoplasmático (CD) particularmente largo, de 164 residuos. Para investigar el rol que cumple el CD en la incorporación de Env a las partículas virales y en la infectividad, se generaron y caracterizaron glicoproteínas Env mutantes llevando pequeñas deleciones internas de 4 a 7 aminoácidos en el CD o bien acortamientos progresivos de 20 residuos desde su extremo carboxilo. Las mutaciones introducidas no tuvieron efecto alguno sobre la síntesis, procesamiento y expresión en la superficie celular de la glicoproteína Env. Sin embargo, las deleciones internas que afectaron el tercio carboxilo terminal del CD de Env inhibieron significativamente tanto la incorporación de Env a viriones como la infectividad viral. El mismo fenotipo defectivo fue observado al remover 20 a 100 aminoácidos del extremo carboxilo del CD. En cambio, glicoproteínas Env con CDs de 44 o 24 aminoácidos se incorporaron a viriones en forma más eficiente que la proteína Env salvaje, e incrementaron no menos de 10 veces la infectividad viral respecto de la de viriones llevando la Env salvaje.

Por otro lado, se realizó un estudio de evolución forzada de un virus mutante llevando una deleción interna en el CD de Env que bloquea la capacidad replicativa del virus. La propagación durante períodos prolongados de tiempo de células linfoides infectadas con este virus mutante condujo a la selección de poblaciones virales revertantes. En estos virus, el fenotipo defectivo causado por la deleción original fue revertido por mutaciones puntuales en el gen *env* que acortaron el CD a una longitud de 52 o 48 aminoácidos.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de Tesis demuestran cómo variaciones en la longitud del CD de la glicoproteína Env de SIV modulan las funciones virales mediadas por Env.

During the late stages of simian immunodeficiency virus (SIV) replication, particle assembly takes place at the plasma membrane of the infected cells. During virus morphogenesis, the envelope glycoprotein (Env) is incorporated into virions, a step that is essential for virus infectivity. The Env glycoprotein is synthesized as a heavily glycosylated precursor that is cleaved by cellular proteases into the surface and transmembrane subunits. The cytoplasmic domain of the SIV transmembrane protein is unusually long (164 amino acids) compared to those of other retroviruses. To investigate the role that the SIV Env cytoplasmic domain plays in Env incorporation into virions and virus infectivity, we generated and characterized two sets of SIV Env mutants: a series of mutants carrying small in-frame deletions throughout the entire Env cytoplasmic domain, and another series of Env mutants bearing progressively truncated cytoplasmic tails. None of these mutations had an effect on the synthesis, processing and cell surface expression of the SIV Env glycoproteins. Interestingly, in-frame deletions targeting domains in the C-terminal third of the Env cytoplasmic tail impaired both Env incorporation into particles and virus infectivity. A similar defective phenotype was observed for the SIV Env mutants lacking the C-terminal 20 to 100 amino acids. Of note, SIV Env glycoproteins bearing a 44- or 24- amino acid cytoplasmic tail were incorporated into virions at levels significantly higher than those of wild-type Env and increased virus infectivity by more than 10-fold with respect to that conferred by the full-length Env protein.

In addition, we performed a "forced evolution" study in which we propagated for a long period of time cells infected with a replication-defective mutant virus containing an in-frame deletion within the SIV Env cytoplasmic domain. These experiments led to the selection of second-site revertant viruses in which the defective phenotype imposed by the original deletion was reversed by mutations in the *env* gene that truncate the Env cytoplasmic tail to 52 or 48 amino acids.

In conclusion, our results demonstrate how variations in the length of the SIV Env cytoplasmic domain modulate Env-mediated viral functions.

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
β -Gal	β -galactosidasa
BrdU	5-bromo-desoxiuridina
BSA	seroalbúmina bovina
Ci	Curie
DMEM	medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
ddNTP	didesoxinucleótido trifosfato
DOC	desoxicolato de sodio
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etiléndiaminotetraacético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	y colaboradores
kb	mil pares de bases
kDa	mil daltons
LB	medio Luria-Bertani
M	molar
moi	multiplicidad de infección
NP-40	nonidet P-40
nt	nucleótido
pb	pares de bases
PBS	solución salina de buffer fosfato
PBST	solución salina de buffer fosfato-0,01% Tween 20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PEG	polietilén glicol
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
p/v	peso/volumen
RCM	región de clonado múltiple
RE	retículo endoplasmático
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TK	timidina quinasa
TR	transcriptasa reversa
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UFP	unidades formadoras de placas
xg	multiplicado por la aceleración de la gravedad
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

Los virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) pertenecen al grupo de los retrovirus y fueron aislados de distintas especies de primates no humanos. Estos virus se encuentran estrechamente relacionados morfológica, antigénica y genéticamente con los virus de inmunodeficiencia de humanos tipos 1 y 2 (HIV-1 y HIV-2, respectivamente) (Desrosiers, 1988).

Los retrovirus constituyen una familia viral muy diversa cuya característica particular es su estrategia replicativa. Su ciclo de replicación incluye un paso esencial de transcripción reversa del ARN genómico viral a ADN doble cadena y la subsiguiente integración de este ADN como provirus al genoma de la célula infectada.

El estudio de esta familia ha tenido un gran impacto en diversas áreas de la biología y de la medicina. Durante la década de 1960, la biología de los virus animales era estudiada en base a su respuesta a inhibidores metabólicos. Sin embargo, los retrovirus representaban una verdadera paradoja pues eran sensibles a inhibidores de la síntesis de ADN, a pesar de que el dogma de la Virología de la época postulaba que los virus con genoma a ARN debían mostrarse resistentes. Además, no se detectaban especies de ARN doble cadena en ninguna etapa del ciclo de replicación, característica fundamental de los virus con genoma a ARN conocidos hasta entonces. En 1964, el Dr. Temin presentó una explicación para estos datos hasta el momento contradictorios, proponiendo la hipótesis del provirus. Esta hipótesis postulaba la generación de un ADN copia a partir del genoma viral y su posterior integración en el genoma celular. Esta idea fue aceptada años después con el descubrimiento de una actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN en las partículas de estos agentes virales (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). El descubrimiento de esta actividad enzimática fue realmente muy importante en la historia de la Biología Molecular. En ese momento, correspondiente a los comienzos de la Biología Molecular, no se conocían excepciones al flujo unidireccional e irreversible de la información genética de ADN a ARN y de éste último, a proteína. Este flujo, conocido como el dogma central de la Biología, tuvo que ser reconsiderado con el descubrimiento de esta actividad enzimática viral. Dado que esta enzima retroviral media la retrotranscripción, esto es, el flujo

reverso de ARN a ADN, se le dio el nombre de transcriptasa reversa, y a los agentes virales que poseen esta actividad, se los llamó retrovirus por ir en contra del dogma central de la Biología.

En el año 1975, los Dres. Temin y Baltimore recibieron el premio Nobel por el descubrimiento de la transcriptasa reversa.

GENERALIDADES DE LOS RETROVIRUS

La familia *Retroviridae* comprende una gran variedad de agentes virales que poseen un genoma compuesto por dos moléculas de ARN simple cadena de polaridad positiva, una envoltura derivada de la membrana de la célula infectada y propiedades replicativas particulares (Coffin 1992, 1996). Como se mencionó antes, la principal característica de esta familia es su estrategia replicativa, que involucra una etapa esencial en la que el genoma viral a ARN es primero retrotranscrito a ADN doble cadena, y luego se integra en el genoma de la célula infectada.

Los retrovirus pueden dividirse según su organización genómica en simples y complejos (Figura 1). Todos los virus incluidos en esta familia poseen en su genoma al menos tres regiones fundamentales que codifican para las siguientes proteínas virales: el gen *gag*, que dirige la expresión de las proteínas estructurales del virión; el gen *pol*, que contiene la información para las proteínas con actividad enzimática como la transcriptasa reversa y la integrasa; y el gen *env*, que codifica para los componentes de la envoltura viral. Los retrovirus que poseen sólo estas regiones son los considerados simples, mientras que los complejos, como SIV y HIV, presentan además regiones que codifican para proteínas accesorias con funciones regulatorias (Coffin, 1992; Goff, 2001).

La familia *Retroviridae* está subdividida a su vez en siete géneros. Los lentivirus constituyen uno de estos siete géneros y se caracterizan por causar en sus huéspedes una infección lenta y enfermedades que resultan de la disfunción de células u órganos específicos. Los ejemplos más representativos de este género son el HIV, agente causante del síndrome de

inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los virus de primates no humanos, SIV.

ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS RETROVIRUS Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RETROVIRALES

El genoma de los retrovirus contiene al menos 3 marcos abiertos de lectura cuya organización es invariablemente *gag-pol-env* en sentido 5' a 3' del genoma (Figura 1).

La expresión de los genes retrovirales ocurre a través de un complejo mecanismo de formación de precursores proteicos que son luego procesados para generar las proteínas maduras. Este mecanismo de expresión de las proteínas virales como precursores permite asegurar que se expresen en correcta proporción entre ellas y, además, que éstas lleguen al lugar de ensamblado viral como una entidad única asegurando que todas las proteínas virales sean incorporadas a las partículas nacientes.

El gen *gag* se encuentra en el extremo 5' del genoma viral, y codifica para un precursor poliproteico Gag que da origen a por lo menos tres proteínas estructurales maduras que son, en orden desde el extremo amino al carboxilo del precursor Gag: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). Algunos retrovirus, como HIV y SIV, presentan además péptidos adicionales (Figura 1). La proteína **MA** se encuentra en el virión maduro inmediatamente por debajo de la bicapa lipídica que forma la membrana viral y por lo tanto, íntimamente asociada con ella. Esta proteína contiene señales fundamentales para la interacción del precursor Gag con la membrana plasmática y para el ensamblado de las partículas virales (Bryant & Ratner, 1990; Delchambre *et al.*, 1989; Freed *et al.*, 1994; González *et al.*, 1993; González & Affranchino, 1995, 1998; Göttlinger *et al.*, 1989). La proteína **CA** forma el *core* viral que contiene al complejo ribonucleoproteico ARN-NC en las partículas maduras. Presenta una región carboxilo terminal que es crucial para el ensamblado de partículas y la formación del *core* viral y una región de unos 20 residuos muy conservada entre los retrovirus

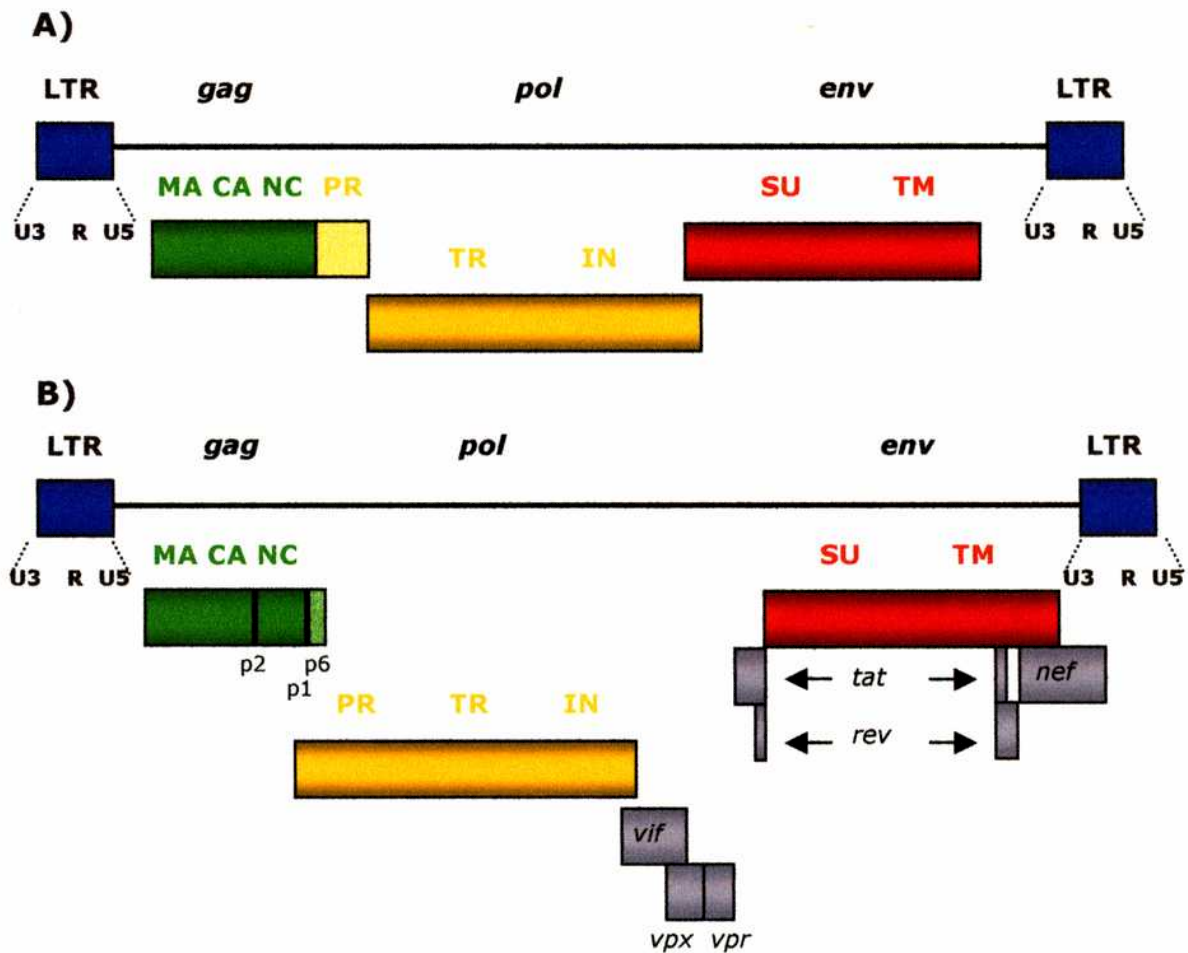


Figura 1. Organización genómica de los retrovirus.

A) Se presenta la organización genómica del virus de la leucosis aviar (ALV) como ejemplo de un retrovirus simple. Su genoma contiene los genes comunes a todos los retrovirus: *gag*, *pol* y *env*; y flanqueando la región codificante, las repeticiones terminales largas (LTR) que contienen las regiones regulatorias U3, R y U5. **B)** Como ejemplo de retrovirus complejo se presenta el genoma de SIV. Contiene además de los genes *gag*, *pol* y *env*, los genes accesorios como *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpx* y *nef* cuyos productos cumplen diferentes funciones durante la replicación viral. En SIV y HIV, el precursor Gag se procesa en los productos MA, CA, NC, p6, p2 y p1.

Se indican además las proteínas maduras productos de la expresión de los genes *gag*: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC); *pol*: proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN); y *env*: subunidades de superficie (SU) y de transmembrana (TM).

llamada región de alta homología que es esencial para la replicación viral (Dorfman *et al.*, 1994a; Mammano *et al.*, 1994). La proteína **NC** se encuentra íntimamente asociada al ARN genómico en el virión maduro. Contiene motivos aminoacídicos ricos en residuos de cisteína e histidina similares a los dominios llamados "dedos de zinc". Estos motivos son esenciales para la replicación viral pues están involucrados en el empaquetamiento específico del ARN genómico por interacción con secuencias de empaquetamiento presentes en el genoma viral (Aldovini & Young, 1990; Dorfman *et al.*, 1993; Gorelick *et al.*, 1993).

El gen *pol* se encuentra en la región central del genoma viral. Codifica para las proteínas virales con funciones enzimáticas. Estas son: la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (TR) y la integrasa (IN). En la mayoría de los retrovirus el gen *pol* se expresa como un precursor poliproteico originado por un corrimiento en el marco de lectura respecto del correspondiente al gen *gag*. Este corrimiento de -1 en la lectura del ARN mensajero (ARNm) ocurre solamente con una frecuencia aproximada del 5% (Jacks *et al.*, 1988; Jacks, 1990). De esta forma, el ARNm que codifica para los genes *gag-pol* es traducido principalmente para generar el precursor Gag, mientras que en menor proporción se genera el precursor Gag-Pol. Éste constituye un mecanismo eficiente para regular los niveles intracelulares de proteínas con actividad enzimática y que son incorporadas al virión. La proteína **PR** es la responsable del procesamiento de los precursores Gag y Gag-Pol durante la maduración de los viriones, proceso fundamental para la adquisición de infectividad (Göttlinger *et al.*, 1989; Kohl *et al.*, 1988). Por esta razón, la actividad de la PR es uno de los puntos del ciclo de replicación viral más susceptible para el desarrollo de drogas antivirales. Estudios de cristalografía mostraron que la PR debe encontrarse como un homodímero para ser funcional (Lapatto *et al.*, 1989; Navia *et al.*, 1989); por lo tanto, es la dimerización el proceso que regula la actividad proteolítica de la PR durante la brotación de las partículas virales. La proteína **TR** posee la actividad enzimática responsable de copiar el genoma viral de ARN a ADN. Esta enzima viral es un heterodímero que posee actividades de ADN polimerasa dependiente de ARN así como de ARNasaH que degrada la

cadena de ARN en el heterodúplex generado durante la etapa de transcripción reversa (Coffin, 1996). La proteína **IN** cataliza la integración del ADN viral al genoma de la célula infectada. Posee la capacidad de reconocer los extremos del ADN viral doble cadena recién sintetizado, remover dos nucleótidos de cada extremo 3' y unir este ADN al genoma celular (Coffin, 1996).

El gen *env* se encuentra en el extremo 3' del genoma viral. Se expresa a partir de un ARNm de tamaño subgenómico del cual los genes *gag* y *pol* han sido removidos. Se expresa como un precursor proteico **Env**, el cual es clivado y modificado durante su transporte hacia la membrana plasmática a través de la vía secretoria celular. El clivaje del precursor Env genera las subunidades de superficie (**SU**) y transmembrana (**TM**) que se mantienen asociadas en forma no covalente en la membrana plasmática de la célula infectada (Hunter & Swanstrom, 1990).

En cada extremo del genoma viral, y flanqueando la región codificante, se encuentran las llamadas repeticiones terminales largas o LTRs. Estas secuencias están formadas por las regiones U3, R y U5, las cuales contienen zonas regulatorias para la integración del ADN proviral al genoma de la célula huésped y para la iniciación de la transcripción (Goff, 2001).

Los lentivirus, miembros del grupo de los retrovirus complejos, poseen además genes que codifican para proteínas accesorias. Estos genes accesorios se expresan a partir de moléculas de ARNm de tamaño subgenómico que han sufrido procesamiento múltiple y dan origen a las proteínas regulatorias Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu.

La proteína **Tat** es un potente transactivador de la transcripción. Actúa por unión a una región del ARN naciente llamada TAR que se encuentra localizada en la región R de la LTR. Esta región, ubicada en el extremo 5' del ARN, adopta una estructura particular llamada tallo y horquilla donde la proteína Tat se une y regula la elongación de la transcripción (Cullen, 1990; Dayton *et al.*, 1986; Jones & Peterlin, 1994).

La proteína **Rev** juega un rol esencial en la replicación de los retrovirus, pues permite el transporte de los ARNm virales no procesados desde el núcleo al citoplasma de la célula infectada. Una vez que la proteína Rev es

sintetizada en el citoplasma, una señal de localización nuclear dirige su importación al núcleo donde se une entonces a una región en los mensajeros virales conocida como elemento que responde a Rev o RRE, evitando así el procesamiento completo del mensajero. De esta forma, el ciclo de replicación viral puede ser dividido en una etapa regulatoria temprana, donde predominan los ARNm multiprocesados que codifican para Tat, Rev y Nef, y una etapa productiva tardía, donde la acumulación de Rev permite generar los ARNm tardíos, mono o no procesados, para la expresión de los precursores Gag, Gag-Pol y Env (Kim *et al.*, 1989; Viglianti *et al.*, 1990). Por lo tanto, la proteína Rev no sólo es importante para la expresión de las proteínas virales, sino que permite además el transporte al citoplasma de moléculas de ARN de tamaño genómico completo para que sean incorporadas como genoma de nuevas partículas (Kalland *et al.*, 1994; Meyer & Malim, 1994).

Nef es una proteína esencial para la patogénesis viral *in vivo* (Kestler *et al.*, 1991). Mutantes defectivos en la proteína Nef inducen bajos niveles de viremia en animales infectados, aunque el mecanismo por el cual Nef ejerce esta acción no está claramente definido. Por otro lado, el aislamiento de SIV denominado PBJ14 posee una proteína Nef con un motivo aminoacídico que promueve la activación de los linfocitos, favoreciendo así la replicación viral. Esto se traduce en una enfermedad particularmente aguda en los animales infectados (Saucier *et al.*, 1998). Además, la proteína Nef promueve la endocitosis del receptor CD4 (Aiken *et al.*, 1994; Sanfridson *et al.*, 1994) y disminuye los niveles del complejo mayor de histocompatibilidad clase I inhibiendo la lisis por citotoxicidad mediada por linfocitos T de las células infectadas con HIV-1 (Collins & Baltimore, 1999; Johnson & Desrosiers, 2002). En un trabajo reciente se ha mostrado que la proteína Nef de HIV-1 también interviene en un complejo mecanismo que permite la infección de células T quiescentes (Swingler *et al.*, 2003). En este trabajo, se propone que en macrófagos infectados con HIV-1, la proteína Nef promueve la liberación de factores que actúan sobre los linfocitos B. Estos linfocitos B al ponerse en contacto con los linfocitos T quiescentes permiten que estos últimos sean infectados por el virus.

La proteína **Vif** es conocida como factor de infectividad, pues es un potente regulador de la infectividad y de la replicación viral y por lo tanto, es esencial para la patogénesis *in vivo*. Estudios realizados con virus HIV-1 mutantes defectivos en Vif, indican que Vif es capaz de suprimir el efecto antiviral de factores celulares presentes en células mononucleares periféricas, macrófagos y en ciertas líneas celulares llamadas no permisivas (Sheehy *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el blanco de Vif es la proteína celular CEM15, la cual actúa como un potente inhibidor de la replicación de HIV-1, ya que por medio de su actividad de desaminasa produce una hipermutación del genoma viral (Zhang *et al.*, 2003).

La proteína **Vpr** es empaquetada en las partículas virales de los lentivirus de primates y fue la primer proteína regulatoria que pudo ser detectada en las partículas virales (Cohen *et al.*, 1990). En la mayoría de los retrovirus, la entrada del ADN copia del genoma viral al núcleo requiere de la división celular, mientras que en los lentivirus de primates la proteína Vpr permite la importación del complejo de preintegración al núcleo de las células aún en ausencia de división celular (Heinzinger *et al.*, 1994). Cabe destacar que en HIV-2 y SIV se encuentra el gen *vpx* que es una duplicación de *vpr* (Fletcher *et al.*, 1996).

La proteína **Vpu** es distintiva de HIV-1 y de SIVs muy relacionados con HIV-1. Esta proteína posee dos funciones: a) estimula la brotación de las partículas virales de la membrana plasmática al medio extracelular (Göttlinger *et al.*, 1993), y b) promueve la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático (RE), evitando así que glicoproteína Env quede retenida en el RE por asociación con CD4 durante el transporte de Env por la vía secretoria celular (Willey *et al.*, 1992a,b).

CICLO DE REPLICACIÓN DE LOS LENTIVIRUS

Los eventos que ocurren durante la replicación de los lentivirus involucran varias etapas: reconocimiento y unión al receptor celular; fusión de las membranas celular y viral; transcripción reversa del genoma viral; entrada

al núcleo e integración del ADN viral; síntesis y procesamiento de las proteínas virales; y finalmente, el ensamblado y maduración de los viriones (Figura 2). A continuación se detallan algunos aspectos fundamentales de cada etapa:

1) RECONOCIMIENTO DEL RECEPTOR CELULAR Y FUSIÓN DE MEMBRANAS

El primer paso en el ciclo de infección es el reconocimiento por parte de la partícula viral de un receptor celular específico. La interacción entre el receptor celular y la glicoproteína viral Env es un proceso muy complejo que involucra una unión inicial, un drástico cambio conformacional en la glicoproteína Env, y finalmente, la fusión de las membranas celular y viral. La subunidad SU de la proteína Env es la responsable del contacto inicial con el receptor celular, mientras que la subunidad TM interviene en el posterior acercamiento y fusión de las membranas celular y viral. El primer receptor identificado para un retrovirus fue la molécula de superficie CD4 (Dalglish *et al.*, 1984) involucrada en la infección por HIV y SIV. El reconocimiento por la glicoproteína Env del receptor CD4 es suficiente para establecer la unión de la partícula viral a la superficie celular, pero no lo es para mediar la entrada del virión a la célula (Chesebro *et al.*, 1990; Clapham *et al.*, 1991). Este hecho llevó a la búsqueda de moléculas que también intervinieran en la entrada viral y que actuaran como correceptores. El primer correceptor que se identificó para HIV-1 fue CXCR4 (Feng *et al.*, 1996) y desde entonces, se han identificado muchas moléculas que actúan como correceptores para los lentivirus y probablemente la lista aumente con el tiempo. Los correceptores identificados hasta ahora corresponden a moléculas de la superficie celular pertenecientes a una familia de receptores con siete dominios transmembrana y cuyos ligandos son factores del sistema inmune llamados quimioquinas. Para HIV y SIV, se han identificado dos familias de receptores de quimioquinas que intervienen en el proceso de fusión: CXCR y CCR. Estas dos familias determinan el tropismo celular presentado por los diferentes aislamientos virales, aunque

existen otros factores posteriores a la entrada viral que también condicionan el tropismo. En particular, cepas de HIV-1 con preferencia por células de la línea T (T-trópicas) utilizan como correceptor a la molécula CXCR4, mientras que las cepas con preferencia por macrófagos (macrófago-trópicas) utilizan CCR5 (Bates, 1996). Sin embargo, el patrón de utilización de correceptores para HIV-2 y SIV es diferente del presentado por HIV-1 (Clapham & McKnight, 2002). La mayoría de los aislamientos de SIV utilizan principalmente la molécula CCR5 como correceptor aunque existen otras moléculas, como GPR15, CXCR6 y GPR1, que también pueden ser utilizadas por SIV como correceptores (Chen *et al.*, 1997; Clapham & McKnight, 2002).

El mecanismo de fusión de las membranas celular y viral no está totalmente esclarecido. La interacción de la subunidad SU de la glicoproteína Env con el receptor y correceptor celulares induce un cambio conformacional en la subunidad TM, que resulta en la exposición del péptido de fusión que se encuentra en el extremo amino de la TM (Chan *et al.*, 1997). El péptido de fusión se inserta entonces en la membrana de la célula blanco promoviendo la aposición de las membranas viral y celular (Chan & Kim, 1998). Una vez que se han fusionado completamente las membranas, el virión desnudo se libera en el citoplasma.

2) TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La transcripción reversa es un proceso complejo y altamente ordenado que comienza luego de la liberación del virión en el citoplasma de la célula infectada. La reacción de transcripción reversa tiene lugar básicamente en el citoplasma y, aunque la señal que dispara la reacción de transcripción reversa no se conoce con exactitud, se piensa que es suficiente la simple exposición de la partícula viral desnuda a altos niveles de desoxinucleótidos presentes en el citoplasma. La TR retroviral que se encuentra en el virión es capaz de sintetizar el ADN doble cadena copia del genoma viral tan pronto se pierde la envoltura. El proceso de transcripción reversa resulta de cuatro

actividades catalíticas presentes en la TR que intervienen en diferentes etapas del proceso. Estas son: la actividad ADN polimerasa-ARN dependiente; la ADN polimerasa-ADN dependiente; la ADN helicasa y la actividad de ARNasa H (Kraus *et al.*, 1990). El mecanismo de transcripción reversa propuesto indica que la reacción de síntesis de la cadena de ADN negativa comienza cerca del extremo 5' del genoma viral, utilizando un ARN de transferencia (ARNt) como iniciador (Goff, 2001). Este ARNt es incorporado a la partícula viral durante el ensamblado por interacción con el llamado sitio de unión del cebador presente en el ARN genómico viral. El producto de esta primera reacción se une luego al extremo 3' de la misma o de la otra molécula del genoma viral, actuando como iniciador para que se complete la síntesis de la cadena de ADN de polaridad negativa. El desplazamiento del fragmento inicial de ADN desde el extremo 5' al 3' del ARN viral es posible gracias a la presencia de secuencias repetidas directas en los extremos del genoma. Una vez terminada la síntesis del ADN de polaridad negativa, el templado de ARN es digerido por la actividad de ARNasa H de la TR. Sin embargo, la síntesis de la cadena de ADN de polaridad positiva requiere de un fragmento de ARN genómico que resiste la degradación por la ARNasa H y que actúa como cebador (Charneau *et al.*, 1992). La síntesis de la cadena positiva continúa hasta copiar 18 bases del ARNt. Al ser degradado este ARNt, los extremos de ambas cadenas de ADN hibridan, por ser complementarias a nivel de las LTRs, formándose así una molécula circular. Las discontinuidades en ambas hebras son reparadas por enzimas celulares. Esta estrategia de síntesis de ADN permite el copiado de señales presentes en los extremos 5' y 3' del genoma fundamentales para la transcripción e integración (Goff, 2001).

El proceso de transcripción reversa resulta en la formación del llamado complejo de preintegración compuesto por el ADN doble cadena copia del genoma viral y las proteínas IN y TR, entre otros componentes (Miller *et al.* 1995; Bukrinsky *et al.*, 1993). Una vez formado, el complejo de preintegración es conducido al núcleo celular.

3) INTEGRACIÓN DEL ADN PROVIRAL

El proceso por el cual el complejo de preintegración llega al núcleo no está completamente esclarecido. Contrario a otros retrovirus, que necesitan la división celular para que el ADN retroviral acceda al núcleo, los lentivirus pueden infectar células quiescentes (Weinberg *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992) por transporte activo del complejo de preintegración a través de la membrana nuclear mediado por señales presentes en las proteínas MA y Vpr (Freed *et al.*, 1995; Gallay *et al.*, 1995). Una vez en el núcleo celular, el complejo de preintegración se integra al genoma como provirus. La enzima que cataliza la integración específica y eficiente del ADN viral es la IN. Esta enzima cliva cada extremo 3' del ADN viral eliminando 2 bases de cada uno de ellos. La eliminación de estas bases genera grupos hidroxilo libres que son utilizados para atacar la unión fosfodiéster en el ADN celular. La energía liberada por la ruptura de este enlace es usada para generar la unión del ADN viral con el genoma celular (Coffin, 1996). La reparación del ADN y la ligación de las uniones completan el proceso produciendo una duplicación de una corta secuencia que flanquea al provirus. El sitio de inserción en el genoma celular no es específico, aunque no cualquier región del genoma es utilizada como sitio de inserción (Stevens & Griffith, 1994). Una vez que el provirus se ha integrado, es permanentemente incorporado al genoma de la célula infectada y por lo tanto, persiste en ella convirtiéndola en una productora crónica de progenie viral.

Además de la forma lineal del precursor ADN viral pueden detectarse otras tres formas circulares extracromosomales de ADN viral durante la infección. Sin embargo, ninguna de estas formas puede ser utilizada como precursor proviral.

4) EXPRESIÓN Y PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS VIRALES

La transcripción del provirus ocurre a través de la maquinaria celular y está dirigida por elementos que actúan *in cis* presentes en las LTRs del ADN

proviral y por la proteína retroviral Tat que actúa regulando la elongación de los transcriptos. La transcripción del ADN proviral resulta en moléculas de ARN de tamaño genómico que a su vez pueden dar lugar a moléculas de tamaño subgenómico por procesamiento alternativo. Así, según el nivel de procesamiento que sufren, los ARNm pueden dividirse en: no procesados, monoprocesados y multiprocesados (Hammarskjöld, 1997). El balance correcto entre las distintas especies de ARNm virales asegura la expresión de las proteínas estructurales, aquellas con actividad enzimática, las accesorias y la producción de moléculas de ARN que servirán como genoma para la nueva progenie viral. Los precursores Gag y Gag-Pol son expresados a partir de ARNm virales no procesados, idénticos a las moléculas de ARN que sirven como genomas virales; mientras que la glicoproteína viral Env es sintetizada a partir de ARNm virales monoprocesados que han sufrido la eliminación de los genes *gag* y *pol* (Hammarskjöld, 1997). Entre los ARNm multiprocesados se encuentran aquéllos que codifican para las proteínas virales accesorias.

5) ENSAMBLADO Y MADURACIÓN DE VIRIONES

El proceso de ensamblado de las partículas virales involucra a distintas macromoléculas que deben ser transportadas por diferentes mecanismos hasta el sitio de ensamblado. La expresión de los precursores como poliproteínas permite minimizar el número de componentes que deben ser transportados hasta el lugar de ensamblado. La poliproteína Gag contiene la información estructural necesaria para dirigir la formación de nuevas partículas (Hunter, 1994). En el caso de los lentivirus, el precursor Gag es sintetizado por ribosomas citoplasmáticos y es transportado hasta la membrana plasmática de la célula infectada donde ocurre el ensamblado viral. Los retrovirus que siguen esta vía de morfogénesis se los conoce como tipo C, a diferencia de lo que ocurre con los retrovirus tipo B/D cuyos precursores son primero transportados a un sitio de pre-ensamblado intracitoplasmático antes de la brotación de las partículas virales (Hunter,

1994). La glicoproteína viral Env es sintetizada y transportada a través de la vía secretoria celular hasta la membrana donde colocaliza con la cápside nascente (Hunter, 1994). Por último, se incorporan a las partículas nascentes dos moléculas de ARN genómico así como otras proteínas virales que cumplirán funciones en el próximo ciclo viral.

El análisis de la composición de la membrana viral ha permitido establecer un enriquecimiento en ciertos compuestos lipídicos, lo que ha llevado al estudio de cuáles son las regiones de la membrana plasmática donde se ensamblan los lentivirus. En particular, se ha centrado la atención sobre áreas especializadas de la membrana plasmática que tienen una composición lipídica particular llamadas *rafts*. Estos subdominios enriquecidos en esfingomielina, glicoesfingolípidos y colesterol (Brown & London, 2000; Simons & Ikonen, 1997) cumplen importantes funciones en muchos procesos biológicos, como la transducción de señales y el tráfico de proteínas. Recientemente, se han presentado evidencias de la asociación de Gag con los microdominios *rafts* (Lindwasser & Resh, 2001; Ono & Freed, 2001). Estas observaciones han llevado a postular que el ensamblado y la brotación de HIV y SIV ocurren en estos dominios especializados.

El último paso en el ensamblado es la liberación del virión inmaduro al medio extracelular por brotación y el procesamiento proteolítico de los precursores Gag y Gag-Pol. Con respecto a la brotación, el dominio carboxilo de Gag interactúa con la proteína celular Tsg101, la cual reclutaría la maquinaria endocítica de la célula que funcionaría en sentido inverso para mediar la liberación de los viriones al medio extracelular (Carter, 2002). El procesamiento proteolítico de los precursores se conoce como maduración e implica una reorganización de las proteínas maduras y del genoma viral dentro de la partícula. La maduración del *core* viral produce la condensación y formación del cono electrodensso característico de las partículas lentivirales al ser visualizadas por microscopía electrónica.

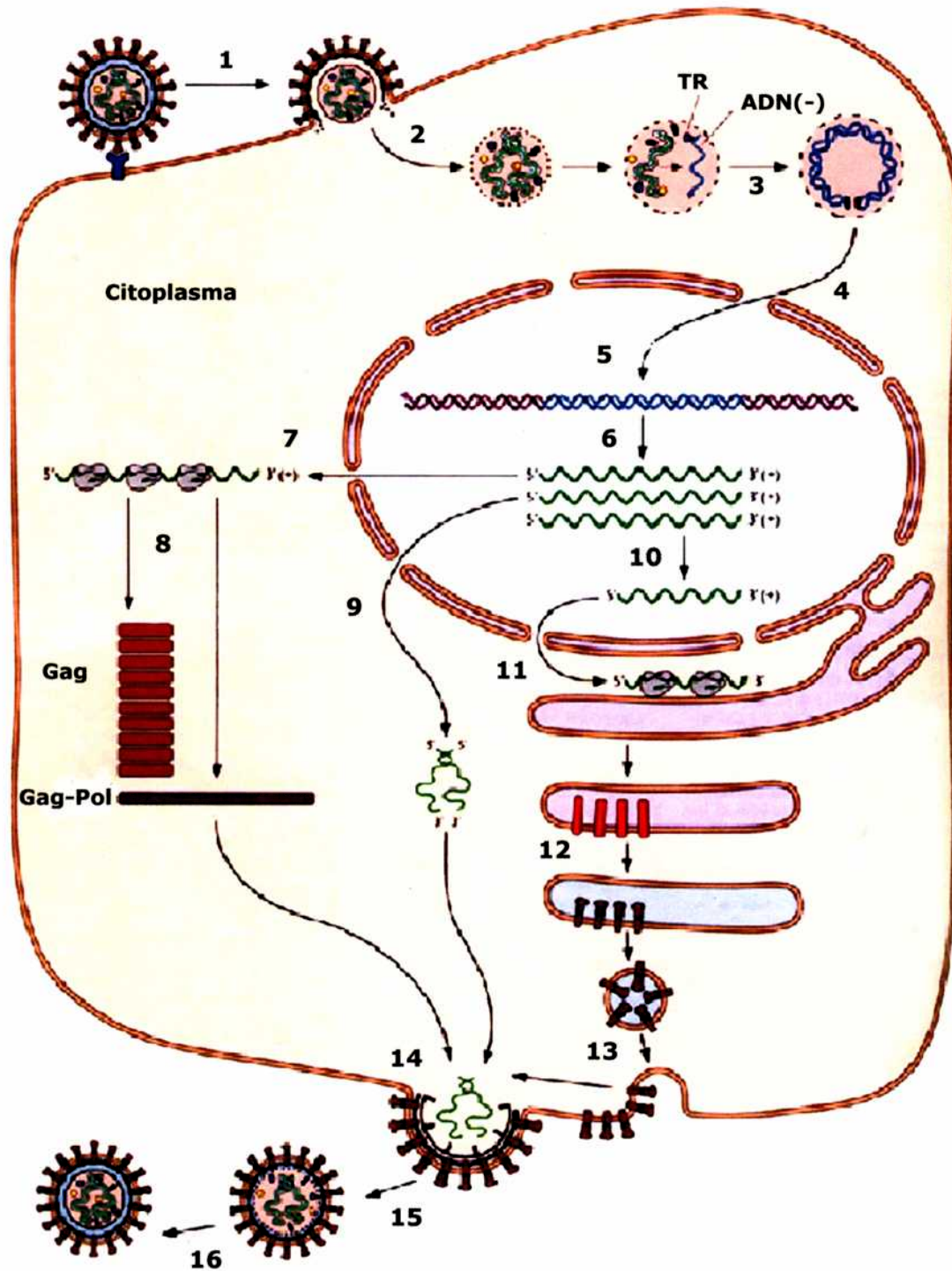


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de replicación de los lentivirus. (1) Interacción de la subunidad SU de la glicoproteína viral Env con el complejo receptor-correceptor celular. **(2)** Fusión de las

membranas viral y celular y liberación del *core* en el citoplasma. **(3)** Transcripción reversa del genoma viral de ARN simple cadena a ADN doble cadena. **(4)** Entrada del ADN proviral al núcleo celular. **(5)** Integración del ADN viral como provirus en el genoma de la célula hospedadora. **(6)** Transcripción del provirus a moléculas de ARN viral de tamaño genómico y subgenómico con distintos grados de procesamiento. **(7)** Exportación desde el núcleo de los ARNm virales no procesados. **(8)** Traducción de los precursores virales Gag y Gag-Pol en el citoplasma. **(9)** Transporte de las moléculas de ARN de tamaño genómico para ser encapsidadas como genoma en las partículas nacientes. **(10)** Procesamiento de los ARNm virales para la expresión de la glicoproteína Env. **(11)** Expresión de la glicoproteína Env por ribosomas asociados a retículo endoplasmático. **(12)** Transporte de Env a través de la vía secretoria celular y procesamiento en el aparato de Golgi. **(13)** Expresión de la glicoproteína Env en la membrana plasmática de la célula infectada. **(14)** Ensamblado de las partículas virales: los componentes virales (ARN genómico, Gag, Gag-Pol y Env) se dirigen al lugar de ensamblado. Los lentivirus pertenecen al grupo tipo C, que ensamblan sus partículas en la membrana plasmática de las células infectadas. **(15)** Brotación de los viriones producidos. **(16)** Clivaje proteolítico y maduración de las partículas virales. (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANO

Durante los últimos años de la década de 1970 y principios de 1980 surgieron informes en el mundo respecto de pacientes con una disfunción inmunológica grave. Este nuevo e inusual síndrome se caracterizaba por una linfadenopatía generalizada, infecciones oportunistas y una variedad poco frecuente de tipos de cáncer. Este síndrome es hoy conocido como de inmunodeficiencia adquirida o SIDA.

La primera clave sobre la etiología de esta enfermedad se remonta a 1983. El grupo de la Dra. Barré-Sinoussi en colaboración con el Dr. Montagnier del Instituto Pasteur de París aislaron un agente viral a partir de nódulos linfáticos de un paciente que presentaba los síntomas descritos (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Este agente presentaba las características típicas de un retrovirus. Sin embargo, la importancia de este descubrimiento fue evidente recién un año después cuando el Dr. Gallo y sus colegas de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, aislaron un retrovirus con tropismo para células T (Gallo *et al.*, 1984). Análisis por microscopía electrónica revelaron que estos aislamientos eran morfológicamente similares al grupo de los lentivirus y ensayos posteriores confirmaron esta relación.

Como era común en ese momento, cada laboratorio dio a su aislamiento un nombre diferente: virus asociado a linfadenopatía o LAV para el grupo del Dr. Montagnier y virus linfotrópico de células T humanas tipo III para el grupo del Dr. Gallo. Finalmente, en 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus adoptó el nombre de virus de inmunodeficiencia humano o HIV como lo conocemos estos días.

Existen dos tipos diferentes de HIV, llamados HIV-1 y HIV-2, distinguibles por su organización genómica y filogenia. A su vez, cada uno está clasificado en varios grupos en base a criterios filogenéticos. Esto da idea de la complejidad que presentan estos virus.

ORIGEN DE HIV. SIV COMO MODELO

Desde su descubrimiento, el origen del virus de inmunodeficiencia humano ha representado un verdadero desafío. En el año 1985, se describió la caracterización de un virus relacionado a HIV aislado de un mono macaco cautivo que había desarrollado un síndrome similar al SIDA (Daniel *et al.*, 1985; Letvin *et al.*, 1985). Este virus fue llamado virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) por sus similitudes genéticas y estructurales con HIV. Desde entonces, se han reportado evidencias de infección con SIV en alrededor de 31 especies de primates africanos. Aunque existen características que relacionan a HIV y SIV, entre ellos presentan una importante diferencia en cuanto a la patogenicidad que producen en sus huéspedes naturales. No se ha observado que SIV produzca enfermedad o síntomas clínicos en sus huéspedes naturales, indicando una larga historia de co-evolución entre SIV y su huésped. Sin embargo, si un SIV que naturalmente infecta a una especie de simio infecta a otra especie diferente, el virus resulta patogénico en esta nueva especie de simio y provoca SIDA (Murphey-Corb *et al.*, 1986).

Desde el descubrimiento de SIV, se ha especulado que éste constituye el origen de HIV. Esta hipótesis se basa en análisis de secuencias de diferentes regiones del genoma viral y en la construcción de árboles filogenéticos entre HIV y SIV que han permitido establecer la cercanía evolutiva entre ambos. Además, la coincidencia en la distribución geográfica entre SIVs y HIVs genéticamente similares sustenta esta hipótesis. Finalmente, las oportunidades de contacto múltiples entre humanos y animales infectados podrían explicar el salto de virus de una especie a otra (Hahn *et al.*, 2000).

El origen de HIV-2 fue el primero en ser esclarecido. Análisis moleculares permitieron establecer que HIV-2 está genéticamente relacionado con una variante de SIV, denominada SIVsmm, aislada de monos macacos en cautiverio que presentaban síntomas de inmunodeficiencia (Hirsch *et al.*, 1989b). Pronto se estableció que estos macacos resultaron enfermos por haberse infectado con un virus proveniente de la especie de monos

Cercocebus atys, el huésped natural de SIVsmm. La relación existente entre SIVsmm y HIV-2 cumple satisfactoriamente con todos los criterios mencionados antes: ambos comparten idéntica estructura genómica e incluso poseen la proteína Vpx que no está presente en ningún otro genoma lentiviral (Hirsch *et al.*, 1989b); estudios filogenéticos realizados en base a secuencias parciales del gen *gag* han permitido establecer una relación filogenética y geográfica entre HIV-2 y SIVsmm, pues secuencias provenientes de humanos y monos de la misma región geográfica se encuentran estrechamente relacionadas. Además, existe una coincidencia geográfica entre el hábitat natural de estos monos y la región de Africa donde HIV-2 es endémica para humanos. Finalmente, estos monos son cazados como alimento o adoptados como mascotas, estableciendo una ruta de transmisión posible por contacto directo entre humanos y animales infectados (Chen *et al.*, 1996).

El origen de HIV-1 ha sido mucho más complejo de establecer. Desde hace tiempo, se estableció una similitud de organización genómica entre HIV-1 y la variante SIVcpz (Peeters *et al.*, 1989, 1992) que infecta a los chimpancés. En particular, debido a la presencia en ambos virus de la proteína accesoria Vpu que no está presente en otros SIVs (Huet *et al.*, 1990). Pero aspectos tales como la distancia filogenética que los separa, la aparente baja prevalencia de la infección por SIVcpz en chimpancés en estado salvaje y la falta de concordancia geográfica entre los primeros casos de SIDA y el hábitat del chimpancé hicieron dudar de la certeza de esta hipótesis. Sin embargo, en el año 1999 la Dra. Hahn presentó evidencias que permitieron establecer que la transmisión de SIVcpz desde una subespecie de chimpancé era realmente el origen de HIV-1 (Gao *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia de un nuevo aislamiento, denominado SIVcpzUS, cuyo huésped natural es la subespecie de chimpancé *Pan troglodytes troglodytes*, permitió establecer la gran similitud genética y la estrecha relación filogenética con HIV-1 (Gao *et al.*, 1999). Si bien el origen de HIV-1 se ha determinado, el origen mismo del virus SIVcpz es una incógnita. Estudios recientes basados en análisis de la secuencia de los genes *gag*, *pol* y *env* han planteado un origen recombinante para esta

variante de SIV, producto de la recombinación de otros dos aislamientos de monos, SIVrcm y SIVgsn que naturalmente infectan las especies *Cercocebus torquatus* y *Cercopithecus nictitans* (Bailes *et al.*, 2003). Los hábitos de cacería de los chimpancés sobre estas especies de monos permiten explicar la adquisición de estas variantes virales y la recombinación entre ellas en los chimpancés infectados. La evidencia del origen híbrido de SIVcpz tiene importantes implicancias pues apoya la hipótesis de la transmisión de SIV entre especies, incluido el hombre, en condiciones naturales.

Aunque se ha establecido el origen de HIV, aún quedan muchas preguntas por responder. La más antigua evidencia de esta epidemia es una muestra de sangre tomada en 1959 de una persona infectada en Africa Central (Zhu *et al.*, 1998), pero continúa el interrogante de cuánto tiempo antes de esta fecha ocurrió la zoonosis y en qué circunstancias tuvo lugar. Los conocimientos actuales nos indican que los primates africanos representan un reservorio extremadamente grande de lentivirus con la potencialidad de infectar otras especies, incluidos los seres humanos.

La crisis producida por la aparición del HIV-SIDA ha provocado que los investigadores centren su atención en los lentivirus no humanos como fuente de información y material de estudio. Aunque no existe un modelo no humano ideal para el estudio de HIV, la estrecha relación que existe entre HIV y SIV convierte a este último en el modelo más apropiado para el estudio de la biología y de las características replicativas de este grupo de virus. Un síndrome similar al SIDA (infección persistente, inmunodeficiencia, infecciones oportunistas y muerte) puede ser inducido experimentalmente en monos macacos por infección con SIVsmm. Incluso, existen variantes de SIV muy patogénicas como SIVsmmPBj14, que causa un síndrome agudo con altos títulos de virus en sangre y finalmente la muerte dentro de los 5 a 10 días al ser inoculada en monos macacos (Dewhurst *et al.*, 1990; Fultz & Zack, 1994). Otras variantes presentan neurovirulencia como SIV/17E-Br (Sharma *et al.*, 1992). Esto evidencia la versatilidad de SIV para el estudio de la infección por HIV en humanos. En los últimos tiempos, se han desarrollado también virus quiméricos entre SIV y HIV llamados SHIV en los

cuales, en el contexto del genoma de SIV, se introduce el gen *env* de HIV-1 en lugar del de SIV (Reimann *et al.*, 1996; Cayabyab *et al.*, 1999). La infección de monos macacos con estos virus quimeras constituye un importante modelo para estudiar tanto la transmisión viral como para desarrollar estrategias antivirales. Por lo tanto, la importancia de tener un modelo adecuado para HIV-SIDA pone de manifiesto la relevancia del estudio detallado de la biología y patogénesis de SIV.

PARTÍCULA LENTIVIRAL

Los viriones lentivirales se ensamblan y brotan de la célula infectada como partículas inmaduras conteniendo los precursores Gag y Gag-Pol no procesados. El proceso de maduración consiste en el procesamiento proteolítico de los precursores, provocando un drástico reordenamiento en la estructura y morfología del virión. El análisis por microscopía electrónica de la organización estructural de las partículas lentivirales ha permitido definir las regiones principales que componen a los viriones maduros (Gelderblom, 1991 y Figura 3). La envoltura lipídica deriva de la membrana plasmática de la célula infectada y es donde se inserta la glicoproteína viral Env en una conformación trimérica, con la subunidad SU hacia el exterior de la partícula y asociada a la subunidad TM que proporciona el anclaje a todo el complejo. Inmediatamente por debajo de la envoltura, se encuentra una cubierta proteica formada por la proteína MA y en el centro de la partícula, se observa un *core* viral que presenta una morfología cónica y electrodensa. Este *core* está compuesto por la proteína CA y dos moléculas de ARN genómico simple cadena asociadas a la proteína NC formando un complejo ribonucleoproteico. Asociadas al *core* se encuentran también las proteínas virales con actividad enzimática TR, IN y PR, y proteínas celulares como la ciclofilina A (Luban *et al.*, 1993), entre otras. Sin embargo, las funciones que cumplen estas proteínas celulares durante el ciclo de replicación viral no han sido determinadas con claridad.

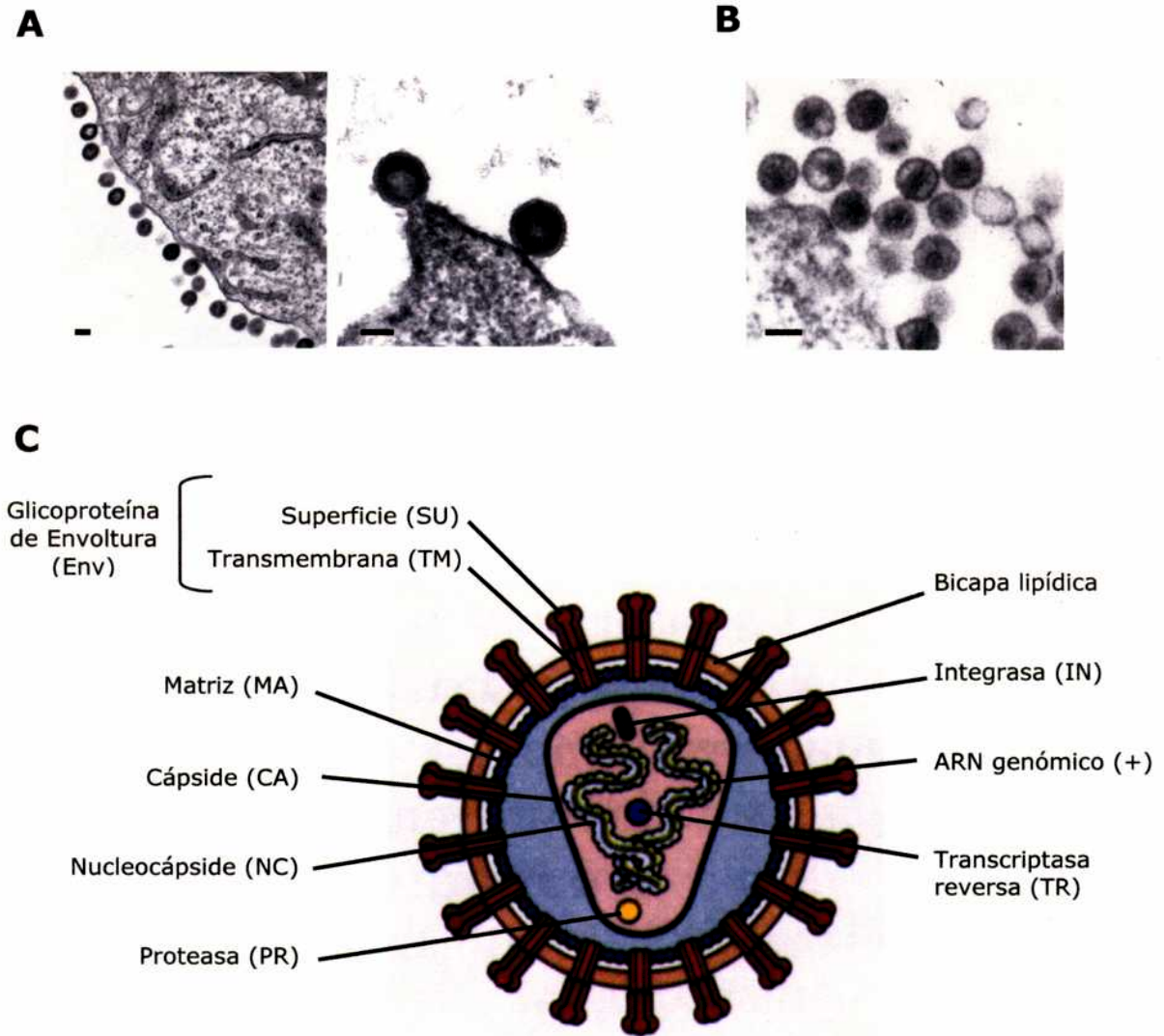


Figura 3. Estructura de la partícula lentiviral. **A)** Izquierda, microscopía electrónica de partículas de SIV obtenidas utilizando el sistema de expresión del virus vaccinia (González *et al.*, 1998). Derecha, detalle de estas partículas. Las barras corresponden a 100 nm. **B)** Microscopía electrónica de partículas de HIV-1 maduras. La barra representa 100 nm. **C)** Representación esquemática de los componentes del virión (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

ENSAMBLADO DE SIV Y HIV

El ensamblado viral es un proceso complejo a través del cual los componentes virales interactúan para formar los viriones en las etapas finales del ciclo de replicación. Aunque se han identificado la mayoría de los componentes que forman las partículas lentivirales, los mecanismos moleculares involucrados en el ensamblado de los viriones no han sido totalmente dilucidados.

El precursor Gag tiene un rol fundamental en el ensamblado. Posee la información necesaria para dirigir el transporte, ensamblado y brotación de las partículas virales, aún en ausencia del resto de las proteínas virales. La expresión de los genes *gag* o *gag-pol* de SIV y HIV en diferentes sistemas de expresión eucarióticos resulta en el ensamblado y brotación de partículas que son morfológicamente indistinguibles de los viriones producidos durante la infección viral. La expresión del gen *gag* de HIV y SIV en los sistemas de expresión recombinante del virus vaccinia (González *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1990; Karacostas *et al.*, 1989) y de baculovirus (Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 1990) ha permitido estudiar las regiones del precursor Gag que intervienen en el ensamblado, las modificaciones que sufre Gag, la capacidad de Gag de interactuar tanto con otras moléculas de precursor como con la membrana plasmática y la capacidad de Gag de brotar al medio extracelular como partícula. El sistema de expresión del virus vaccinia también se ha utilizado para obtener partículas pseudovirales llevando la glicoproteína viral Env en su superficie por coexpresión de los genes *gag* y *env* de SIV y HIV (González *et al.*, 1994, 1996; Haffar *et al.*, 1990).

Los precursores Gag y Gag-Pol son modificados cotraduccionalmente en su extremo amino terminal por agregado de ácido mirístico. Este ácido graso de 14-carbonos es incorporado en la glicina en posición 2 del dominio MA luego del ser eliminada la metionina iniciadora (Goddard *et al.*, 1989; Göttlinger *et al.*, 1989 ; Veronese *et al.*, 1988). La miristilación es necesaria para la interacción de los precursores Gag y Gag-Pol con la membrana plasmática de la célula infectada, pues mutaciones en la glicina 2 que

bloquean la adición de mirístico impiden el ensamblado de partículas virales (Bryant & Ratner, 1990). Sin embargo, la presencia del ácido mirístico no es suficiente para que Gag establezca una unión estable con la membrana. Existen otras regiones dentro del dominio MA que contribuyen a estabilizar esta interacción. Estudios de mutagénesis realizados en nuestro laboratorio han demostrado que una región rica en aminoácidos básicos, comprendida entre los residuos 26 y 32 del dominio MA de SIV, es necesaria para la asociación de Gag con la membrana plasmática (González *et al.*, 1993). En HIV-1, también se ha identificado una región polibásica en el dominio MA que contribuye a la interacción Gag-membrana (Ono & Freed, 1999; Paillart & Göttlinger, 1999; Yuan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Se ha propuesto que esta región polibásica conservada en SIV y HIV establece interacciones electrostáticas con fosfolípidos ácidos de la membrana plasmática, contribuyendo así a la asociación de Gag con la membrana (Zhou *et al.*, 1994).

Además del ácido mirístico y de la región polibásica, se ha demostrado que una región hidrofóbica en el extremo amino terminal de la proteína MA participa también de la interacción de Gag con la membrana (González & Affranchino, 1998). Este dominio hidrofóbico actúa de manera concertada con la región polibásica y con el ácido mirístico conformando un dominio tripartito de asociación con la membrana.

Estudios estructurales de resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X de la MA de HIV y SIV demostraron que estas proteína poseen 5 y 7 α -hélices, respectivamente, y que además forman trímeros en el cristal (Forster *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995). Aunque se desconoce si la MA adopta en el contexto del precursor Gag la misma estructura que exhibe como proteína madura, existen evidencias que apoyan que la trimerización del dominio MA acompaña el proceso de oligomerización del precursor Gag durante el ensamblado viral: i) la criomicroscopía electrónica de partículas de HIV-1 inmaduras reveló que el precursor Gag se organiza en unidades repetitivas de dímeros de trímeros, lo cual se interpreta como el resultado de la formación de dímeros por interacciones del dominio CA, e interacciones de trímeros por el dominio MA

(Fuller *et al.*, 1997); ii) estudios de resonancia magnética nuclear de la estructura de un fragmento correspondiente a los 283 residuos amino terminales del precursor Gag de HIV-1 demostraron que la estructura del dominio MA es similar a la obtenida por rayos X para los trímeros de la proteína MA madura (Tang *et al.*, 2002); iii) el análisis del estado multimérico del precursor Gag de HIV-1, por ensayos de velocidad de sedimentación en gradientes de densidad, demostró que el dominio MA contribuye a la trimerización de Gag y que estos trímeros de Gag constituyen una especie intermediaria en el proceso de ensamblado de partículas (Morikawa *et al.*, 2000).

Además de la proteína MA, existen otros dominios de Gag que intervienen en el ensamblado y formación de partículas. La proteína CA también cumple un rol importante durante el ensamblado viral: la región amino terminal de la CA interviene en la formación del *core* y en la incorporación a viriones de la proteína celular ciclofilina A necesaria para la infectividad viral (Luban *et al.*, 1993), mientras que la región carboxilo terminal de la CA es crucial para el ensamblado pues participaría en las interacciones Gag-Gag (Dorfman *et al.*, 1994a; Mammano *et al.*, 1994). Se ha reportado que la proteína CA de HIV-1 forma dímeros en solución y que es el dominio carboxilo terminal de la CA el que media esta interacción (Gamble *et al.*, 1997). En el contexto del precursor Gag, la región de dimerización se extiende hasta el péptido espaciador p2 que separa los dominios CA y NC (Figura 1). Con respecto a la NC, ésta cumple también funciones importantes durante la formación de viriones, ya que media la incorporación del ARN genómico viral a las partículas a través de interacciones entre las estructuras de "dedos de zinc" presentes en la NC y la región *psi* de empaquetamiento localizada en la región 5' del ARN viral. El dominio NC también participa de interacciones Gag-Gag durante el ensamblado (Burniston *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 1994; Jowett *et al.*, 1992). Existe en el precursor Gag un dominio crucial para las etapas tardías del ensamblado. El motivo aminoacídico P(T/S)AP presente en la región carboxilo terminal del péptido p6, es crítico para la brotación de las partículas virales de la membrana celular (Huang *et al.*, 1995). Este motivo rico en prolinas interacciona con la proteína celular

Tsg101, componente de la maquinaria endocítica celular que participaría en el proceso de brotación de las partículas retrovirales (Garrus *et al.*, 2001; VerPlank *et al.*, 2001).

GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV Y HIV

Los genes *env* de SIV y HIV codifican para el precursor proteico Env (gp160) que es sintetizado por ribosomas asociados al RE de la célula infectada. Durante su traducción y transporte a lo largo de la vía secretoria celular, el precursor Env es extensamente modificado por adición de oligosacáridos del tipo "alta manosa", complejos o híbridos (Means & Desrosiers, 2000); por O-glicosilación (Bernstein *et al.*, 1994) y palmitilación (Yang *et al.*, 1995; Rousso *et al.*, 2000). La glicosilación del precursor Env, por un lado, contribuye al plegamiento adecuado de la proteína y por otro, le permite al virus evadir el reconocimiento por anticuerpos.

El plegamiento de moléculas individuales del precursor Env comienza en el RE, mediado por chaperonas presentes en este compartimento. Este plegamiento de Env permite la formación de una estructura oligomérica compleja. La correcta oligomerización es importante para el transporte intracelular de Env, probablemente al ocultar secuencias hidrofóbicas en la estructura de la proteína. Una vez formado, el oligómero es transportado desde el RE al aparato de Golgi siguiendo la vía secretoria normal de la célula. Sólo una mínima fracción de las moléculas de Env son transportadas hasta la superficie celular; la mayoría de las moléculas quedan retenidas en el RE y son degradadas a través de la vía del proteasoma (Bültmann *et al.*, 2000).

El procesamiento de Env en sus dos subunidades se produce en el compartimento tardío del aparato de Golgi y está mediado por proteasas celulares del tipo de las furinas (Hunter, 1997). El clivaje de Env origina las subunidades SU (o gp120) y TM (o gp41). El clivaje del precursor Env es fundamental en el ciclo de replicación viral pues expone el péptido de fusión

que se encuentra en el extremo amino de TM. El procesamiento de Env también es importante para la incorporación de la glicoproteína a viriones, pues el precursor no es incorporado a las partículas virales en forma eficiente (Dubay *et al.*, 1995; Moulard *et al.*, 1999). Las dos subunidades, SU y TM, son transportadas desde el aparato de Golgi hasta el sitio de ensamblado en la membrana plasmática como un complejo proteico asociado por uniones no covalentes.

SUBUNIDAD DE SUPERFICIE

La SU es la proteína más externa del virión y por esto, se encuentra particularmente expuesta al reconocimiento y neutralización por el sistema inmune del hospedador. Posee cinco regiones que exhiben una alta variabilidad en su secuencia aminoacídica, llamadas V1 a V5 (Figura 4), y que, de acuerdo a análisis realizados con anticuerpos monoclonales, se hallan expuestas en la estructura de la subunidad SU (Douglas *et al.*, 1997). Por lo tanto, las regiones V1-V5 facilitarían el escape del virus al reconocimiento inmunológico del hospedador durante la infección. El dominio variable V3 de la subunidad SU es el que interacciona con el correceptor celular (Wu *et al.*, 1996) y por lo tanto, este dominio junto con las regiones V1/V2 estarían involucrados en la determinación del tropismo (Boyd *et al.*, 1993; Koito *et al.*, 1995). Las regiones variables se encuentran alternadas con regiones conservadas (C1 a C5; Figura 4) involucradas en el contacto del virus con el receptor celular CD4 (Wyatt *et al.*, 1992) y en la interacción de SU con la subunidad TM (Moore & Sodroski, 1996).

SUBUNIDAD TRANSMEMBRANA

La subunidad TM de los virus HIV y SIV presenta una organización estructural que incluye un dominio extracelular o ectodominio, una región de anclaje a membrana y un dominio citoplasmático (Figura 4).

El clivaje proteolítico de Env en las subunidades SU y TM, genera un nuevo extremo amino para la subunidad TM. Esta región amino terminal del ectodominio se halla muy conservada entre los aislamientos de HIV y SIV y contiene motivos ricos en residuos fenilalanina-leucina-glicina que le aportan características hidrofóbicas. Esta región se denomina péptido de fusión. En la estructura de la proteína TM, el péptido de fusión está seguido por dos regiones que contienen repeticiones espaciadas de aminoácidos hidrofóbicos conocidas como "cierre de leucinas" o hepta-repeticiones (Chambers *et al.*, 1990; Delwart *et al.*, 1990) (Figura 4). Estudios de mutagénesis de las dos hepta-repeticiones han demostrado que son fundamentales para la fusión de membranas y para la infectividad viral (Chen *et al.*, 1993; Dubay *et al.*, 1992a). Las dos hepta-repeticiones forman una estructura en espiral llamada *coiled-coil*, con las dos repeticiones en orientación relativa antiparalela (Blacklow *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995). Esta estructura presenta similitudes con la observada para la proteína hemaglutinina (HA) del virus Influenza que media la fusión entre las membranas celular y viral, y que ha sido extensamente estudiada. Por esto, se ha establecido una relación entre el modelo de fusión de membrana del virus Influenza y el propuesto para SIV y HIV (Allan, 1991; Carr & Kim, 1993). Se ha propuesto que la interacción de la subunidad SU con el complejo receptor-correceptor celular dispara el reordenamiento conformacional de la proteína TM, llevándola de la conformación nativa a la conformación fusogénica activa, donde la estructura *coiled-coil* se extiende permitiendo la inserción del péptido de fusión en la membrana plasmática de la célula blanco (Hart *et al.*, 1991; Weissenhorn *et al.*, 1997). La activación de varias subunidades TM a su conformación fusogénica permite la formación y expansión de un poro de fusión.

Este modelo del mecanismo de fusión, que propone la existencia de una serie de intermediarios conformacionales, se halla sustentado por estudios de inhibición de la fusión utilizando anticuerpos capaces de reconocer epitopes nuevos generados por la interacción entre la subunidad SU y el receptor CD4 (DeVico *et al.*, 1996). Por otro lado, se han desarrollado péptidos sintéticos como el T-20 o el DP-178 que estabilizan alguno de los

intermediarios conformacionales e impiden que se generen los siguientes intermediarios bloqueando así la fusión de membranas (Furuta *et al.*, 1998; Kilby *et al.*, 1998).

El evento de fusión de las membranas viral y celular es fundamental para la infección, pues no sólo permite la entrada del virus a la célula blanco, sino que también permite la diseminación del virus a otras células no infectadas a través de la fusión de las membranas de células adyacentes. Esta vía de diseminación viral se produce al fusionarse la membrana de una célula infectada expresando la glicoproteína Env en su superficie con la membrana de una célula vecina que expresa el complejo receptor-correceptor correspondiente. El resultado de esta vía de diseminación es la formación de estructuras celulares multinucleadas llamadas sincicios (Hunter, 1997).

El dominio de anclaje (Figura 4) es la región de la subunidad TM que atraviesa la membrana celular o viral manteniendo todo el complejo Env unido a la membrana. El dominio de anclaje corresponde a una secuencia aminoacídica con carácter hidrofóbico flanqueada por residuos hidrofílicos (West *et al.*, 2001). Se ha demostrado, sin embargo, que el reemplazo de la secuencia de anclaje de la subunidad TM de la proteína Env de HIV-1 por una secuencia de anclaje heteróloga resulta en proteínas con capacidad fusogénica y de conferir infectividad a viriones (Wilk *et al.*, 1996).

El dominio citoplasmático (CD) de las glicoproteínas Env de los virus HIV y SIV (Figura 4) es inusualmente largo comparado con el exhibido por otros retrovirus. En efecto, las glicoproteínas Env de HIV-1 y SIV poseen CDs de 150 y 164 aminoácidos, respectivamente, comparado con los 20 a 40 residuos que poseen los CDs de las proteínas Env del resto de los retrovirus (Hunter & Swanstrom, 1990). El CD de las proteínas Env de HIV y SIV presenta dos regiones que, en base al análisis de su secuencia primaria, podrían formar α -hélices anfipáticas (Venable *et al.*, 1989) (Figura 4).

Se ha demostrado que mutaciones en el CD de las proteínas Env de SIV y HIV afectan distintas propiedades de la glicoproteína Env, tales como la estabilidad y el procesamiento proteolítico (Johnston *et al.*, 1993); el nivel

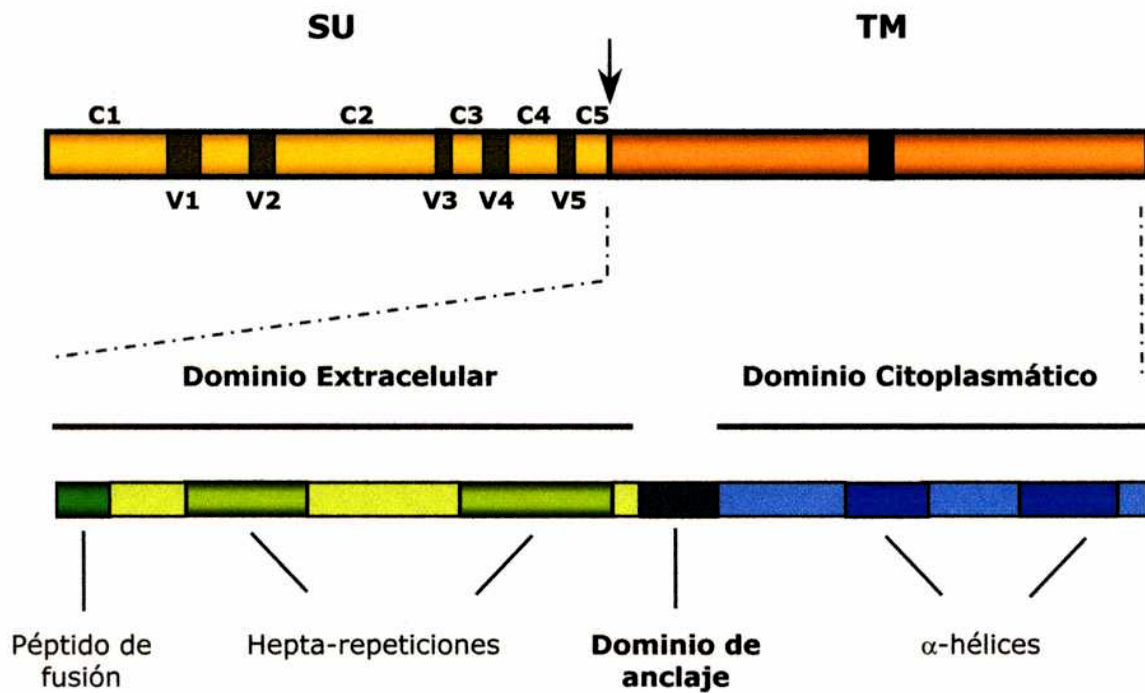


Figura 4. Esquema de las glicoproteínas Env de SIV y HIV. Arriba, se presenta la estructura de la glicoproteína Env con sus dos subunidades, SU y TM. La flecha indica el sitio de clivaje entre ambas subunidades mediado por proteasas celulares del tipo de las furinas. Se indican en la subunidad SU las cinco regiones variables V1 a V5 y las cinco regiones constantes C1 a C5. Abajo, se muestran los dominios de la subunidad TM de SIV: el dominio extracelular o ectodominio, que lleva el péptido de fusión y las regiones con hepta-repeticiones; el dominio de anclaje que atraviesa la membrana; y el dominio citoplasmático, con las dos α -hélices predichas en base a la estructura primaria (Venable *et al.*, 1989).

de glicosilación (Jowett & Jones, 1993); la capacidad fusogénica y de formación de sincicios (Ashorn *et al.*, 1990; Earl *et al.*, 1991; Mulligan *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1993; Spies & Compans, 1994); la expresión en superficie (Bültmann *et al.*, 2001; LaBranche *et al.*, 1995; Sauter *et al.*, 1996); y el tropismo (Johnston *et al.*, 1993) e infectividad viral (Chakrabarti *et al.*, 1989; Zingler & Littman, 1993).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La glicoproteína Env de SIV se encuentra en la superficie viral como un complejo trimérico formado por heterodímeros de las subunidades SU y TM. El proceso de incorporación de Env a partículas es crítico para la infectividad de los viriones. Sin embargo, el mecanismo de incorporación de Env a viriones todavía no ha sido totalmente esclarecido. Nuestro laboratorio ha demostrado que la coexpresión de la proteína MA y de la glicoproteína Env en el sistema del virus vaccinia resulta en el ensamblado de partículas pseudovirales que incorporan la proteína Env (González *et al.*, 1993). Estos resultados sugieren que el dominio MA de Gag participa en la incorporación de Env a partículas. Con respecto a la glicoproteína Env, se han presentado evidencias que indican que el CD de esta proteína sería el dominio que mediaría la asociación de Env con Gag. En efecto, mutaciones en el CD de la proteína Env de HIV-1 afectan la incorporación de Env a viriones (Dubay *et al.*, 1992b; Freed & Martin 1996; Yu *et al.*, 1993). Sin embargo, otros grupos de investigación han mostrado que proteínas Env con CDs truncados son capaces de incorporarse a partículas virales (Gabuzda *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, 1992; Zingler & Littman, 1993). Dados estos resultados aparentemente conflictivos era necesario esclarecer si el CD de la proteína Env de SIV participa en el proceso de incorporación de Env a viriones.

En base a estos antecedentes, se propuso estudiar en el presente trabajo el rol que cumple el dominio citoplasmático de la subunidad TM de la glicoproteína Env de SIV en la incorporación de Env a partículas y en la infectividad viral.

Para ello, se realizó la mutagénesis dirigida del dominio citoplasmático de la subunidad TM de SIV siguiendo dos estrategias diferentes:

- por un lado, se introdujeron pequeñas deleciones internas en la secuencia del CD de TM de SIV de manera de eliminar entre 4 a 7 aminoácidos respetando el marco de lectura de la proteína;
- por otro lado, se introdujeron acortamientos progresivos de 20 residuos desde el extremo carboxilo del CD de Env de SIV, generando así glicoproteínas Env con CDs truncados.

En ambos casos, se estudió la síntesis, procesamiento, y expresión en la superficie celular de las Env mutadas. Además, se investigó la capacidad de cada proteína Env mutada de incorporarse a partículas virales así como de conferir infectividad a viriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. CÉLULAS Y VIRUS

Las líneas celulares CV-1 (de riñón de mono verde africano), Rat-2 (de embrión de rata; línea celular timidina quinasa negativa, TK⁻), 293T (de riñón humano) y MAGI-CCR5 (HeLa-CD4-CCR5/LTR- β -Gal) fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, GIBCO), y solución de antibiótico-antimicótico (GIBCO) conteniendo penicilina (100U/ml), estreptomina (100 μ g/ml) y anfotericina B (250ng/ml). El medio de crecimiento de las células MAGI-CCR5 además fue suplementado con 0,2mg/ml G418 (geneticina), 0,1mg/ml higromicina B y 1 μ g/ml puromicina (ICN Biomedicals), como se recomienda (Chackerian *et al.*, 1997). La línea celular MAGI-CCR5 fue obtenida a través del NIH Research and Reference Reagent Program, Division AIDS–National Institute of Allergy and Infectious Diseases (E.E.U.U.).

La línea celular CEMx174 (células humanas híbridas B/T, CD4⁺) fue crecida en suspensión en medio RPMI-1640 (HyClone, Perbio Science Company) suplementado con 10% SFB y antibiótico-antimicótico como se describió antes.

Para la expresión en el sistema recombinante del virus vaccinia se utilizó la cepa parental de vaccinia WR.

En los estudios realizados con SIV se utilizó el clon molecular SIVsmmPBj1.9 (Dewhurst *et al.*, 1990).

II. SUEROS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales KK60 y KK41 contra las proteínas CA (p55/p27) y TM (gp41) de SIV, respectivamente, fueron obtenidos de los Dres. Jim Stott y Karen Kent (Kent *et al.*, 1992) a través del programa MRC AIDS Directed Programme (Reino Unido). El suero inactivado de macacos infectados con SIVsmmPBj fue cedido por la Dra. P.N. Fultz, University of Alabama at Birmingham (UAB, E.E.U.U.).

III. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para las reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa Elongase (con actividad 3'→5' correctora, *Elongase Enzyme Mix*, Invitrogen). La amplificación se realizó en buffer de reacción con una concentración final de Mg²⁺ de 1,6 mM, en un volumen de reacción final de 100µl.

El esquema de temperaturas utilizado para las reacciones de amplificación fue el siguiente: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización completa del templado y luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 60 segundos a 68°C. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico MiniCycler (MJ Research, Inc.).

Los productos de amplificación se trataron con proteinasa K (100µg/ml) durante 2 horas a 37°C y 10 minutos a 68°C para inactivar la enzima. Los fragmentos de ADN amplificados fueron luego purificados con el sistema *Wizard DNA Clean-Up* (Promega) para eliminar los oligonucleótidos, proteínas y sales residuales de la reacción de PCR.

IV. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para introducir las mutaciones específicas en el gen *env* que codifica para la glicoproteína Env de SIV se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica con algunas modificaciones (Perrin & Gilliland, 1990; González *et al.*, 1993). Brevemente, el método consta de dos etapas: en la primera reacción de PCR se utiliza un oligonucleótido sentido que hibrida en el extremo 5' del gen a mutagenizar y un oligonucleótido antisentido mutagénico que contiene la mutación deseada. En esta primera etapa, se utiliza una relación molar entre los oligonucleótidos sentido:antisentido de 100:1. De esta manera, se obtiene mayoritariamente un producto de ADN simple cadena sentido portador de la mutación. En la segunda etapa de la reacción, se utiliza como iniciadores para la amplificación por PCR el producto simple cadena obtenido en la primera etapa junto con un oligonucleótido antisentido que hibrida en el extremo 3' del gen a mutar en

una relación equimolecular. Así, se obtiene un producto de ADN completo doble cadena que contiene la mutación deseada.

V. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN y los ADN plasmídicos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8% o 1%, según la muestra, en buffer TBE (90mM Tris-Borato, 2mM EDTA [pH8,3]). Las electroforesis se realizaron aplicando una corriente constante de 80mA. Las bandas de ADN se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0,5µg/ml) durante 10 minutos y transiluminación con luz ultravioleta.

VI. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES

Las proteínas virales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel concentrador contenía 3,9% acrilamida:bisacrilamida (29,2:0,8), 0,1% SDS en buffer Tris-HCl (pH6,8), mientras que el gel separador contenía 8% o 10% (dependiendo del tipo de muestra) acrilamida:bisacrilamida (29,2:0,8), 0,1% SDS en buffer Tris-HCl (pH8,8). A todas las muestras se les agregó buffer de siembra Laemmli (62mM Tris-HCl [pH6,8]; 2% SDS; 50mM DTT; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; Laemmli, 1970), y se hirvieron por 3 minutos. Las corridas electroforéticas se realizaron con buffer de corrida (25mM Tris base; 250mM glicina; 0,1% SDS) aplicando una corriente constante de 35mA.

VII. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN fueron purificados a partir de geles de agarosa por el método de Tautz y Renz (Tautz & Renz, 1983). Una vez realizada la

electroforesis y la tinción con bromuro de etidio del gel de agarosa, las bandas de ADN a purificar se cortaron del gel y se incubaron en una solución de acetato de sodio 0,3M (pH7,0) durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, cada sección de agarosa se colocó en un tubo eppendorf de 500 μ l con un orificio en el fondo del mismo, cubierto con lana de vidrio (pretratada con silano). Luego de congelar los tubos con el fragmento de agarosa, cada uno se introdujo dentro de un tubo de 1,5ml de capacidad y los dispositivos se centrifugaron por 10 minutos a 16.000xg. La agarosa quedó retenida por la lana de vidrio mientras que las soluciones conteniendo el ADN pasaron hacia el tubo de mayor tamaño. Los fragmentos así recuperados se precipitaron con 2 o 3 volúmenes de etanol absoluto, según se tratara de fragmentos ADN doble o simple cadena, a -20°C durante toda la noche. Los fragmentos de ADN se sedimentaron por centrifugación por 15 minutos a 16.000xg y finalmente, se resuspendieron en agua bidestilada o buffer TE.

VIII. BACTERIAS COMPETENTES

Para el clonado de las construcciones realizadas en esta tesis se emplearon bacterias competentes *E.coli* **DH5 α** [F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*] (Invitrogen) y **Stbl2** [F⁻ *mcrA Δ (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ ⁻ Δ (lac-proAB)*] (Invitrogen) que fueron preparadas de acuerdo al protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983) y mantenidas a -80°C hasta su utilización.

IX. LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando 0,5 unidades de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen) en buffer de ligación (50mM Tris-HCl [pH7,6], 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP y 5% [p/v]

polietilén glicol [PEG] 8000) en un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se incubaron a 16°C o 25 °C durante toda la noche.

Las mezclas de ligación correspondientes a las construcciones realizadas sobre el gen *env* de SIV se utilizaron para transformar bacterias competentes *E.coli* **DH5 α** . Las bacterias competentes se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en hielo por 10 minutos. Se agregaron luego 50 μ l de estas bacterias a cada mezcla de ligación (10 μ l) y se mantuvieron por 30 minutos en hielo. Luego, las mezclas se incubaron a 42°C por 90 segundos y 2 minutos en hielo. Para su recuperación, las bacterias se incubaron con 250 μ l de medio S.O.C. (Invitrogen) por 60 minutos a 37°C. Las mezclas de transformación se plaquearon en medio LB-1,5% agar conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina para la selección de las bacterias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C por más de 16 horas.

La cepa *E. coli* **Stbl2** ha sido desarrollada para la propagación de secuencias retrovirales que presentan una alta inestabilidad en bacterias. Por lo tanto, esta cepa bacteriana fue utilizada para las transformaciones con el ADN proviral salvaje SIVsmmPBj1.9 (PBjWT) y todos los mutantes derivados del mismo. El protocolo de transformación fue similar al descrito arriba con ciertas modificaciones. Luego de mantener las bacterias con cada mezcla de ligación por 30 minutos en hielo, se incubaron por 90 segundos a 42°C. La recuperación de las células se realizó durante 90 minutos a 30°C, la temperatura óptima de crecimiento de esta cepa bacteriana. Finalmente, las mezclas de transformación se plaquero en medio LB-1,5% agar-100 μ g/ml ampicilina y las placas se incubaron toda la noche a 30°C.

X. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Las minipreparaciones de ADN plasmídico de los clones provenientes de cada transformación se realizaron siguiendo una modificación del método de lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981). Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 16.000xg por 3 minutos y se resuspendieron en 100 μ l de buffer TELT (50mM Tris-HCl [pH7,5]; 62,5mM EDTA; 0,4% Tritón X-100;

2,5M LiCl; 100 μ g/ml lisozima). Las suspensiones se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se hirvieron por 1 minuto y se enfriaron por 2 minutos en hielo. Luego de centrifugar los lisados por 15 minutos a 16.000xg, se recuperó el sobrenadante y el ADN plasmídico se precipitó agregando un volumen de isopropanol. Luego de 20 minutos a temperatura ambiente, el ADN plasmídico se recuperó por centrifugación y se resuspendió en agua bidestilada. El ADN plasmídico de cada clon fue analizado por digestión con enzimas de restricción para verificar la presencia de los insertos.

El ADN plasmídico utilizado para secuenciación y para los ensayos de transfección se purificó utilizando el sistema *Wizard Plus SV Minipreps Kit* (Promega) basado en el método de la lisis alcalina y purificación a través de columnas de sílica.

XI. SECUENCIACIÓN DE ADN

Para verificar la presencia de las mutaciones introducidas y la ausencia de mutaciones no deseadas, los genes *env* mutados se secuenciaron por la técnica de Sanger (Sanger *et al*, 1977). El ADN plasmídico (2 μ g) fue desnaturalizado por incubación a temperatura ambiente en una solución conteniendo 0,2M NaOH/0,2mM EDTA durante 10 minutos. El ADN plasmídico desnaturalizado se precipitó con etanol absoluto, se sedimentó por centrifugación, y se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada libre de nucleasas. Para la reacción de hibridización, al ADN plasmídico se le agregaron 2 μ l del buffer de hibridización (300mM Tris-HCl [pH7,5], 100mM MgCl₂, 160mM DTT) y 2 μ l de una solución conteniendo 3 μ M del oligonucleótido iniciador correspondiente. Las mezclas se incubaron por 5 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C y 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó una mezcla conteniendo 1,6 unidades de ADN polimerasa del fago T7 modificada (*Sequenase*, Amersham Biosciences), 1 μ l de [α -³⁵S] dATP (1000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l, EasyTide, NEN) y 3 μ l de una solución

conteniendo una mezcla de dGTP, dCTP y dTTP (1,5 μ M de cada uno). La reacción se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la elongación de las cadenas. Finalmente, se prepararon tubos conteniendo 2,5 μ l de una solución terminadora específica para cada nucleótido (80 μ M en cada desoxinucleótido y 8 μ M en el didesoxinucleótido correspondiente). A cada tubo con solución terminadora se le agregó 4,5 μ l de la mezcla de elongación y los tubos se incubaron por 5 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 5 μ l de una solución conteniendo 95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilén-cianolFF. Las reacciones de secuencia se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 5%-8M urea en buffer TBE y posterior autorradiografía por exposición del gel con películas X-Omat AR-5 (Eastman Kodak).

XII. EXPRESIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ENV MUTANTES EN EL SISTEMA RECOMBINANTE DEL VIRUS VACCINIA

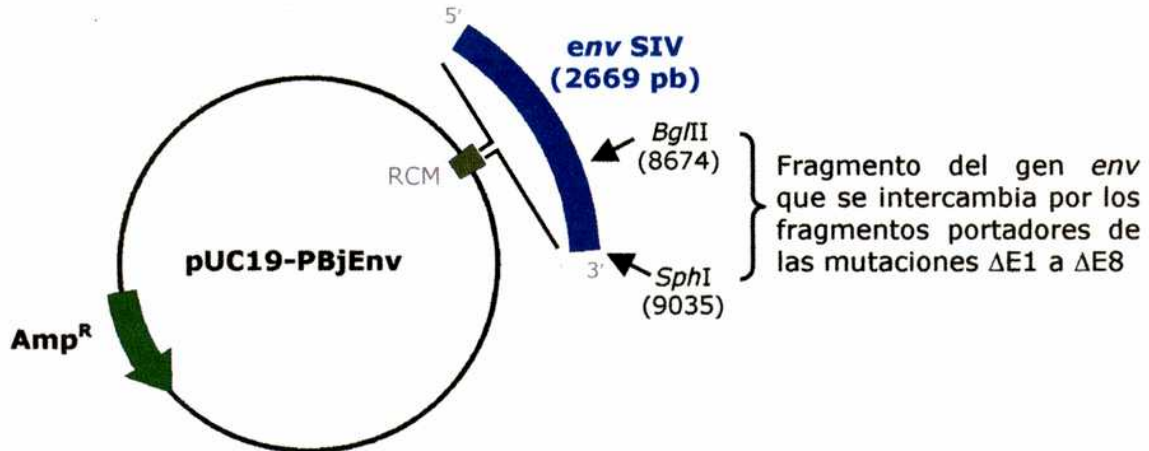
1. CONSTRUCCIÓN DEL CLON DEL GEN ENV DE SIV

La construcción del clon del gen *env* de SIV en el vector pUC19 (pUC19-PBjEnv) fue realizada previamente en nuestro laboratorio (González *et al.*, 1994). El gen *env* (correspondiente a los nucleótidos 6366 al 9035) del clon molecular SIVsmmPBj14 1.9 se amplificó por la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos específicos llevando sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* y *SphI*. Este plásmido fue utilizado como templado en todas las reacciones de mutagénesis dirigida del gen *env* de SIV.

2. CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES ENV PORTADORES DE MUTACIONES $\Delta E1$ A $\Delta E8$

Las mutaciones se introdujeron por la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica descrita antes, en un fragmento de restricción *BglII/SphI* de 360 pares de bases correspondientes a los últimos 120

aminoácidos de la proteína TM. La región *Bgl*II/*Sph*I del gen *env* salvaje comprendida entre los nucleótidos 8674 al 9035 fue reemplazada en el plásmido pUC19-PBjEnv por cada uno de los fragmentos llevando las mutaciones $\Delta E1$ a $\Delta E8$.



Construcción de los genes *env* mutados $\Delta E1$ a $\Delta E8$. El gen *env* de SIVsmmPBj1.9 (2669 pb) fue clonado en los sitios *Kpn*I/*Sph*I de pUC19. Se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción *Bgl*II y *Sph*I (posiciones 8674 y 9035, respectivamente, en el genoma de PBj1.9). RCM: región de clonado múltiple de pUC19; Amp^R: gen de la resistencia a ampicilina utilizado para la selección de las bacterias transformadas. El esquema no se encuentra en escala.

Los oligonucleótidos utilizados en la **primera reacción** de PCR para introducir las deleciones $\Delta E1$ a $\Delta E8$ fueron:

Oligonucleótido sentido:

5'-ATC CAG ACG GGC CAG GAA CTG C-3' correspondiente a los nucleótidos (nt) 8604 a 8625 de SIVsmmPBj1.9

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido:

$\Delta E1$: Δ (RDWLL) residuos 798 a 802 de Env de SIVsmmPBj1.9

5'-TTG GCA GTT CCT ▲ GCA ACT GCT GAA TAG-3' (nt 8783 a 8742)

$\Delta E2$: Δ (LQPV) residuos 808 a 811

5'-TGA GAG GCT CTG GAG ▲ GGT TTG GCA GTT CCT-3' (nt 8813 a 8772)

ΔE3: Δ(TLQR) residuos 818 a 821

5'-GAT GAC TTC ACG GGC ▲ CCT TGA GAG GCT CTG-3' (nt 8843 a 8802)

ΔE4: Δ(YLQYGW) residuos 832 a 837

5'-TC TTG GAG GTA ACG ▲ GGC TAT CTG AAC TCT-3' (nt 8890 a 8844)

ΔE5: Δ(EAAQAWW) residuos 842 a 848

5'-CTC TCG TAC AAA TTT ▲ TTG GAG GTA ACG CCA-3' (nt 8924 a 8874)

ΔE6: Δ(ETLASAW) residuos 853 a 859

5'-CTC CCA TAA GTC TCT ▲ TCG TAC AAA TTT CCA-3' (nt 8957 a 8907)

ΔE7: Δ(DLWETL) residuos 861 a 866

5'-TCC AAC CCT TCC ▲ TCT CCA CGC GCT TGC-3' (nt 8975 a 8931)

ΔE8: Δ(GRGIL) residuos 870 a 874

5'-GCG TCT TGG GAT TGC ▲ AAC CCT TCC CAG AGT-3' (nt 9002 a 8958)

Se indica con el símbolo ▲ la ubicación de la deleción introducida por el oligonucleótido en cada caso. Para cada mutante se indican entre paréntesis los residuos aminoacídicos delecionados (en código de una letra) y a la derecha, la posición nucleotídica en el genoma de SIVsmmPBj1.9 donde hidrida cada oligonucleótido.

Para la **segunda etapa** de la mutagénesis se utilizaron los siguientes iniciadores:

Cebador sentido mutagénico:

producto simple cadena de la primera etapa de mutagénesis purificado a partir de gel de agarosa por el método de Tautz y Renz antes descrito (sección VII).

Oligonucleótido antisentido:

SphI Stop

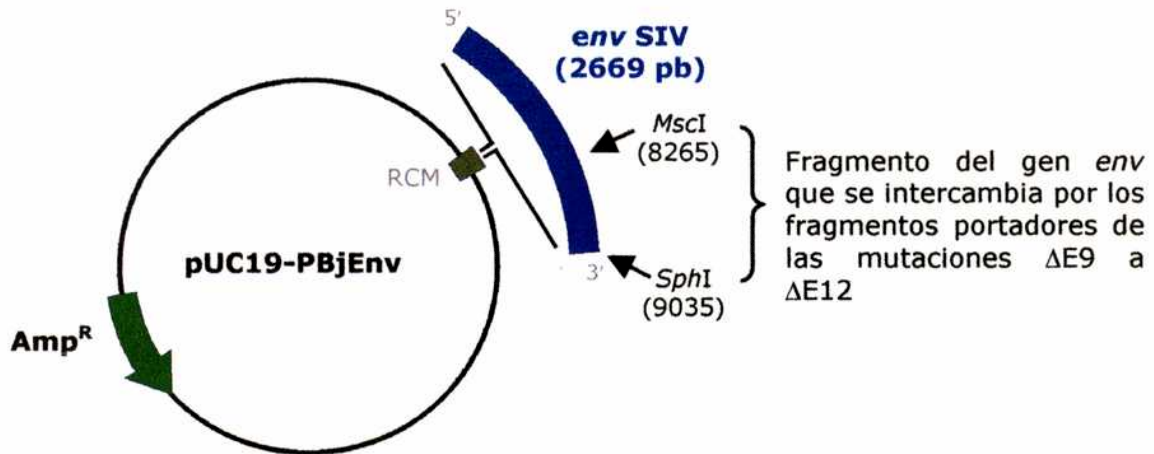
5'-GAG GCA TGC **TCA** CAA GAG AGT GAG CTC AAG-3' (nt 9035 a 9015)

En la secuencia del oligonucleótido antisentido, se indica la secuencia consenso para el corte por la enzima de restricción *SphI* que introduce el

oligonucleótido y en **negrita**, la secuencia correspondiente al codón de terminación del gen *env* de SIV.

3. CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES *ENV* PORTADORES DE LAS MUTACIONES $\Delta E9$ A $\Delta E12$

La estrategia de mutagénesis utilizada para generar esta serie de mutaciones fue similar a la descrita anteriormente para las mutaciones $\Delta E1$ a $\Delta E8$. A diferencia de las anteriores, las mutaciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$ se introdujeron en un fragmento de restricción *MscI/SphI* de 770 pares de bases correspondiente a los nucleótidos 8265 al 9035 en el gen *env* de SIV.



Construcción de los genes *env* mutados $\Delta E9$ a $\Delta E12$. Se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción *MscI* y *SphI*. El fragmento de restricción *MscI/SphI* en el plásmido pUC19-PBjEnv fue intercambiado por cada uno de los fragmentos correspondientes llevando las mutaciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$.

Los oligonucleótidos utilizados para la **primera etapa** de la reacción de mutagénesis fueron los siguientes:

Oligonucleótido sentido:

5'-AC CTA AAG GAT CAG GCG CAG CT-3'

(nt 8191 a 8212)

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido:

ΔE9: Δ(GGGRG) residuos 763 a 767 de Env de SIVsmmPBj1.9

5'-G CCA AGG CCA AGA TCT GTT GCC ▲ GTC TCC TTC TTC TCC-3'
(nt 8688 a 8637)

ΔE10: Δ(WPW) residuos 772 a 774

5'-G AAT ATA TTC TAT CTG ▲ AGA TCT GTT GCC ACC-3' (nt 8703 a 8664)

ΔE11: Δ(YIHFL) residuos 778 a 782

5'-AT CAA CTG GCG GAT ▲ TTC TAT CTG CCA AGG-3' (nt 8725 a 8682)

ΔE12: Δ(LLTWLF) residuos 789 a 794

5'-C TCT GCA ACT GCT ▲ GCG TAT CAA CTG GCG-3' (nt 8760 a 8714)

Para la **segunda etapa** se utilizaron los siguientes iniciadores:

Cebador sentido mutagénico:

producto simple cadena de la primera etapa de mutagénesis.

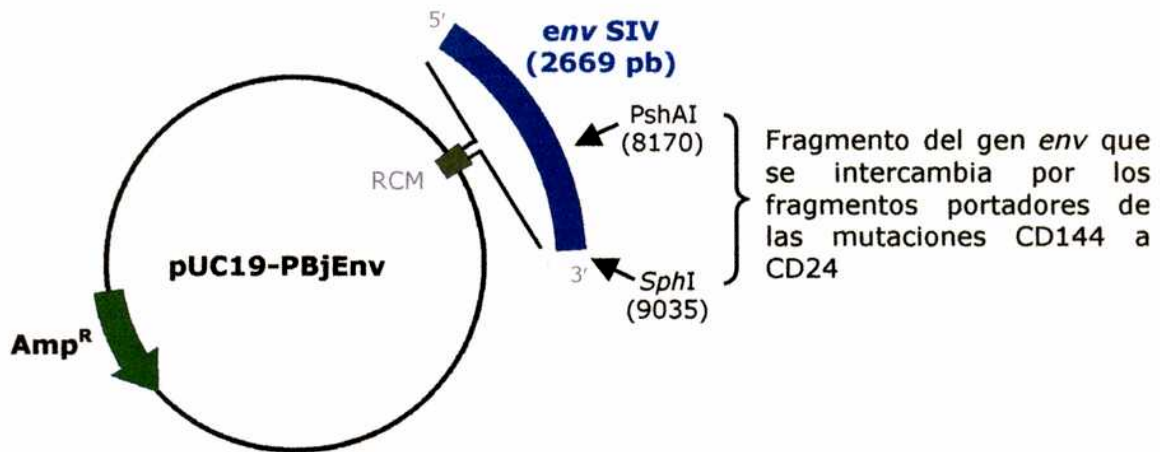
Oligonucleótido antisentido:

5'-GAG GCA TGC *SphI* Stop **TCA** CAA GAG AGT GAG CTC AAG-3' (nt 9035 a 9015)

En la secuencia del oligonucleótido antisentido, se indica la secuencia consenso para el corte por la enzima de restricción *SphI* que lleva el oligonucleótido y en negrita, la secuencia correspondiente al codón de terminación del gen *env* de SIV.

4. CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES ENV PORTADORES DE LAS MUTACIONES CD144 A CD24

Las mutaciones CD144 a CD24 introducen un codón de terminación en el dominio citoplasmático de la proteína TM de SIV de forma tal de generar proteínas Env con CDs progresivamente más cortos. Para introducir estas mutaciones en el gen *env* de SIV, la mutagénesis se realizó sobre un fragmento de restricción *PshAI/SphI* (nucleótidos 8170 a 9035) correspondiente a los últimos 865 pares de bases del gen *env* de SIV.



Construcción de los genes de *env* mutados CD144 a CD24. El fragmento de restricción *Psh*AI y *Sph*I en el plásmido pUC19-PBjEnv fue reemplazado por cada uno de los fragmentos portadores de las mutaciones CD144 a CD24.

Para generar los genes *env* mutados CD144 a CD24, se realizaron reacciones de PCR en las que se utilizó como templado el plásmido pUC19-PBjEnv, un oligonucleótido sentido que hibrida hacia el extremo 5' del sitio *Psh*AI en el gen *env* y cada uno de los oligonucleótidos antisentido mutagénicos cuyas secuencias codifican para codones de terminación, según se indica a continuación:

Oligonucleótido sentido:

5'-GA GCT AAG AAC CTC CAG ACT A-3' (nt 8149 a 8169)

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido:

CD144: introduce un codón de terminación en la posición 870 de la proteína Env de SIV

5'-TAT GCA TGC **TCA** AAC CCT TCC CAG-3' (nt 8984 a 8961)

CD124: introduce un codón sin sentido en la posición 850 de Env

5'-CTC GCA TGC **TCA** TTT CCA CCA CGC CTG-3' (nt 8924 a 8898)

CD104: introduce un codón sin sentido en la posición 830 de Env

5'-TAG GCA TGC **TCA** CTG AAC TCT GAT G-3' (nt 8864 a 8840)

CD84: introduce un codón sin sentido en la posición 810 de Env

5'-CTG GCA TGC **TCA** CTG GAG GGT TTG-3' (nt 8804 a 8781)

CD64: introduce un codón sin sentido en la posición 790 de Env

5'-TAG GCA TGC **CTA** GAG GCG TAT CAA C-3' (nt 8744 a 8720)

CD44: introduce un codón sin sentido en la posición 770 de Env

5'-AGG GCA TGC **TCA** GTT GCC ACC TCT GCC-3' (nt 8684 a 8658)

CD24: introduce un codón sin sentido en la posición 750 de Env

5'-CAG GCA TGC **TCA** CGT CTG GAT AGG GA-3' (nt 8624 a 8599)

Se indica con una línea la secuencia consenso para el corte por la enzima de restricción *SphI*. Resaltado en negrita se indica además el codón de terminación introducido por el oligonucleótido correspondiente.

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron digeridos con las enzimas *PshAI/SphI*, y utilizados para sustituir el fragmento *PshAI/SphI* del gen *env* salvaje en el plásmido pUC19-PBjEnv (ver sección siguiente).

5. CLONADO Y SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES DE GENES *ENV* MUTADOS

Para reemplazar en el plásmido pUC19-PBjEnv (que lleva el gen *env* salvaje de SIV) un fragmento de restricción por otro que contiene la mutación deseada se procedió de la siguiente forma. Primero, se digirió el pUC19-PBjEnv con las enzimas de restricción adecuadas y se purificó el pUC19-PBjEnv digerido a partir de un gel de agarosa para separarlo del fragmento de restricción del gen *env* generado (ver mapas en las secciones XII.2; XII.3; XII.4). Los fragmentos portadores de las mutaciones (*BglII/SphI* para las mutaciones de *env* $\Delta E1$ a $\Delta E8$, *MscI/SphI* para las deleciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$ y *PshAI/SphI* para las mutaciones CD144 a CD24) fueron ligados al pUC19-PBjEnv digerido y purificado (pUC19-PBjEnv *BglII/SphI* o pUC19-PBjEnv *MscI/SphI* o pUC19-PBjEnv *PshAI/SphI*, respectivamente) y las mezclas de ligación fueron utilizadas para transformar bacterias competentes *E.coli* DH5 α . Los recombinantes se identificaron por purificación del ADN

plasmídico, digestión por enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

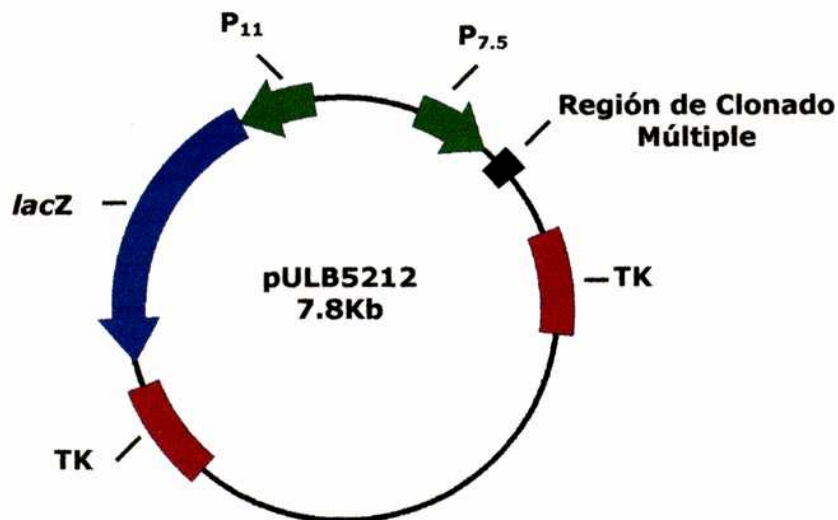
Todas las construcciones en el gen *env* de SIV fueron secuenciadas por el método de Sanger (sección XI) para confirmar la presencia de las mutaciones específicas introducidas y la ausencia de mutaciones no deseadas.

6. SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL VIRUS VACCINIA RECOMBINANTE

Para la obtención de los virus vaccinia recombinantes que dirigen la expresión de los genes *env* mutados, los insertos clonados originalmente en pUC19-PBjEnv se subclonaron en el vector de transferencia de vaccinia pULB5212 derivado del plásmido pSC11 (Chakrabarti *et al.*, 1985). Los genes *env* mutados (fragmento de 2669 pares de bases) clonados en pUC19 fueron liberados por digestión con las enzimas *KpnI* y *SphI* y clonados en el vector pULB5212 en la región de clonado múltiple. De esta forma, los genes *env* quedaron bajo el control del promotor P_{7.5} del virus vaccinia. El plásmido contiene además el gen que codifica para la enzima β-galactosidasa (*lacZ*) bajo el control del promotor P₁₁ de vaccinia. Toda esta construcción está flanqueada en el vector pULB5212 por secuencias del gen de la timidina quinasa (TK) del virus vaccinia.

La estrategia para la obtención de virus vaccinia recombinantes consistió en infectar células con el virus vaccinia salvaje para luego transfectarlas con cada gen *env* mutado clonado en el vector de transferencia pULB5212. Dentro de la célula ocurre la recombinación homóloga entre la secuencia de la TK presente en el genoma del virus y las secuencias TK que flanquean al gen *env* en el vector. Así, los virus resultantes de la recombinación exhiben un fenotipo TK negativo (TK⁻) y pueden ser seleccionados por su resistencia a la 5-bromo-desoxiuridina (BrdU), ya que es un agente antiviral activo sólo luego de ser fosforilado por la TK. Por lo tanto, los virus recombinantes son capaces de escapar a la acción de la BrdU. Por otro lado, los virus vaccinia recombinantes expresan la β-galactosidasa, lo que permite la visualización

directa de las placas de lisis por tinción con el agente cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido).



Esquema del vector de transferencia pULB5212. Se indica la posición de los promotores de vaccinia P₁₁ y P_{7.5}, del gen *lacZ* y de la región de clonado múltiple. Flanqueando todas estas regiones se encuentran las secuencias correspondientes al gen de la timidina quinasa (TK) del virus vaccinia.

6A. OBTENCIÓN DE VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

Para la generación de virus vaccinia recombinantes, las células CV-1 fueron tripsinizadas y sembradas en botellas de cultivo de 25cm² de superficie 24 horas antes de la transfección y se incubaron a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. Las células fueron infectadas con el virus vaccinia parental (cepa WR) a una multiplicidad de infección (moi) de 0,05. Dos horas después de la infección, el inóculo viral fue removido y la monocapa se lavó dos veces con medio DMEM. Cada monocapa de células infectadas fue transfectada con 3 μ g de cada ADN plasmídico, utilizando liposomas catiónicos (LipofectAMINE 2000, Invitrogen). Luego de incubar las células infectadas durante 5 horas a 37°C en atmósfera gaseada, se reemplazó el medio de transfección por DMEM-6% SFB. A las 48 horas, las células fueron lisadas por tres ciclos de congelamiento/descongelamiento y estos lisados

fueron utilizados como stocks virales para la selección posterior de los virus recombinantes (sección XII.6B).

6B. SELECCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

La progenie viral resultante de cada infección-transfección fue seleccionada en células Rat-2 (TK⁻), en presencia de BrdU como agente de selección y X-Gal como sustrato cromogénico de la enzima β -galactosidasa. Las células Rat-2 crecidas en placas de 60mm de diámetro fueron infectadas con diluciones de cada lisado. Una hora postinfección, se retiró el inóculo y se agregó una capa de 1% agarosa de bajo punto de fusión preparada en DMEM-2% SFB conteniendo 25 μ g/ml de BrdU. Luego de 48 horas de incubación, se agregó una segunda capa de agarosa con 300 μ g/ml de X-Gal. Al cabo de 16 horas, los virus recombinantes fueron seleccionados por su capacidad de formar placas de lisis azules. Las placas de lisis de los virus vaccinia recombinantes se recogieron en 1ml de medio DMEM y fueron sometidas a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento.

La amplificación de los virus seleccionados a partir de las placas de lisis se realizó infectando monocapas de células Rat-2 crecidas en placas de 24 pocillos en presencia de 25 μ g/ml BrdU.

Los virus recombinantes obtenidos en cada caso fueron sometidos a dos ciclos adicionales de selección y amplificación en células Rat-2 en presencia de BrdU para asegurar la homogeneidad de la población viral.

7. MARCACIÓN METABÓLICA DE CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

Para la expresión de proteínas por el sistema recombinante del virus vaccinia, monocapas confluentes de células CV-1 (crecidas en placas de 35mm de diámetro) fueron infectadas con los clones recombinantes de vaccinia a una moi de 1-5 unidades formadoras de placa (UFP) por célula. Luego de 1 hora de adsorción viral, se retiraron los inóculos y las células fueron incubadas en medio DMEM-7% SFB por 14 horas. Para la marcación

metabólica, las células se ayunaron por incubación en medio deficiente en metionina y cisteína suplementado con 3% SFB. Luego de 1 hora de ayuno, se agregó medio deficiente conteniendo [³⁵S]metionina/cisteína (100 μ Ci/ml de medio, >1000 Ci/mmol, EasyTag Express, NEN) y se incubaron las células en presencia del precursor radioactivo durante 5 horas. Luego de la marcación metabólica, las células se lavaron dos veces con solución salina de buffer fosfato (PBS) frío y se recogieron por centrifugación a baja velocidad. Finalmente, las células fueron lisadas en 100 μ l de buffer de lisis TNN (50mM Tris-HCl [pH8], 150mM NaCl, 1% NP-40) conteniendo inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina) durante 15 minutos. Los lisados se centrifugaron a 16.000xg durante 5 minutos para remover la fracción nuclear y los restos celulares, y se guardaron a -80°C.

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR INMUNOPRECIPITACIÓN

Muestras de los lisados celulares marcados metabólicamente con [³⁵S]metionina/cisteína fueron inmunoprecipitadas con 1 μ l de suero de monos macacos infectados con SIV en un volumen final de 100 μ l. La reacción se realizó en buffer de inmunoprecipitación (100mM Tris-HCl [pH8], 250mM NaCl, 1% NP-40, 1% BSA, 1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina) durante 1 hora a 4°C. Se agregaron 40 μ l de Proteína A-Sepharosa CL4B 10% (p/v) equilibrada en buffer de inmunoprecipitación, y luego la suspensión se incubó durante 1 hora a 4°C con agitación por inversión. Posteriormente, los inmunocomplejos se recuperaron por lavado con una solución conteniendo 100mM Tris-HCl (pH8); 500mM LiCl; 1,5% NP-40; 0,1% BSA; 1mM PMSF; 10 μ g/ml aprotinina y se disociaron por calentamiento a 95°C durante 4 minutos en buffer Laemmli. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida-0,1% SDS. La visualización de las proteínas marcadas radioactivamente fue realizada por autorradiografía con películas BioMax MS-1 (Eastman Kodak) junto con pantalla intensificadora (BioMax Transcreen-LE, Eastman Kodak).

La cuantificación de las bandas de proteínas marcadas radioactivamente se realizó a partir de las autorradiografías con el programa GelWorks 1D del sistema de documentación y análisis UVP GDS8000 (UltraViolet Products, Ltd.)

9. ENSAYOS DE COEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SEUDOVIRALES

Para el estudio de la incorporación de Env a partículas, se coinfectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que expresa el precursor Gag-PR de SIV (González *et al.*, 1993) junto con el virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína Env salvaje o cada uno de los virus vaccinia que expresan las Env mutadas, siguiendo el protocolo descrito en la sección XII.7. A las 24 horas postinfección, los sobrenadantes de cultivo fueron clarificados por filtración a través de membranas de 0,45µm de poro. Los medios clarificados se sometieron a ultracentrifugación a 100.000xg a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v) en PBS durante 90 minutos a 4°C. El pellet, correspondiente a la fracción particulada del medio extracelular, fue resuspendido en buffer Laemmli. Por otro lado, las células infectadas se lisaron en buffer TNN para analizar los niveles de expresión intracelulares de las proteínas recombinantes.

10. ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Los lisados celulares y la fracción particulada obtenidos por coexpresión de las proteínas Gag y Env de SIV utilizando el sistema de vaccinia se resolvieron en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (HyBond ECL, Amersham Biosciences). La transferencia se realizó utilizando el sistema de transferencia *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en un buffer conteniendo 25mM Tris base, 192mM glicina, 20% metanol a un voltage constante de 15 volts durante 90 minutos.

Para la detección de las proteínas de SIV se utilizó el sistema *ECL Western blotting Analysis System* (Amersham Biosciences). Las membranas fueron

bloqueadas por incubación con 5% BSA en PBS-0,01% Tween 20 (PBST) durante 2 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Luego de una serie de lavados con PBST, las membranas se incubaron con una solución de PBST-3% BSA conteniendo una dilución 1:500 de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína TM o CA de SIV, según el ensayo. Las membranas se incubaron con la solución de anticuerpo durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se agregó luego una solución PBST-3% BSA conteniendo una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal anti-ratón conjugado a peroxidasa (Amersham Biosciences). Luego de lavar las membranas, se incubaron con el reactivo de detección comercial por 1 minuto. La reacción de quimioluminiscencia resultante se detectó por exposición de la membrana a películas Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) durante diferentes períodos de tiempo.

11. BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

Células CV-1 crecidas en placas de 60mm de diámetro fueron infectadas a una moi de 5 con cada uno de los virus vaccinia recombinantes dirigiendo la expresión de Env salvaje o mutada. Luego de 14 horas, las células infectadas se sometieron a un pulso de marcación metabólica de 20 minutos con [³⁵S]metionina/cisteína (250 μ Ci/ml, EasyTag Express, NEN). Las células se lavaron con medio DMEM completo y se incubaron por un período adicional de 2 horas. Posteriormente, se realizó la reacción de biotinilación de proteínas de superficie. Para ello, las células fueron lavadas con PBS frío 3 veces y se incubaron a 4°C durante 30 minutos con el reactivo de biotinilación al cual la membrana plasmática es impermeable (éster biotinamidocaproato de N-hidroxisuccinamida en 40mM buffer bicarbonato de sodio [pH8,6]; *ECL Protein Biotinylation System*, Amersham Biosciences). Las células fueron luego lisadas en 100 μ l de buffer TNN. Las proteínas virales se inmunoprecipitaron con un suero de macacos infectados con SIV, se resolvieron en un gel 8% poliacrilamida-0,1% SDS y se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa. Para la detección de las proteínas biotiniladas, se incubó la membrana con estreptavidina conjugada a peroxidasa acoplada

a reacción de quimioluminiscencia. La reacción fue visualizada por exposición de la membrana a películas Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Se realizaron exposiciones que variaron entre 10 y 60 segundos.

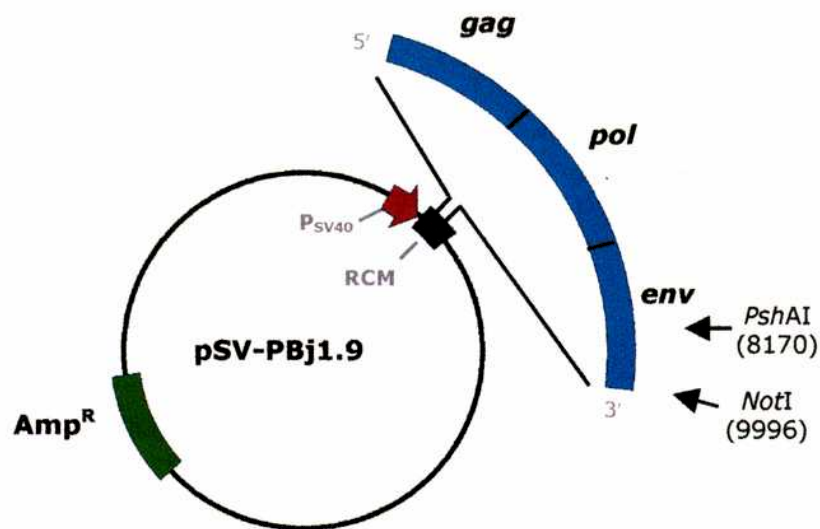
Para analizar los niveles de expresión intracelular de las glicoproteínas Env salvaje y mutadas, se dejó decaer la reacción de quimioluminiscencia por un período de 3 días para luego detectar las proteínas marcadas metabólicamente con [³⁵S]metionina/cisteína por exposición de la membrana a películas BioMax MS-1 con pantalla intensificadora. En este caso, las exposiciones fueron de aproximadamente 16 horas.

Como control de este ensayo, se incluyeron células expresando la glicoproteína VP7 de rotavirus. Esta proteína es integral de retículo endoplasmático y por lo tanto, no se detecta en la superficie celular. El procesamiento de las células fue similar al descrito antes. La expresión de la proteína VP7 de rotavirus se realizó utilizando un virus vaccinia recombinante con el que cuenta nuestro laboratorio.

XIII. MUTAGÉNESIS DEL GEN *ENV* EN EL CONTEXTO DEL VIRUS SIV

1. CONSTRUCCIÓN DE ADN PROVIRALES PORTADORES DE GENES *ENV* CON LAS MUTACIONES Δ ENV832-837, CD44 o CD24

Para introducir las mutaciones Δ Env832-837, CD44 o CD24 en el ADN proviral de SIV se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica antes descrita. Como templado, se utilizó el plásmido pSV-PBj1.9 que contiene el ADN proviral del clon molecular 1.9 SIVsmmPBj14 (Dewhurst *et al.*, 1990) clonado en el vector pSV.SPORT1 (Invitrogen). El ADN proviral completo contiene 9996 pares de bases. La mutagénesis se realizó sobre un fragmento de restricción *PshAI/NotI* que corresponde a los últimos 1826 pares de bases del genoma viral (el sitio de reconocimiento de la enzima *NotI* se encuentra en la región de clonado múltiple del plásmido pSV.SPORT1).



Esquema del plásmido pSV-PBj1.9. Este plásmido lleva, entre los sitios *SaI* y *NotI* de la región de clonado múltiple (RCM), el ADN proviral completo del clon molecular 1.9 SIVsmmPBj14. Se indica la posición del sitio de corte de las enzimas *PshAI* y *NotI* utilizadas para el intercambio del fragmento *PshAI/NotI* del gen *env* salvaje por cada fragmento portador de las mutaciones Δ Env832-837, CD44 o CD24. P_{SV40}: promotor temprano del virus SV40.

Los oligonucleótidos utilizados en la **primera etapa** de las reacciones de mutagénesis para generar los mutantes Δ Env832-837, CD44 y CD24 fueron los siguientes:

Oligonucleótido sentido:

5'-GAG CTA AGA ACC TCC AGA CTA-3' (nt 8149 a 8169)

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido:

Para **PBj-CD44**:

5'-G CCA AGG CCA AGA **TTA** GTT GCC ACC T-3' (nt 8688 a 8663)

Para **PBj-CD24**:

5'-GG CAG TTC CTG **CTA** CGT CTG GAT AG-3' (nt 8626 a 8602)

Para **Δ Env832-837**:

5'-TC TTG GAG GTA ACG **▲** GGC TAT CTG AAC TCT-3' (nt 8890 a 8844)

Se indica con el símbolo ▲ la localización de la delección introducida en el caso del mutante Δ Env832-837 y se resalta en negrita la secuencia para los codones de terminación introducidos por los oligonucleótidos CD44 y CD24.

Para la **segunda etapa** de la reacción de mutagénesis se utilizaron los siguientes iniciadores:

Cebador sentido:

producto simple cadena de la primera etapa de mutagénesis.

Oligonucleótido antisentido: hibrida en una región del vector pSV.SPORT1 localizada en dirección 3' de la región de clonado múltiple.

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Todos los productos de PCR llevando las mutaciones deseadas fueron digeridos por *PshAI* y *NotI* e intercambiados por el fragmento *PshAI/NotI* en el plásmido pSV-PBj1.9 utilizando una estrategia similar a la descrita en la sección XII.5. Se verificó la presencia de las mutaciones deseadas por secuenciación.

2. CONSTRUCCIÓN DE ADN PROVIRALES PORTADORES DE GENES *ENV* CON LAS MUTACIONES Δ ENV832-837/W774STOP Y Δ ENV832-837/Y778STOP

El templado que se utilizó para realizar esta mutagénesis fue el ADN proviral portador de la mutación Δ Env832-837 (pSV-PBj Δ Env832-837) cuya construcción se describió antes en la sección XIII.1. La mutagénesis se realizó sobre el fragmento de restricción *PshAI/NotI* del ADN proviral.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la **primera etapa** de mutagénesis fueron los siguientes:

Oligonucleótido sentido

5'-GAG CTA AGA ACC TCC AGA CTA-3'

(nt 8149 a 8169)

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido

W774Stop: introduce un codón de terminación en la posición 774 de Env de SIV

5'-A TTC TAT CTG **CTA** AGG CCA AGA-3' (nt 8697 a 8674)

Y778Stop: introduce un codón de terminación en la posición 778 de Env de SIV

5'-CAG GAA ATG AAT **TTA** TTC TAT CTG-3' (nt 8711 a 8688)

Para la **segunda etapa** de la reacción de mutagénesis se utilizaron:

Cebador sentido:

producto simple cadena obtenido en la primer etapa de mutagénesis.

Oligonucleótido antisentido: hibrida en una región en posición 3' de la región de clonado múltiple del vector pSV.SPORT1:

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Los productos de PCR llevando las mutaciones Δ Env832-837/W774Stop o Δ Env832-837/Y778Stop fueron digeridos con las enzimas de restricción *PshAI* y *NotI* e intercambiados por el fragmento *PshAI/NotI* en el plásmido pSV-PBj1.9. Se verificó la presencia de las mutaciones por secuenciación.

XIV. TRANSFECCIÓN Y GENERACIÓN DE STOCKS VIRALES

Células 293T crecidas en placas de 35mm de diámetro fueron transfectadas con 5 μ g de ADN proviral utilizando liposomas catiónicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen) según las condiciones recomendadas por el fabricante. A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes fueron recogidos y filtrados a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μ m de poro para eliminar restos celulares. Estos sobrenadantes fueron mantenidos a -80°C y utilizados como stocks virales.

XV. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TRANSCRIPTASA REVERSA

Para este ensayo se utilizó el sistema *Reverse Transcriptase Assay* (Roche Applied Science) que permite la cuantificación de la actividad de la transcriptasa reversa (TR) de diferentes retrovirus incluido SIV. La actividad de TR es utilizada en retrovirología como medida de replicación y título viral.

Para la reacción, se tomaron 500 μ l de sobrenadante del medio de cultivo proveniente de la transfección de las células 293T con los ADN provirales, y se inactivaron agregando 25 μ l de 10% Tritón X-100. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos en hielo. Se agregaron luego 250 μ l de 30% polietilenglicol (PEG Mr 6000-8000) en 1,2M NaCl en condiciones libres de ARNasas y se incubó la muestra toda la noche a 4°C para sedimentar las partículas virales. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 40 μ l de buffer de lisis (50mM Tris-HCl [pH7,8]; 80mM KCl; 2,5mM DTT; 0,75mM EDTA; 0,5% Tritón X-100). Luego de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se realizaron diluciones convenientes de cada muestra. Para cada reacción de TR, se utilizaron 20 μ l de una mezcla que contiene el templado poliA-oligo(dT)₁₅ y nucleótidos conjugados a digoxigenina y a biotina. Se incubó la reacción por 2 horas a 37°C. De esta manera, el ADN que se obtiene como producto de la actividad de la TR viral, se halla marcado con biotina y digoxigenina. La mezcla de reacción se pasó a un pocillo cuya superficie está recubierta con estreptavidina, lo que permite así la captura del producto sintetizado por interacción biotina-estreptavidina. Luego de incubar los pocillos 1 hora a 37°C, se lavaron exhaustivamente y se agregaron 200 μ l de una solución conteniendo un anticuerpo policlonal dirigido contra digoxigenina y conjugado a peroxidasa (200 mU/ml). Luego de 1 hora de incubación a 37°C, se realizaron lavados y se agregaron 200 μ l de una solución conteniendo el sustrato cromogénico ABTS (2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico]). La peroxidasa cataliza el clivaje del sustrato ABTS obteniéndose un producto coloreado, que se cuantificó por absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Para determinar la masa de TR presente en una muestra particular, se realizó en paralelo una curva de calibración con cantidades conocidas de TR (TR recombinante de HIV-1, provista con los reactivos comerciales). La reacción se realizó como se describió arriba. Los datos obtenidos para esta curva se graficaron como absorbancia *versus* concentración de TR y se calculó la mejor recta que se ajusta a los datos por el método de cuadrados mínimos. Finalmente, la concentración de TR de cada muestra incógnita se determinó utilizando la curva de calibración obtenida con la TR de HIV-1.

XVI. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ADN PROVIRALES MUTADOS

1. LISADOS CELULARES Y PURIFICACIÓN DE VIRIONES

Células 293T crecidas en placas de 60mm de diámetro fueron transfectadas con 10 μ g de ADN proviral como se describió arriba. A las 48 horas, el sobrenadante de cada transfección fue filtrado a través de una membrana de 0,45 μ m de poro. El sobrenadante clarificado se sometió a ultracentrifugación a 100.000xg a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v) en PBS durante 90 minutos a 4°C. El pellet correspondiente a los viriones liberados al medio extracelular fue resuspendido en buffer Laemmli.

Se prepararon además lisados celulares. Para esto, las células 293T transfectadas se lavaron 2 veces con PBS frío, se recogieron en 1ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular se lisó en buffer RIPA (50mM Tris-HCl [pH8]; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,1% SDS; 0,5% desoxicolato de sodio [DOC]) durante 20 minutos en hielo. Luego de centrifugar por 3 minutos para eliminar restos celulares, el sobrenadante se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

2. ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Muestras de los lisados celulares y de los viriones purificados como se describió en la sección XVI.1 se resolvieron en geles 10% poliacrilamida-

0,1% SDS y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con diluciones de los anticuerpos contra las proteínas CA o TM de SIV como se describió en la sección XII.10. Las proteínas virales fueron detectadas por quimioluminiscencia y exposición a películas Hyperfilm ECL como se describe en la sección XII.10.

XVII. ENSAYOS DE *TRANS*-COMPLEMENTACIÓN Y DE INFECTIVIDAD EN CÉLULAS MAGI-CCR5

El ensayo de *trans*-complementación (Kimpton & Emerman, 1992) consiste en complementar un provirus defectivo en el gen *env* con una proteína Env, cuyas propiedades biológicas se desean ensayar, provista en *trans*. Para ello, se cotransfectan células 293T con un ADN proviral *env* junto con plásmidos portadores de genes *env* salvaje o mutados. Así, se obtienen partículas virales que son utilizadas para ensayar su capacidad infectiva en células susceptibles. Dado que el genoma que llevan los viriones es defectivo, no pueden dirigir la formación de una segunda progenie viral infectiva.

Para este ensayo se utilizó como provirus defectivo el ADN proviral SIVmac239 *env* (cedido por F. Kirchhoff, Universitätsklinikum, Ulm, Alemania; Kirchhoff *et al.*, 1997) y genes *env* salvaje o mutados subclonados en el vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus. Se cotransfectaron células 293T crecidas en placas de 60mm de diámetro con 3 μ g del ADN proviral SIVmac239 *env* junto con 3 μ g de plásmido llevando el gen *env* salvaje o mutado. A las 48 horas postransfección, se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo conteniendo los viriones formados y se filtraron a través de una membrana de 0,45 μ m de poro para eliminar restos celulares.

El nivel de viriones producidos en cada transfección se determinó midiendo la actividad de TR en una alícuota de los sobrenadantes como se describió en la sección XV.

Sobrenadantes de transfección conteniendo cantidades equivalentes de TR fueron utilizados para infectar células MAGI-CCR5 (HeLa-CD4-CCR5/LTR- β -

Gal) crecidas en placas de 24 pocillos (aproximadamente 4×10^4 células totales en cada pocillo). El inóculo viral se dejó adsorber durante 2-3 horas, para luego removerlo y agregar 1 ml de DMEM-10%SFB. Las células MAGI-CCR5 poseen incorporado en su genoma el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor retroviral LTR. Este promotor se activa por acción de la proteína viral Tat que resulta de la expresión del genoma viral. Dos días postinfección, las células se fijaron con una solución PBS-1% formaldehído-0,2% glutaraldehído a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células azules se visualizaron luego de incubarlas durante dos horas a 37°C con una solución conteniendo 4 mM $K_4Fe(CN)_6$; 4 mM $K_3Fe(CN)_6$; 2 mM $MgCl_2$; 0,4 mg/ml X-Gal en PBS. La infectividad de los viriones resultantes de cada cotransfección SIV *env*/*env* mutado se determinó contando al microscopio el número de células azules en cada pocillo y refiriendo el resultado al número de células azules obtenido para los viriones llevando la Env salvaje. Se realizaron por lo menos 3 ensayos independientes de *trans*-complementación e infectividad en las células MAGI-CCR5.

Para determinar la infectividad de los viriones que resultan de transfectar células 293T con los ADN provirales mutados en el gen *env* (secciones XIII y XIV), se infectaron células MAGI-CCR5 con los sobrenadantes de cultivo, y se visualizaron y cuantificaron las células azules como se describió arriba.

XVIII. CINÉTICA DE REPLICACIÓN VIRAL EN CÉLULAS CEMx174

1. INFECCIÓN Y CURVA DE REPLICACIÓN

Sobrenadantes de transfección de células 293T con los ADN provirales pSV-PBj1.9, pSV-PBj Δ Env832-837, pSV-PBj Δ Env832-837/W774Stop y pSV-PBj Δ Env832-837/Y778Stop, previamente normalizados por actividad de TR, se utilizaron para infectar la línea celular linfoide CEMx174. Para ello, 10^6 células se lavaron dos veces con medio RPMI (HyClone, Perbio Science Company) y se infectaron con cada stock viral en un volumen final de 600 μ l. Luego de una incubación de 2 horas, se retiró el inóculo y las células se

lavarón tres veces con PBS. Las células infectadas se incubaron en 4ml de RPMI-10% SFB a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. Cada 2 o 3 días, una fracción del cultivo (2ml) se filtró a través de una membrana de 0,45µm de poro, y el filtrado se guardó a -80°C hasta finalizar el experimento. El resto del cultivo se diluyó al medio por agregado de 2ml de RPMI-10% SFB para continuar con el ensayo de replicación viral.

2. CINÉTICA DE REPLICACIÓN DE POBLACIONES REVERTANTES

Los sobrenadantes de cultivo tomados en el punto de máxima actividad de TR de las poblaciones virales revertantes obtenidas al propagar el virus mutante PBjΔEnv832-837 en células CEMx174 (sección XVIII.1), se utilizaron para infectar cultivos frescos de células CEMx174. Cada tres días, se guardaron tanto muestras de los sobrenadantes de cultivo como de las células infectadas. Para ello, se tomaron 2ml de cultivo de células infectadas (10⁶ células) y se centrifugaron a 1500xg durante 5 minutos. Tanto el sobrenadante como el pellet de células se guardaron a -80°C hasta el final del experimento.

XIX. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES VIRALES REVERTANTES

1. PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS CEMx174 INFECTADAS

La purificación del ADN genómico se realizó a partir de 10⁶ células CEMx174 infectadas con las poblaciones virales revertantes. Las células se lisaron en 200µl de una solución conteniendo 10mM Tris-HCl (pH8); 10mM EDTA; 0,5% SDS y 20µg/ml ARNasa. Después de 30 minutos a 37°C, se agregó 100µg/ml de proteinasa K para luego incubar 2 horas a 50°C. Se realizaron dos extracciones con fenol (equilibrado con 0,5M Tris-HCl [pH8]/alcohol isoamílico) y se precipitó el ADN genómico agregando medio volumen de acetato de amonio 7,5M y dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN se

recuperó por centrifugación a 16.000xg durante 20 minutos, se lavó con etanol 70%, y se resuspendió en 10µl de buffer TE (pH8). La integridad del ADN recuperado se analizó en un gel 0,75% de agarosa.

2. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES PARA EL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE ENV Y LA MA DE SIV

El ADN genómico obtenido de las células infectadas con las poblaciones virales revertantes fue utilizado como templado para la amplificación por PCR de las regiones codificantes para el CD de Env y la MA como se indica a continuación:

2A. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE PARA EL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE ENV

Se amplificó un fragmento de 592 pares de bases que codifica para el CD de la proteína Env de SIV. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en la reacción fueron:

Oligonucleótido sentido

5'-**P**-GGT GTA CTG ATA GTT CTA GGA G-3' (nt 8475 a 8496)

La **P** indica la fosforilación del oligonucleótido en el extremo 5'.

Oligonucleótido antisentido

*Hind*III
5'-TCA AAG CTT GAC CCT CAC AAT ATT TCT G-3' (nt 9068 a 9040)

Este oligonucleótido posee la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind*III para facilitar el clonado de los fragmentos.

Las condiciones de amplificación fueron similares a las descritas en la sección III. El esquema de amplificación fue el siguiente: 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 60 segundos a 68°C.

Los fragmentos obtenidos por amplificación se trataron con proteinasa K y se digirieron con la enzima de restricción *HindIII*. Luego de su purificación a partir de gel de agarosa, se ligaron a pUC19 digerido por las enzimas *SmaI/HindIII* y las mezclas de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes DH5 α . Los clones del CD de Env en pUC19 de cada población viral revertante fueron secuenciados por el método de Sanger como se describe en la sección XI.

2B. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA MA

Para el análisis de la secuencia de la proteína MA de SIV en las poblaciones virales revertantes, se amplificó un fragmento de 640 pares de bases. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Oligonucleótido sentido

5'-CTA GCA GGT TGG CGC CCG AAC AG-3' (nt 589 a 608)

Oligonucleótido antisentido

HindIII
5'-G GAA GCT TTA ATT GCC ACC TA-3' (nt 1267 a 1246)

Los fragmentos obtenidos se trataron con la enzima polinucleótido quinasa del bacteriófago T4 (Promega). Brevemente, luego de calentar a 70°C por 5 minutos, se agregó 0,5 μ l de la enzima y se incubó por 30 minutos a 37°C. La enzima se inactivó por incubación a 65°C durante 20 minutos. Finalmente, el fragmento se digirió por *HindIII* y se ligó al vector pUC19-*SmaI/HindIII*. Con las mezclas de ligación se transformaron bacterias competentes DH5 α .

Los clones de la MA derivados de cada población viral revertante fueron secuenciados por la técnica de Sanger.

XX. ENSAYO DE FUSOGENICIDAD

Este ensayo permite analizar la capacidad de la glicoproteína viral Env de mediar la fusión de membranas celulares.

Para este ensayo, se utilizaron construcciones derivadas del ADN proviral en las cuales los genes *gag* y *pol* fueron removidos por digestión con enzimas de restricción, sin afectar los marcos de lectura de los genes *env*, *tat* y *rev*. Las construcciones pSV-PBj1.9, pSV-PBjΔEnv832-837, pSV-PBjΔEnv832-837/W774Stop y pSV-PBjΔEnv832-837/Y778Stop fueron digeridas exhaustivamente con las enzimas de restricción *SpeI* y *DraIII*. Esta digestión elimina 2674 pares de bases entre los nucleótidos 1214 en el gen *gag* y 3888 en el gen *pol* del ADN proviral. Los fragmentos de ADN correspondientes a pSV-PBj1.9 $\Delta_{nt}1214-3888$, PBjΔEnv832-837/ $\Delta_{nt}1214-3888$, PBjΔEnv832-837/W774Stop/ $\Delta_{nt}1214-3888$ y PBjΔEnv832-837/Y778Stop/ $\Delta_{nt}1214-3888$, fueron purificados a partir de gel, tratados con ADN polimerasa del fago T4 (para generar extremos romos), religados y utilizados para transformar bacterias Stbl2.

Para los ensayos de fusogenicidad, se transfectaron células 293T, crecidas en placas de cultivo de 35mm de diámetro, con 4 μ g de las construcciones arriba descritas que dirigen la expresión de Tat, Rev y cada una de las proteínas Env. A las 48 horas postransfección, se disgregó la monocapa de células 293T y las células transfectadas se agregaron sobre una monocapa de células MAGI-CCR5 en proporción 1:10. Luego de una incubación de 18-24 horas a 37°C en atmósfera conteniendo 5% CO₂, las células se fijaron y tiñeron con X-Gal como se describió en la sección XVII.

La capacidad fusogénica de cada glicoproteína Env se cuantificó de dos formas. Por un lado, se determinó para cada muestra el número de sincicios por campo al microscopio de contraste de fase (considerando sincicios a las células con 5 o más núcleos). Por otro lado, se contó el número de núcleos en 20 sincicios elegidos al azar. Ambas medidas fueron luego comparadas con las obtenidas con la construcción que dirige la expresión de la glicoproteína Env salvaje.

XXI. BUFFERS Y SOLUCIONES

1. PARA ADN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Buffer TBE:

90mM Tris-borato
2mM EDTA (pH8,3)

Buffer TE:

10mM Tris-HCl (pH8)
1mM EDTA

2. PARA CRECIMIENTO DE BACTERIAS

Medio LB:

1% peptona (p/v)
0,5% extracto de levadura (p/v)
1% NaCl (p/v)

Medio LB-agar:

medio LB
1,5% agar (p/v)

S.O.C.:

2% triptona
0,5% extracto de levadura
10mM NaCl
2,5mM KCl
10mM MgCl₂
10mM MgSO₄
20mM glucosa

3. MINIPREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO: LISIS POR CALOR

TELT:

50mM Tris-HCl (pH7,5)
62,5mM EDTA
0,4% Tritón X-100
2,5M LiCl
100µg/ml lisozima

4. SECUENCIACIÓN**Solución desnaturalizante (10x)**

2M NaOH
2mM EDTA

Buffer de hibridización

300mM Tris-HCl (pH7,5)
100mM MgCl₂
160mM DTT

Soluciones terminadoras ddGTP, ddATP, ddTTP o ddCTP

80μM dGTP
80μM dATP
80μM dTTP
80μM dCTP
8μM ddGTP o ddATP o ddTTP o ddCTP, según corresponda

Solución de detención de la reacción

95% formamida
20mM EDTA
0,05% azul de bromofenol
0,05% xilén-cianolFF

5. INMUNOPRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**Buffer PBS**

0,02% KCl
0,02% KH₂PO₄
0,8% NaCl
0,14% Na₂HPO₄

Buffer TNN

50mM Tris-HCl (pH8)
150mM NaCl
1% NP-40
1mM PMSF
10μg/ml aprotinina

Buffer de electroforesis

25mM Tris base
250mM glicina
0,1% SDS

Buffer Laemmli

62mM Tris-HCl (pH 6,8)
2% SDS
50mM DTT
10% glicerol
0,01% azul de bromofenol

Buffer de inmunoprecipitación

100mM Tris-HCl (pH8)
 250mM NaCl
 1% NP-40
 1% BSA
 1mM PMSF
 10µg/ml aprotinina

Buffer de lavado de inmuno-complejos

100mM Tris-HCl (pH8)
 500mM LiCl
 1,5% NP-40
 0,1% BSA
 1mM PMSF
 10µg/ml aprotinina

Buffer RIPA

50mM Tris-HCl (pH8)
 150mM NaCl
 1% NP-40
 0,1% SDS
 0,5% DOC

6. ENSAYO DE WESTERN BLOT

Buffer de transferencia

25mM Tris Base
 192mM glicina
 20% metanol

Solución de bloqueo

PBS
 0,01% Tween 20
 5% BSA

Solución de lavado (PBST)

PBS
 0,01% Tween 20

7. ENSAYO MAGI-CCR5

Solución de fijación

0,2% glutaraldehído

1% formaldehído

PBS

Solución de tinción

4mM $K_4Fe(CN)_6$

4mM $K_3Fe(CN)_6$

2mM $MgCl_2$

0,4mg/ml X-Gal

PBS

RESULTADOS CAPÍTULO I

I.1. CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV PORTADORAS DE DELECCIONES INTERNAS

Para investigar el rol que cumple el CD de la subunidad TM en la incorporación de Env a las partículas virales y en la infectividad, se generaron y caracterizaron proteínas Env mutantes de SIVsmmPBj1.9. En una primera etapa, se introdujeron pequeñas deleciones internas en la secuencia del CD de TM de manera de eliminar entre 4 a 7 aminoácidos respetando el marco de lectura de la proteína. Las construcciones realizadas involucraron los siguientes residuos de Env: 798 a 802 ($\Delta E1$), 808 a 811 ($\Delta E2$), 818 a 821 ($\Delta E3$), 832 a 837 ($\Delta E4$), 842 a 848 ($\Delta E5$), 853 a 859 ($\Delta E6$), 861 a 866 ($\Delta E7$), y 870 a 874 ($\Delta E8$). Algunas de estas deleciones afectan las α -hélices del CD de TM que han sido predichas en base a su estructura primaria (Figura I.1; Venable *et al.*, 1989). Para construir estos ocho genes *env* mutados se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica como se describe en Materiales y Métodos (ver sección XII). Estas construcciones se utilizaron para generar virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas Env mutantes.

I.2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ENV MUTANTES $\Delta E1$ A $\Delta E8$ UTILIZANDO EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL VIRUS VACCINIA

Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión de la glicoproteína Env de SIV utilizando el sistema de vaccinia resulta en la síntesis de una proteína recombinante cuyo procesamiento, glicosilación y funciones biológicas son similares a las de la glicoproteína Env nativa que resulta de la expresión del genoma de SIV (González *et al.*, 1994). Por otro lado, la utilización del sistema de vaccinia para expresar proteínas Env llevando mutaciones en su CD presenta ventajas respecto de analizar estos mutantes en el contexto del genoma de SIV. En efecto, dado que la región codificante para el CD de Env de SIV se superpone con el segundo exón de los genes *tat* y *rev*, el fenotipo de ciertos mutantes de Env no podría ser analizado ya que se interferiría con la función de las proteínas Tat y Rev.

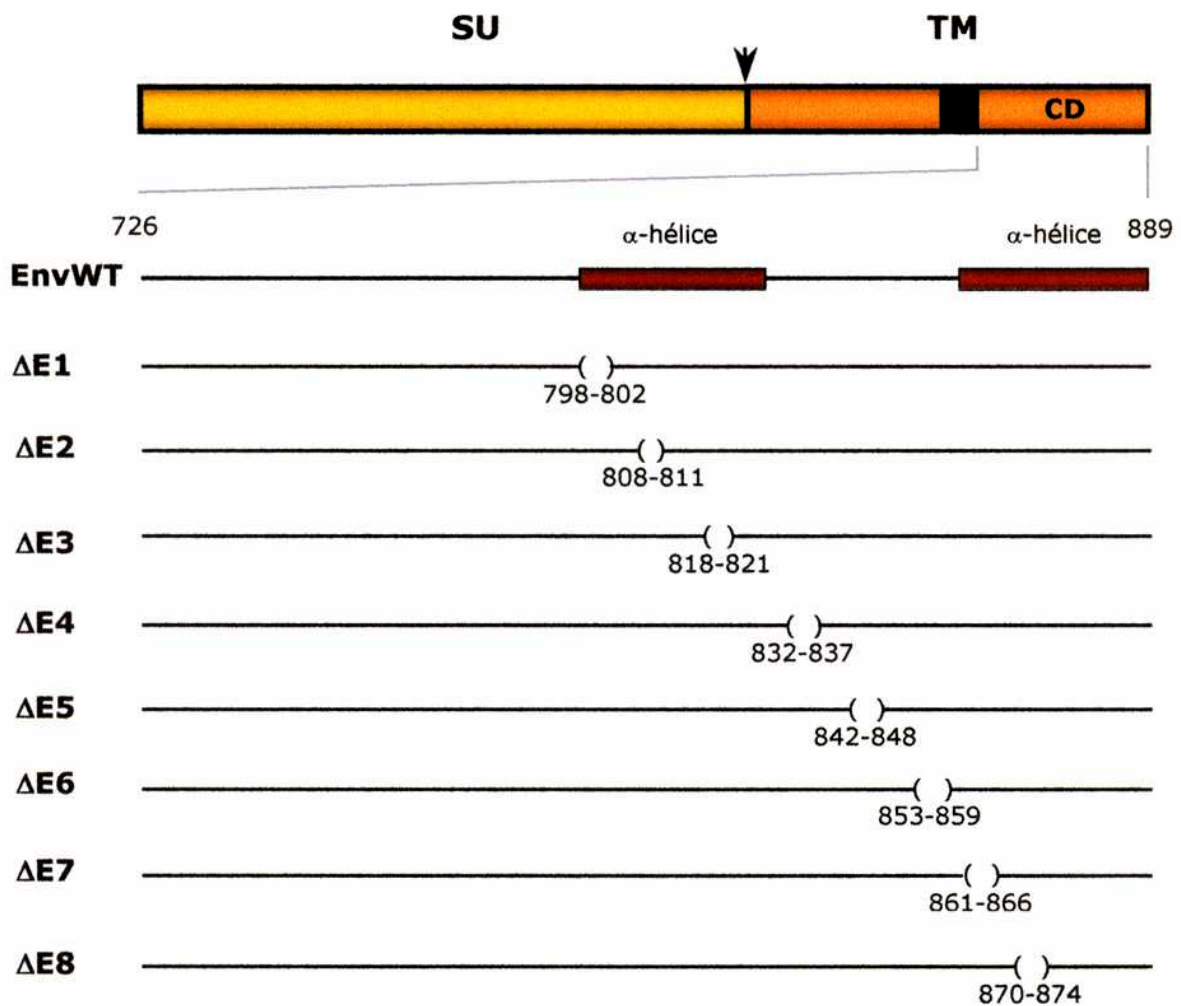


Figura I.1. Esquema de las deleciones internas $\Delta E1$ a $\Delta E8$ introducidas en el dominio citoplasmático de la proteína TM de SIV.

Se indican en la proteína Env las subunidades SU y TM. El sitio de clivaje entre ambas subunidades se señala con una flecha. El dominio de anclaje a membrana de la proteína TM se representa con un recuadro negro. En el CD de la proteína TM (residuos 726 a 889 de Env) se indican las dos α -hélices (residuos 798 a 827 y 861 a 889) predichas en base a la secuencia aminoacídica de esta región. Los números debajo de cada paréntesis indican los residuos removidos en cada deleción. La numeración utilizada corresponde a la proteína Env de SIVsmmPBj1.9.

Con el propósito de investigar si las deleciones internas en el CD de TM tenían algún efecto sobre la síntesis y procesamiento de la proteína Env, los virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas Env $\Delta E1$ a $\Delta E8$ fueron utilizados para infectar células CV-1. En paralelo, se infectaron células con el virus vaccinia que expresa la proteína Env salvaje de SIV (González *et al.*, 1994) utilizada como control. A las 12 horas postinfección, las células se marcaron metabólicamente con una mezcla de [^{35}S]metionina/cisteína durante 4 horas y se lisaron en buffer TNN como se describe en Materiales y Métodos (sección XII.7). Los niveles de expresión intracelular de cada proteína Env se analizaron por inmunoprecipitación utilizando un suero de monos macacos infectados con SIV. Todas las proteínas Env mutadas ($\Delta E1$ a $\Delta E8$) se expresaron y procesaron en forma similar a la proteína Env salvaje (WT), indicando que estos procesos no fueron afectados por las mutaciones introducidas (Figura I.2). En efecto, en todas las muestras se detectaron niveles similares de las bandas correspondientes al precursor Env (Pre) de 160 kDa y a la subunidad SU de 120 kDa.

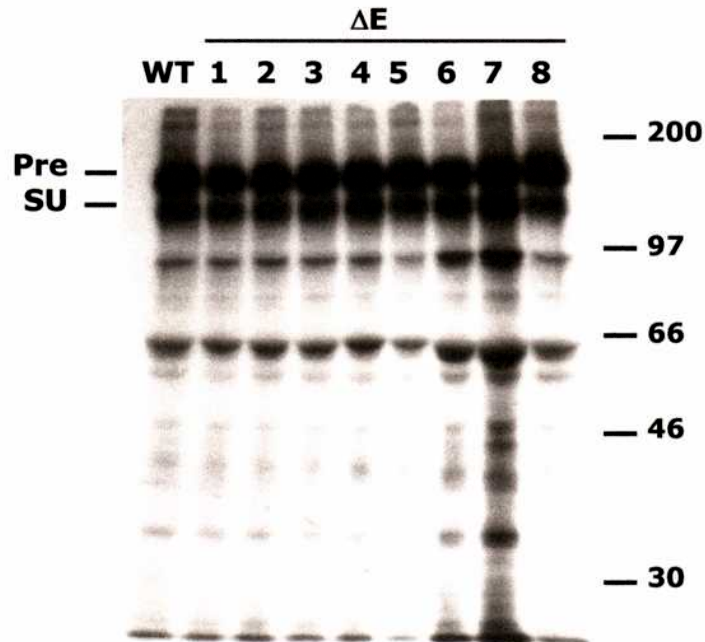


Figura I.2. Expresión de las proteínas Env portadoras de deleciones internas en el dominio citoplasmático de TM. Células CV-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes que expresan las glicoproteínas Env salvaje (WT) o mutantes ($\Delta E1$ a $\Delta E8$) fueron marcadas metabólicamente con [^{35}S]metionina/cisteína. Los lisados celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación y análisis por electroforesis en gel 8% poliacrilamida-0,1% SDS. A la izquierda, se indican las bandas correspondientes al precursor Env (**Pre**) y a la subunidad de superficie (**SU**). Las movilidades de los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican a la derecha.

I.3. EFECTO DE LAS DELECCIONES INTERNAS $\Delta E1$ A $\Delta E8$ SOBRE LA INCORPORACIÓN DE ENV A PARTÍCULAS

Para analizar si las delecciones internas $\Delta E1$ a $\Delta E8$ introducidas en el CD de TM tienen algún efecto sobre la incorporación de Env a partículas, utilizamos también el sistema de expresión del virus vaccinia recombinante. Nuestro laboratorio ha demostrado que la coexpresión del precursor Gag-Proteasa (Gag-PR) y de la proteína Env de SIV resulta en el ensamblado y liberación al medio extracelular de partículas pseudovirales que incorporan la glicoproteína viral Env (González *et al.*, 1993, 1996). Estas partículas pseudovirales son indistinguibles morfológicamente de las partículas que se observan en células infectadas con SIV (González *et al.*, 1993). Además, este sistema ha permitido al laboratorio identificar dominios funcionales de la proteína Gag de SIV (González & Affranchino, 1995, 1998; González *et al.*, 1996). Por este motivo, se decidió aprovechar este sistema para estudiar la capacidad de las proteínas Env mutantes de incorporarse a las partículas que resultan de la expresión del precursor Gag-PR de SIV.

Para este ensayo, células CV-1 fueron coinfectadas con los virus vaccinia recombinantes que expresan cada Env mutante junto con el virus vaccinia que dirige la expresión de Gag-PR. Como control, se incluyó la coexpresión de Gag-PR y de la proteína Env salvaje de SIV. A las 24 horas postinfección, las partículas virales fueron recuperadas del medio extracelular de cada coinfección por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v). Las células fueron recuperadas y lisadas en buffer TNN. Muestras de cada fracción se sometieron a electroforesis en gel 10% poliacrilamida-0,1% SDS y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para analizar el nivel de incorporación de Env a partículas se realizó un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína TM de SIV (Figura I.3, Parte A). Se decidió detectar la subunidad TM en lugar de la subunidad SU, pues esta última puede ser liberada de manera espontánea de la superficie de las células infectadas y contaminar así la fracción particulada. Cabe recordar que luego de ser procesado el precursor Env, la subunidad TM permanece como proteína integral de membrana

mientras que la SU se mantiene en la superficie celular asociada a TM sólo por uniones no covalentes.

Como muestra la Figura I.3, Parte A (Partículas), en el caso de las proteínas Env mutantes $\Delta E1$ a $\Delta E3$, los niveles de incorporación a partículas fueron similares o incluso algo superiores a los exhibidos por la Env salvaje. En cambio, las deleciones $\Delta E4$ a $\Delta E8$ inhibieron drásticamente la incorporación de Env a partículas (Figura I.3, Parte A, Partículas). En el caso de las proteínas Env $\Delta E5$ y $\Delta E6$ se observaron, en experimentos independientes, niveles bajos de incorporación pero detectables por la técnica utilizada. En cambio, los niveles de $\Delta E4$, $\Delta E7$ y $\Delta E8$ asociados a partículas siempre fueron indetectables. Este efecto inhibitorio sobre la incorporación de Env a partículas no se debe a diferencias en los niveles de expresión de las Env mutantes, ya que en los lisados celulares los niveles de las proteínas TM $\Delta E4$ a $\Delta E8$ son similares a los de la TM salvaje (Figura I.3, Parte A, Lisados).

Para descartar que las diferencias de incorporación de Env a partículas detectadas en los ensayos fueran producto de variaciones en los niveles de partículas liberadas al medio extracelular, se realizaron Western blots utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de la cápside viral CA. Como puede observarse en la Figura I.3 Parte B, tanto los niveles de Gag y CA intracelulares (Lisados) como los asociados a partículas extracelulares (Partículas) fueron similares en todas las muestras analizadas.

Estos resultados indican que las deleciones $\Delta E4$ a $\Delta E8$ en el CD de la proteína TM de SIV interfieren con la incorporación de la glicoproteína Env a partículas.

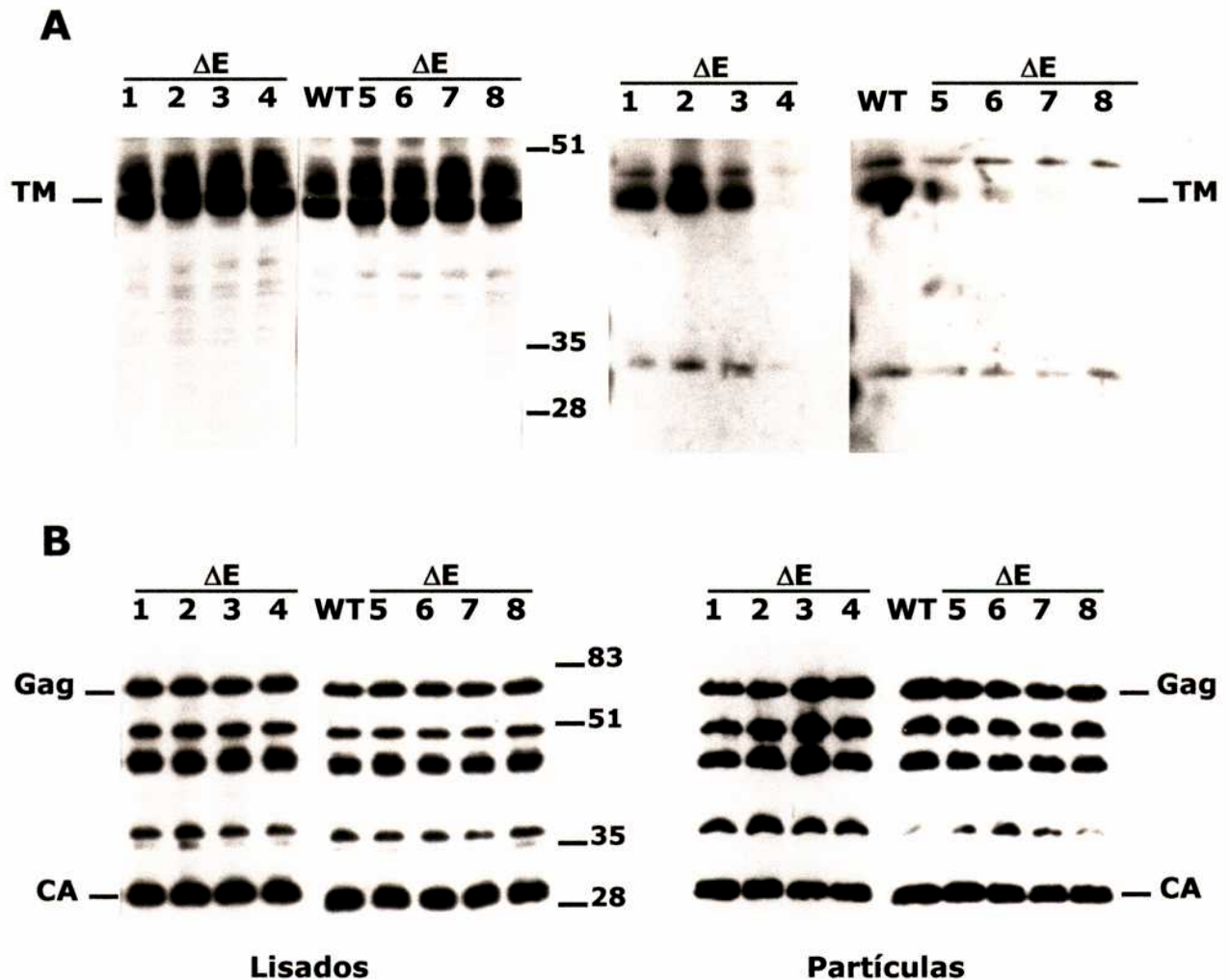


Figura I.3. Efecto sobre la incorporación de Env a partículas de las deleciones internas en el dominio citoplasmático de TM de SIV. Se coinfectaron células CV-1 con el virus vaccinia que expresa Gag-PR de SIV junto con cada uno de los virus vaccinia recombinantes que expresa una Env mutante ($\Delta E1$ a $\Delta E8$) o el que expresa la Env salvaje (WT). A las 24 horas postinfección, se purificaron por ultracentrifugación las partículas virales a partir del medio extracelular (**Partículas**). Las células se recogieron y se lisaron en buffer TNN (**Lisados**). Las proteínas virales en los lisados celulares y en la fracción particulada se detectaron por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad TM (**A**) o uno contra la proteína CA (**B**) de SIV. Se indican las posiciones de las proteínas TM, CA y del precursor Gag. Además se indican las movilidades electroforéticas de los marcadores de peso molecular (en kDa).

I.4. EXPRESIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR DE LAS GLICOPROTEÍNAS ENV PORTADORAS DE LAS DELECCIONES INTERNAS $\Delta E4$ A $\Delta E8$

Para determinar si el defecto en la incorporación a partículas exhibido por las Env mutantes $\Delta E4$ a $\Delta E8$ se debía a una expresión ineficiente de estas proteínas en la membrana plasmática, se analizaron los niveles de expresión en superficie de cada Env mutante. Para ello, se realizaron ensayos de biotinilación de las proteínas de la superficie celular como se describe en Materiales y Métodos (sección XII.11). Se infectaron células CV-1 con los virus vaccinia que expresan cada Env mutante ($\Delta E4$ a $\Delta E8$) o la Env salvaje (WT). Luego de la marcación metabólica de las células, las proteínas expresadas en la superficie celular fueron biotiniladas y posteriormente, las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares con suero de macacos infectados. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La detección de las proteínas biotiniladas se realizó por incubación de las membranas con estreptavidina conjugada a peroxidasa y posterior reacción de quimioluminiscencia. Como se observa en la Figura I.4 (Superficie), todas las proteínas Env mutantes que presentaron un fenotipo defectivo de incorporación a partículas mostraron, sin embargo, niveles de expresión en superficie comparables a los alcanzados por la Env salvaje (WT). Cabe mencionar que en la superficie celular se observan tanto la banda correspondiente al precursor Env (Pre) como la correspondiente a la subunidad SU, lo que está de acuerdo con lo observado en ensayos similares de biotinilación (Salzwedel *et al.*, 1999; Spies & Compans, 1994).

Se analizaron también los niveles de expresión intracelular de cada Env mutante detectando las proteínas marcadas radioactivamente. Todas las muestras presentaron niveles de expresión intracelular similares al alcanzado por la Env salvaje (Figura I.4, Lisados).

Como control de que las proteínas de la superficie celular son el blanco específico del ensayo de biotinilación utilizado, se incluyeron células expresando la glicoproteína VP7 de rotavirus. Esta es una proteína integral

del retículo endoplasmático y no se expresa en la superficie celular. La Figura I.4 (Panel de la derecha) muestra que la proteína VP7 no se detecta en la superficie celular por la reacción de biotina-estreptavidina (calle S), a pesar de expresarse intracelularmente en forma eficiente (Figura I.4, calle L).

Por lo tanto, el defecto de incorporación a partículas que exhiben las proteínas Env mutantes $\Delta E4$ a $\Delta E8$ no se debe a una expresión ineficiente de las mismas en la superficie celular.

I.5. EFECTO DE LAS DELECCIONES $\Delta E1$ A $\Delta E8$ SOBRE LA INFECTIVIDAD VIRAL

Para evaluar la capacidad de glicoproteínas Env de HIV o SIV de mediar la entrada de viriones a células susceptibles, se realizan ensayos de infectividad de ciclo único (Kimpton & Emerman, 1992). Este ensayo consiste en complementar en *trans* un provirus deficiente en la proteína Env por cotransfección con un plásmido que expresa una proteína Env cuyas propiedades biológicas se desean ensayar. Los viriones resultantes de la cotransfección son luego utilizados para infectar células indicadoras que permiten cuantificar el evento de entrada viral. Las células indicadoras utilizadas para SIV son las MAGI-CCR5 (HeLa-CD4-CCR5/LTR- β -Gal) que expresan en su superficie el complejo receptor-correceptor CD4/CCR5 y poseen incorporado en su genoma el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa (β -Gal) bajo el control del promotor retroviral LTR. Por lo tanto, si los viriones recuperados de cada cotransfección son capaces de entrar a estas células y replicarse, activarán la expresión de la β -Gal por acción de la proteína viral Tat sobre el promotor LTR. Así, por simple tinción *in situ* con X-Gal se pueden contar sobre la monocapa de células MAGI-CCR5 aquéllas que son azules. En la Figura I.5 se presenta un esquema ilustrativo de este ensayo.

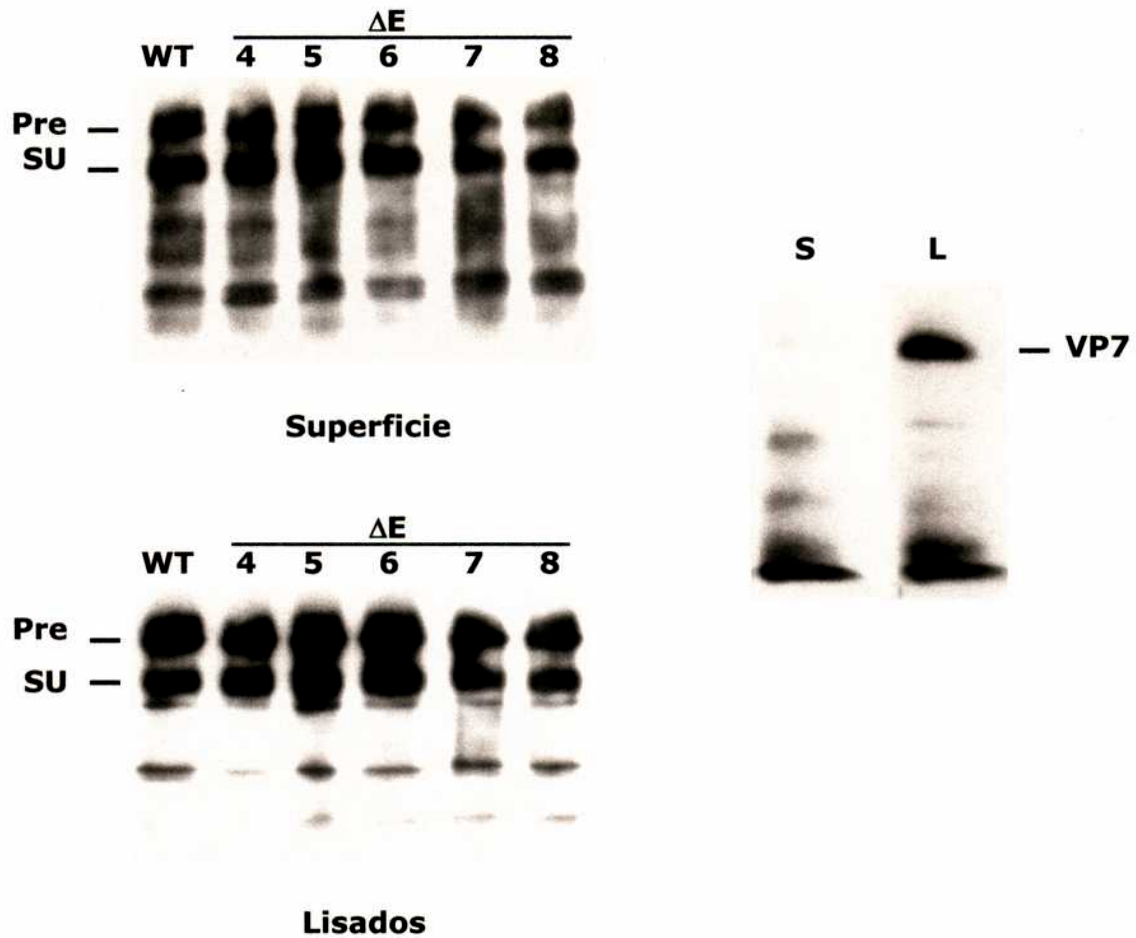


Figura I.4. Análisis de la expresión de las glicoproteínas Env $\Delta E4$ a $\Delta E8$ en la superficie celular. Células expresando $\Delta E4$ a $\Delta E8$ se marcaron metabólicamente con [^{35}S]metionina/cisteína y luego las proteínas de la superficie celular se biotinilaron como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas biotiniladas se detectaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa y posterior reacción de quimioluminiscencia (**Superficie**). El nivel de expresión intracelular de Env se detectó por autorradiografía de las proteínas marcadas con ^{35}S (**Lisados**). Como control de la reacción de biotinilación, se incluyeron células que expresan la glicoproteína VP7 de rotavirus que se localiza en retículo endoplásmico (**Panel de la derecha**). Calle S, detección de proteínas de superficie en células expresando la proteína VP7 de rotavirus. Calle L, expresión intracelular de VP7 de rotavirus.

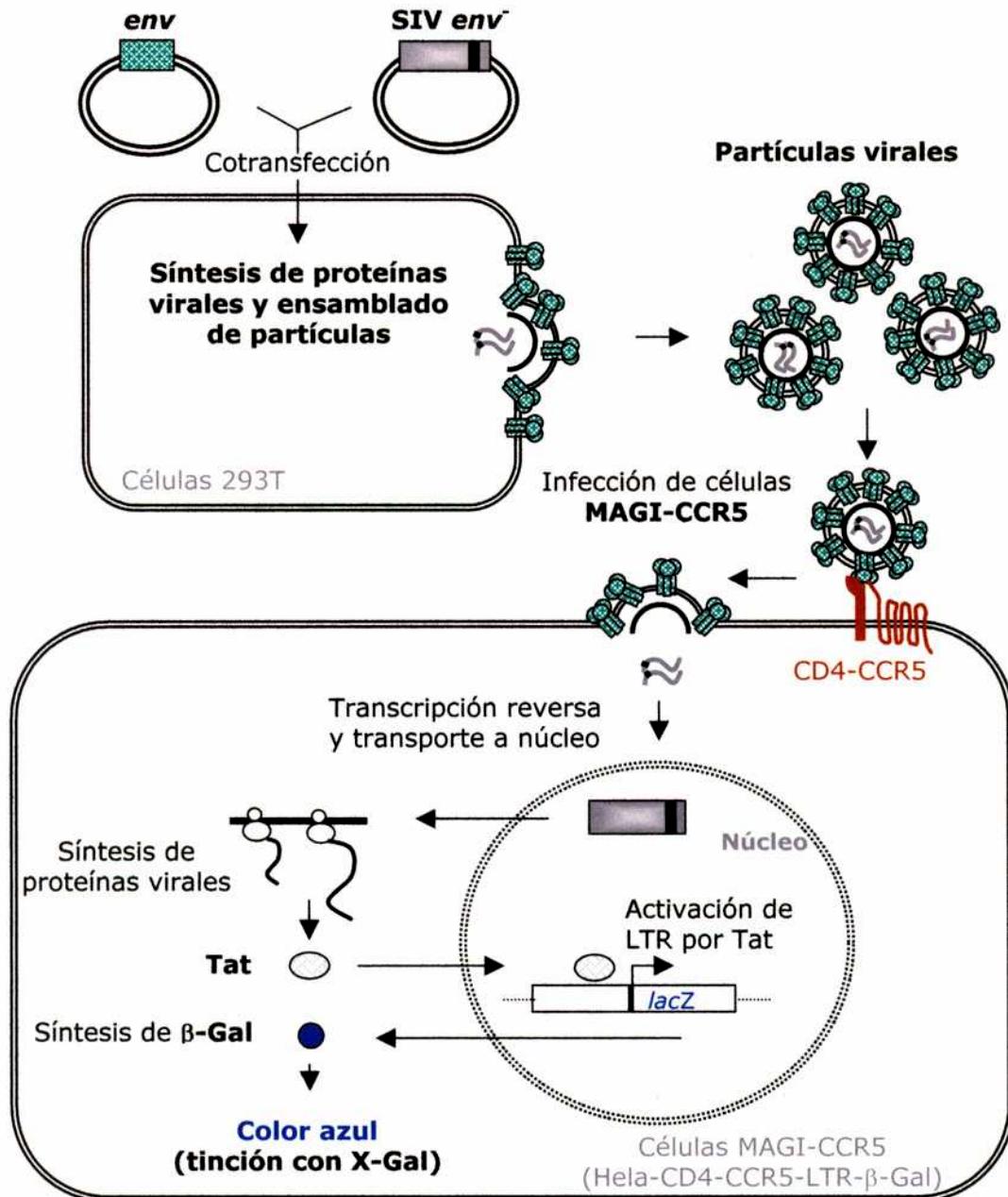


Figura I.5. Esquema del ensayo MAGI de infectividad de ciclo único. El ensayo consiste en complementar en *trans* un provirus *env⁻* con una proteína Env cuyas propiedades biológicas se van a analizar. Los viriones resultantes de la cotransfección SIV *env⁻*/gen *env* a ensayar son utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. Así, si los viriones son capaces de entrar a las células indicadoras y replicarse, activarán la expresión de la β-Gal por acción de la proteína viral Tat. Luego de tinción *in situ* con X-Gal, se pueden contar las células azules sobre la monocapa de células MAGI-CCR5.

Con el objeto de estudiar la capacidad de las glicoproteínas $\Delta E1$ a $\Delta E8$ de conferir infectividad a viriones, se realizaron ensayos MAGI de infectividad de ciclo único. En estos ensayos, se cotransfectaron células 293T con un ADN proviral derivado de SIVmac239 defectivo en el gen *env* (SIV *env*⁻) junto con cada uno de los genes *env* llevando las deleciones internas $\Delta E1$ a $\Delta E8$ subclonados en el plásmido pcDNA3.1 (+). Como control, se incluyó el gen *env* de SIV salvaje subclonado en el mismo vector. Los sobrenadantes de cada cotransfección conteniendo los viriones producidos fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. A las 48 horas postinfección, las células se fijaron y se tiñeron con X-Gal. La infectividad de los viriones resultantes de cada cotransfección SIV *env*⁻/*env* $\Delta E1$ a $\Delta E8$ se determinó contando el número de células azules y refiriéndolo al obtenido con viriones resultantes del ensayo SIV *env*⁻/*env* salvaje.

Como se muestra en la Figura I.6, las proteínas Env $\Delta E1$ a $\Delta E3$, que se incorporan eficientemente a partículas, mediaron la entrada viral en forma similar o incluso superior a la Env salvaje. En cambio, las deleciones que causan un fenotipo defectivo de incorporación (mutantes $\Delta E4$ a $\Delta E8$) también disminuyen la infectividad viral. Las deleciones $\Delta E4$ y $\Delta E8$ causaron el efecto más drástico sobre la infectividad viral, esto es, valores de infectividad de $3,8 \pm 0,4\%$ para $\Delta E4$ y de $7,8 \pm 3\%$ para $\Delta E8$ respecto de los valores obtenidos con la proteína Env salvaje. Estos valores representan una reducción de la infectividad de aproximadamente 25 y 10 veces para $\Delta E4$ y $\Delta E8$, respectivamente, respecto de la infectividad alcanzada con la Env salvaje. Los viriones resultantes de la complementación de SIV *env*⁻ con los mutantes de Env $\Delta E6$ y $\Delta E7$ exhibieron también una capacidad reducida de entrada a las células MAGI, obteniéndose valores de infectividad de $24,2 \pm 4,8\%$ y de $15,0 \pm 5,6\%$, respectivamente, respecto de los viriones resultantes de la cotransfección SIV *env*⁻/*env* salvaje. En el caso de la complementación del SIV *env*⁻ con la proteína Env $\Delta E5$, los viriones obtenidos exhibieron una infectividad del $41,5 \pm 2,6\%$ respecto de la de los viriones complementados con la Env salvaje.

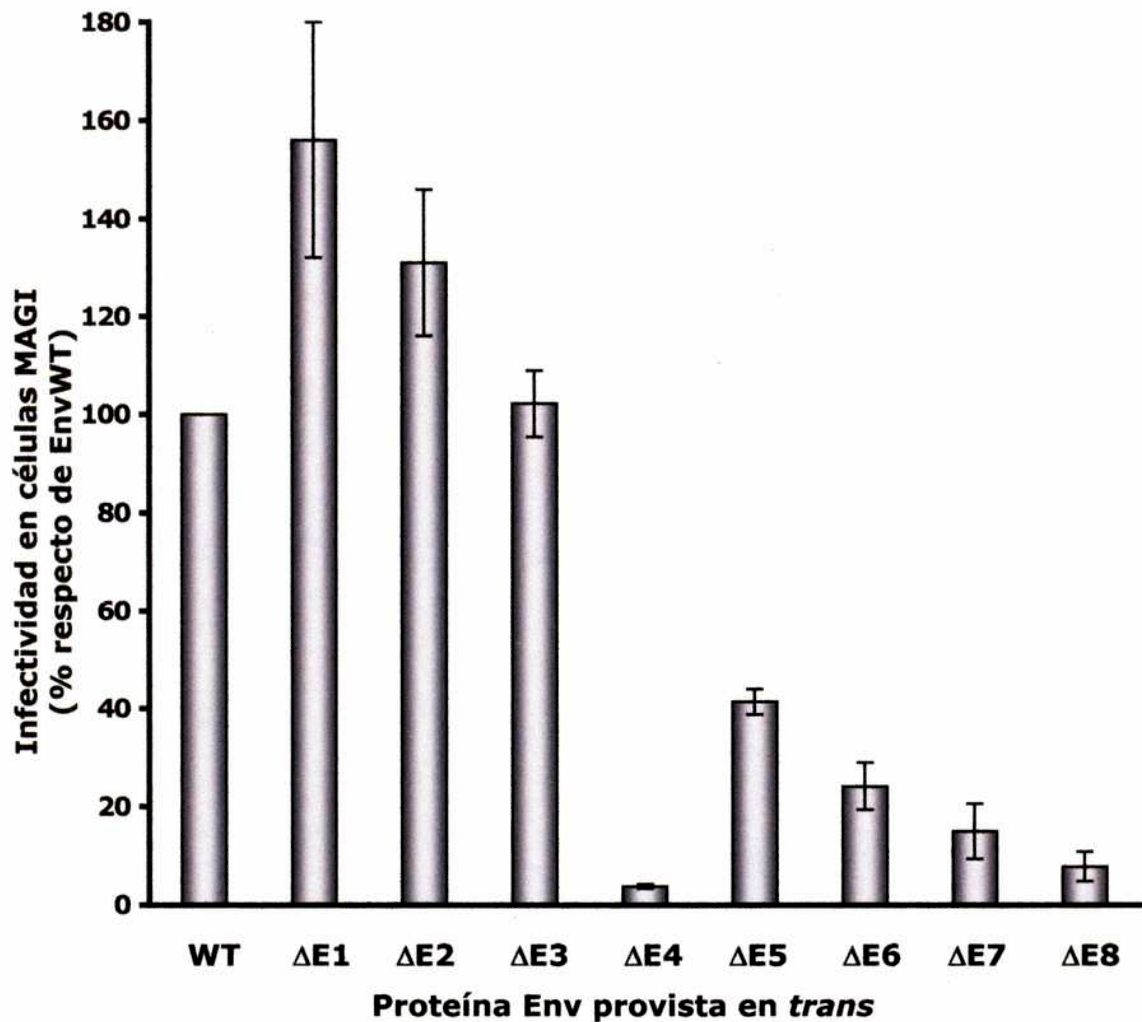


Figura I.6. Efecto de las deleciones $\Delta E1$ a $\Delta E8$ sobre la infectividad viral. Células 293T fueron cotransfectadas con el ADN proviral SIVmac *env*⁻ y los genes *env* salvaje (WT) o mutados $\Delta E1$ a $\Delta E8$ clonados en el vector de expresión pcDNA3.1(+). A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes fueron recuperados y se normalizaron por actividad de TR. Cantidades equivalentes de viriones se usaron para infectar células MAGI-CCR5. A las 48 horas, las células se fijaron y se tiñeron con X-Gal. El número de células azules obtenido con los viriones resultantes de cada cotransfección se refirió al obtenido con viriones llevando la proteína Env salvaje (considerado el 100%). Los datos presentados corresponden a la media \pm la desviación estándar correspondientes a tres experimentos independientes.

I.6. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DELECCIONES EN LA REGIÓN AMINO TERMINAL DEL DOMINIO CITOPASMÁTICO DE LA SUBUNIDAD TM DE SIV

Los resultados obtenidos hasta este punto con los mutantes de Env $\Delta E1$ a $\Delta E8$ indicaban que dominios presentes en el tercio carboxilo terminal del CD de la proteína TM de SIV cumplen un rol importante tanto en la incorporación de Env a partículas como en la infectividad viral. Decidimos entonces investigar si existen dominios en el tercio amino terminal del CD que participan también en estos procesos. Para ello, se generaron deleciones internas adicionales que afectan aminoácidos amino terminales a la deleción $\Delta E1$. La región del CD próxima al dominio de anclaje a membrana de Env no estuvo sujeta a mutagénesis ya que se ha demostrado que está involucrada en la regulación de la expresión en superficie de la glicoproteína Env de SIV (Sauter *et al.*, 1996). La Figura I.7 muestra un esquema de las deleciones generadas. Los residuos involucrados en cada una de estas deleciones fueron: 763 a 767 ($\Delta E9$), 772 a 774 ($\Delta E10$), 778 a 782 ($\Delta E11$) y 789-794 ($\Delta E12$) de la proteína Env de SIVsmmPBj1.9.

I.7. EFECTO DE LAS DELECCIONES $\Delta E9$ A $\Delta E12$ SOBRE LA INFECTIVIDAD VIRAL

El efecto de las deleciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$ sobre la infectividad viral se analizó por el ensayo de ciclo único en células MAGI-CCR5 descrito antes. La Figura I.8 muestra que los viriones que resultan de complementar el SIVmac *env* con los genes *env* $\Delta E9$ a $\Delta E12$ exhiben una infectividad viral similar o incluso mayor a la observada para los viriones obtenidos en la cotransfección SIVmac *env*/*env* salvaje considerada como 100%. Esto indica que estas mutaciones no interfieren con la capacidad de Env de mediar la entrada viral.

Por otro lado, cuando se analizó por Western blot la composición proteica de las partículas que resultan de la coinfección de células CV-1 con los virus vaccinia Gag-PR y los que expresan las proteínas Env $\Delta E9$ a $\Delta E12$, se

observó que estas glicoproteínas Env mutadas se incorporan a partículas en forma similar a la Env salvaje (dato no mostrado).

Estos resultados indican que los dominios de la región amino terminal del CD, afectados por las deleciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$, no son necesarios para la incorporación de Env a partículas ni para la infectividad viral.

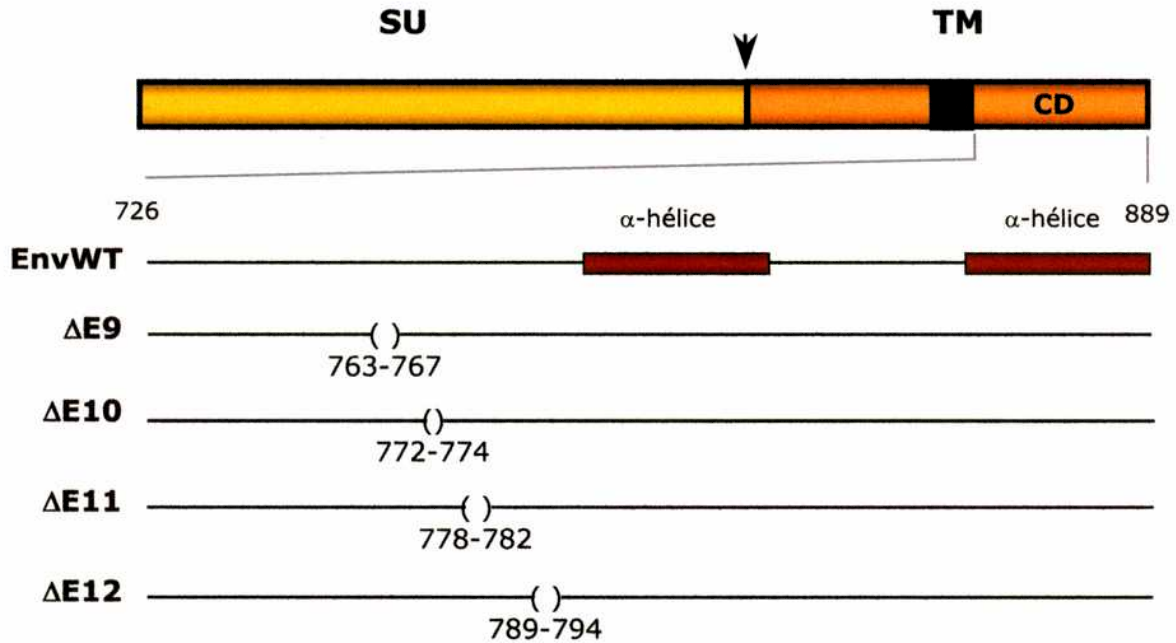


Figura I.7. Esquema de las delecciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$ introducidas en el tercio amino terminal del dominio citoplasmático de la proteína TM de SIV. Se indican las dos subunidades de Env, SU y TM. El sitio de clivaje entre ambas subunidades se representa con una flecha. Se muestran las dos α -hélices predichas en base a la estructura primaria del CD de TM. Los números debajo de cada paréntesis indican los residuos removidos en cada delección. La numeración corresponde a la proteína Env de SIVsmmPBj1.9.

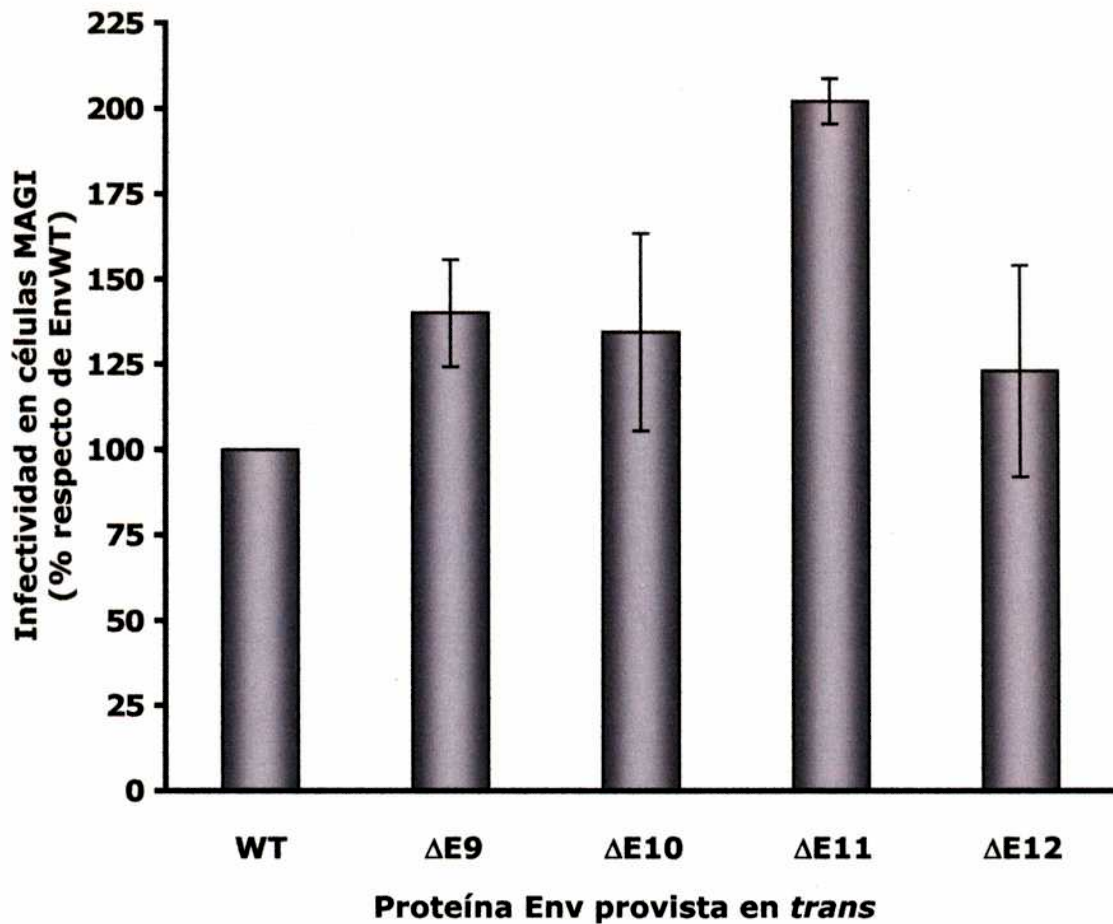


Figura I.8. Efecto de las deleciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$ sobre la infectividad viral. Células 293T fueron contransfectadas con el ADN proviral SIVmac *env* y los genes *env* salvaje (WT) o mutados $\Delta E9$ a $\Delta E12$ clonados en el vector de expresión pcDNA3.1 (+). A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes fueron recuperados y se normalizaron por actividad de TR. Cantidades equivalentes de viriones se usaron para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. A las 48 horas, las células se fijaron y se tiñeron con X-Gal. El número de células azules obtenido para cada Env mutada se refirió al obtenido con viriones llevando la Env salvaje (considerado el 100%).

RESULTADOS CAPÍTULO II

II.1. CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV CON DOMINIOS CITOPLASMÁTICOS TRUNCADOS

Se ha descrito que al cultivar aislamientos de SIVmac en células T humanas se seleccionan virus que llevan un codón de terminación prematuro en el gen *env*, lo que resulta en la expresión de una glicoproteína Env con un CD de sólo 18 aminoácidos (Hirsch *et al.*, 1989a; Kodama *et al.*, 1989; Chakrabarti *et al.*, 1989). Sin embargo, cuando estos virus mutantes son inoculados en monos macacos, se produce una reversión a virus que codifican para una glicoproteína Env con CD completo, esto es, de 164 aminoácidos (Hirsch *et al.*, 1989a; Kodama *et al.*, 1989). Varios estudios de mutagénesis han recreado el acortamiento que sufre el CD de Env cuando se propaga SIVmac en células T humanas. Los resultados obtenidos demostraron que al truncar el CD de SIV a 18 aminoácidos se incrementa la capacidad de Env de formar sincicios (Ritter *et al.*, 1993; Zingler & Littman, 1993), de mediar la entrada viral (Johnston *et al.*, 1993; Zingler & Littman, 1993) y de incorporarse a viriones (Johnston *et al.*, 1993; Shacklett *et al.*, 1998). Estas evidencias indican que la longitud del CD de la proteína TM de SIV influye sobre las funciones virales mediadas por Env. Por lo tanto, resultó relevante realizar un estudio detallado de cómo pequeñas variaciones en la longitud del CD afectan las propiedades biológicas de la glicoproteína Env de SIV.

Para ello, se introdujeron codones de terminación prematuros en la región codificante del CD de la proteína TM de forma tal de generar proteínas Env con dominios progresivamente más cortos desde su extremo carboxilo. De esta forma, se generaron 7 mutantes del gen *env* codificando para proteínas Env con CDs de 144 a 24 residuos (Figura II.1).

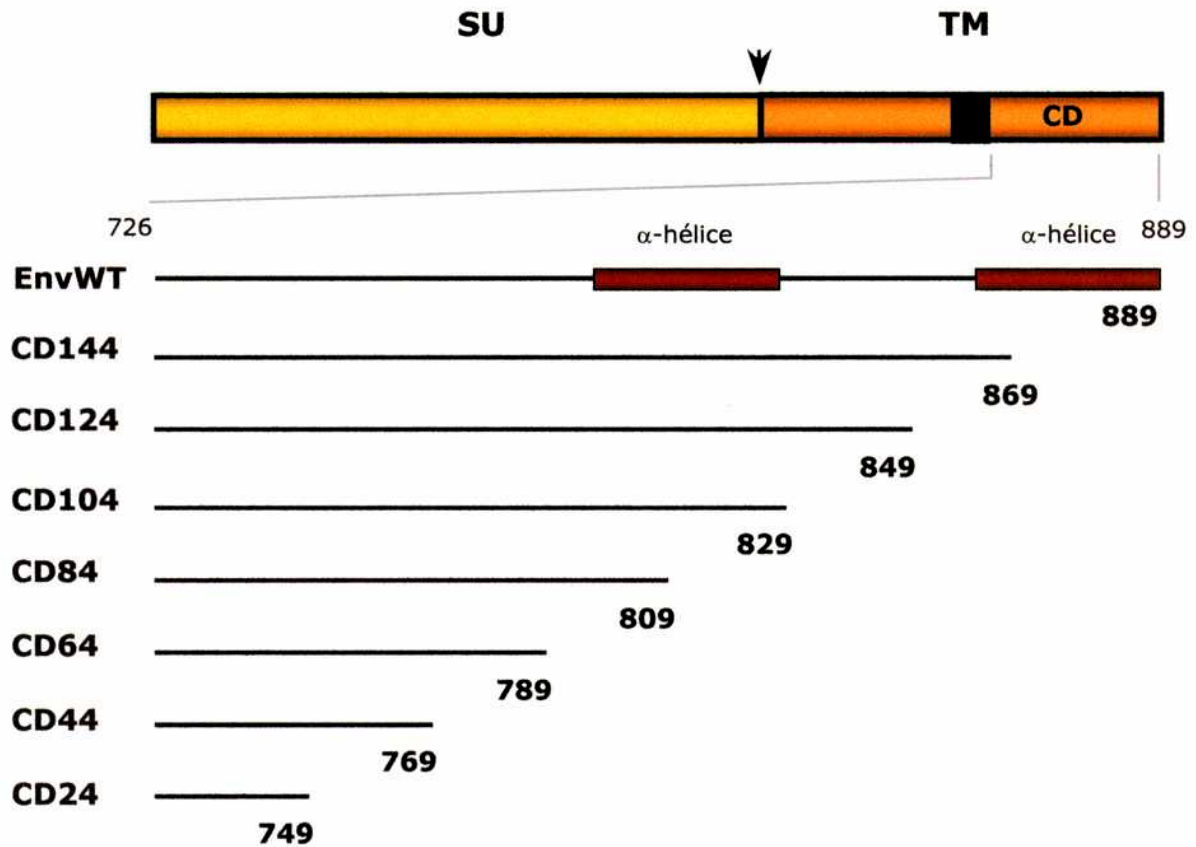


Figura II.1. Esquema de las proteínas Env truncadas. Se muestra un esquema de la glicoproteína Env con las subunidades SU y TM. La flecha representa el sitio de clivaje entre ambas subunidades y con un recuadro negro se indica la región de anclaje a membrana. Los codones de terminación introducidos en el gen *env* producen un acortamiento progresivo cada 20 residuos desde el extremo carboxilo del CD. La denominación de cada mutante indica el número de aminoácidos que posee su CD, siendo 164 aminoácidos la longitud del CD de la Env salvaje (Env WT). Los números a la derecha del esquema indican la longitud total del precursor Env.

II.2. EXPRESIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS ENV TRUNCADAS UTILIZANDO EL SISTEMA DE VACCINIA

Los genes *env* mutados CD144 a CD24 fueron utilizados para generar virus vaccinia recombinantes como se describe en Materiales y Métodos. Con el fin de analizar los niveles de expresión y procesamiento de las proteínas Env truncadas, se infectaron células CV-1 con los virus vaccinia recombinantes. Luego de realizar una marcación metabólica, las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares y de los sobrenadantes de infección con suero de monos infectados con SIV. Los inmunocomplejos se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida y las proteínas virales se visualizaron por autorradiografía del gel. Como control, se incluyeron células CV-1 infectadas con el recombinante de vaccinia que dirige la expresión de la Env salvaje de SIV.

La Figura II.2 (Parte A) muestra que todas las proteínas Env truncadas se expresan en niveles comparables a los de la Env salvaje y se procesan para dar las subunidades SU y TM. Se visualiza además que la movilidad electroforética de cada banda TM se correlaciona con el acortamiento introducido en cada CD.

Se ha demostrado que cuando la glicoproteína Env alcanza la superficie celular, una fracción de la subunidad SU se disocia espontáneamente del complejo que forma con TM y aparece libre en el medio extracelular (Schneider *et al.*, 1986). Como se observa en la Figura II.2 (Parte B), en los sobrenadantes de cultivo se detecta la subunidad SU tanto de la proteína Env salvaje (WT) como de las mutantes. Por lo tanto, con el fin de investigar si la longitud del CD de la proteína TM afecta la estabilidad del complejo SU-TM, las bandas correspondientes al precursor Env y a la subunidad SU de cada mutante presentes tanto en lisados celulares como en los sobrenadantes de infección fueron cuantificadas por densitometría para calcular los índices de procesamiento y asociación (Tabla II.1).

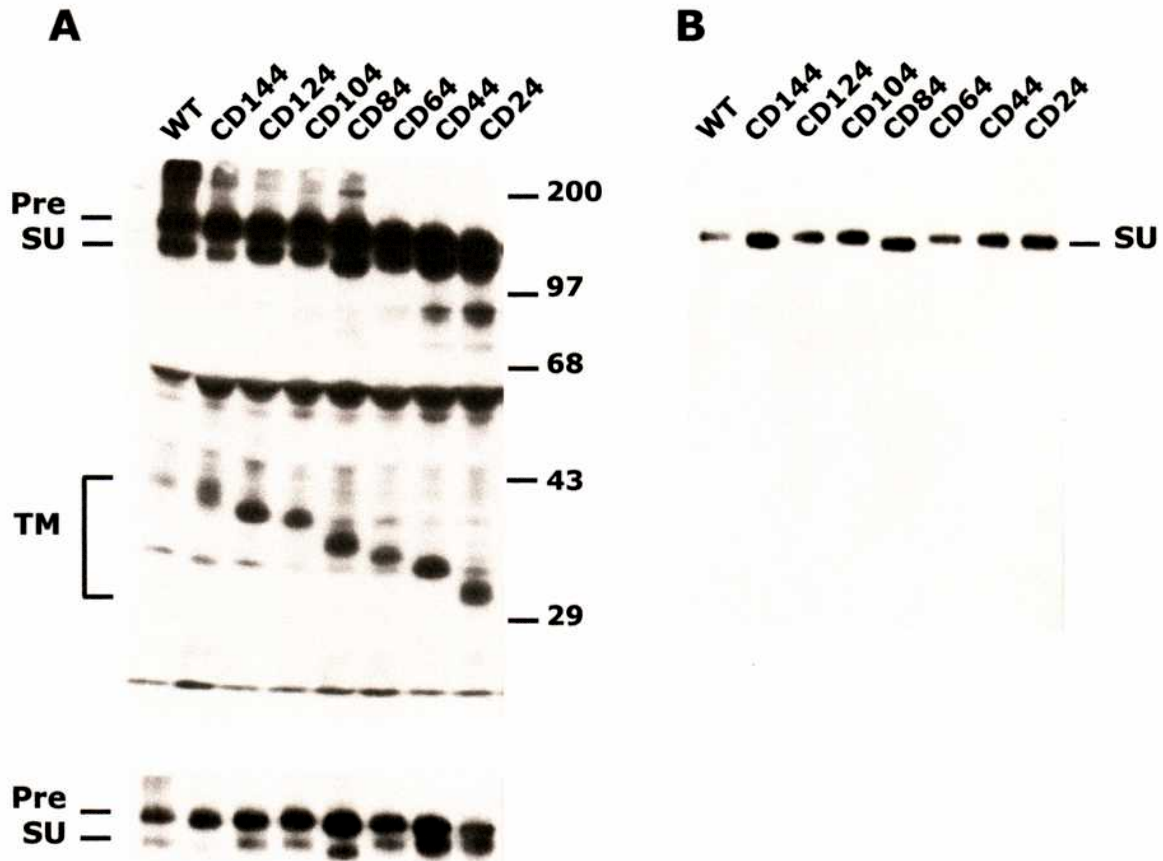


Figura II.2. Expresión de las proteínas Env truncadas CD144 a CD24 en el sistema del virus vaccinia. Se infectaron células CV-1 con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la expresión de las Env CD144 a CD24. Como control, se incluyó la expresión de Env salvaje (WT). Luego de la marcación metabólica con [^{35}S]metionina/cisteína por 4 horas, las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares (A) o de los sobrenadantes de cultivo (B), y luego resueltas por electroforesis en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS. En la parte A (Panel inferior) se presenta una exposición más corta de la porción superior del gel. Se indica la movilidad del precursor Env (Pre), de las subunidades SU y TM y de los marcadores de peso molecular (en kDa).

El índice de procesamiento permite comparar el grado de clivaje proteolítico que sufre cada precursor Env mutante respecto del clivaje que sufre el precursor Env salvaje. Este índice en el caso de las Env mutantes CD144 a CD64 resultó ser similar al de la Env salvaje. En el caso de las Env truncadas CD44 y CD24, el procesamiento resultó ser mayor al exhibido por la Env salvaje, presentando índices de procesamiento de 1,5 y 1,8, respectivamente.

El índice de asociación es una estimación del grado de estabilidad de la interacción entre las subunidades TM y SU de las proteínas Env truncadas respecto de la estabilidad del complejo SU-TM de la Env salvaje. Como muestra la Tabla II.1, sólo la Env truncada CD144 presentó una liberación espontánea de la SU al medio extracelular superior a la de la Env salvaje: en efecto, el valor del índice de asociación de la Env CD144 fue de 0,5. En cambio, la estabilidad de los complejos SU-TM no se vió significativamente modificada por la delección de 40 a 140 aminoácidos del extremo carboxilo del CD de la proteína TM (Tabla II.1, mutantes CD124 a CD24).

Proteína Env	Índice de Procesamiento	Índice de Asociación
Env WT	1,0	1,0
CD144	0,8	0,5
CD124	1,0	0,9
CD104	1,0	0,8
CD84	1,1	0,9
CD64	1,2	1,0
CD44	1,5	0,9
CD24	1,8	0,9

Tabla II.1. Procesamiento y estabilidad de las glicoproteínas Env truncadas. El índice de procesamiento se calculó como: (SU mutante total/precursor Env mutante) x (precursor Env WT/SU WT total).

El índice de asociación se calculó de la siguiente manera: (SU mutante intracelular/SU mutante total) x (SU WT total/SU WT intracelular).

Las cantidades del precursor Env y de la subunidad SU de las proteínas Env salvaje (Env WT) y mutantes presentes tanto en lisados celulares como en los sobrenadantes de cultivo, fueron cuantificadas por densitometría de las autorradiografías. **SU total:** corresponde a la suma de los niveles intra y extracelulares de esta subunidad.

II.3. EFECTO DEL ACORTAMIENTO PROGRESIVO DEL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE LA PROTEÍNA TM DE SIV SOBRE LA INCORPORACIÓN DE ENV A PARTÍCULAS

Como se mencionó antes, la coexpresión del precursor Gag-PR y de Env de SIV por el sistema del virus vaccinia recombinante resulta en la formación de partículas pseudovirales que llevan en su superficie la glicoproteína Env. Por lo tanto, se usó este sistema para analizar el efecto que tiene el acortamiento progresivo del CD sobre la incorporación de Env a partículas. Para ello, se coinfectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que dirige la expresión de Gag-PR de SIV junto con cada virus recombinante que expresa las Env truncadas CD144 a CD24. Como control, se incluyó la coexpresión de Gag-PR y Env salvaje de SIV. A las 24 horas postinfección, las partículas virales fueron recuperadas del sobrenadante de cada coinfección por ultracentrifugación y las células fueron recogidas y lisadas en buffer TNN. Muestras de cada fracción se sometieron a electroforesis en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS y posterior electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Para detectar las proteínas virales presentes en los lisados y en las partículas, se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas TM o CA de SIV. En la Figura II.3 se muestran los resultados obtenidos. El análisis de los lisados celulares indicó que en todas las coinfecciones los niveles de expresión de las proteínas Env truncadas fueron similares a los de la Env salvaje (Figura II.3 Parte A, Lisados). Sin embargo, la delección de los 20 residuos carboxilo terminales del CD (mutante CD144) inhibió drásticamente la incorporación de Env a partículas (Figura II.3 Parte A, Partículas). Un fenotipo similar se observó también para las proteínas Env truncadas CD124 a CD84. En cambio, la remoción de 100 aminoácidos del extremo carboxilo de Env (mutante CD64) resultó en niveles de incorporación similares a los de la proteína Env salvaje (Figura II.3 Parte A, Partículas). Resultó interesante observar que las proteínas Env truncadas CD44 y CD24 se incorporaron a las partículas de Gag en niveles significativamente superiores a los de la proteína Env salvaje.

Para comprobar que el defecto de incorporación presentado por las proteínas Env truncadas CD144 a CD84 no se debía a una producción ineficiente de partículas extracelulares, se analizó la fracción particulada con el anticuerpo monoclonal contra la proteína CA de SIV, como se muestra en la Figura II.3 (Parte B, Partículas). Los niveles de producción de partículas en las coinfecciones Gag-PR/Env truncadas fueron similares a los detectados en la coinfección Gag-PR/Env salvaje.

Estos resultados indican que el acortamiento progresivo del CD de la subunidad TM de SIV afecta dramáticamente la incorporación de Env a partículas.

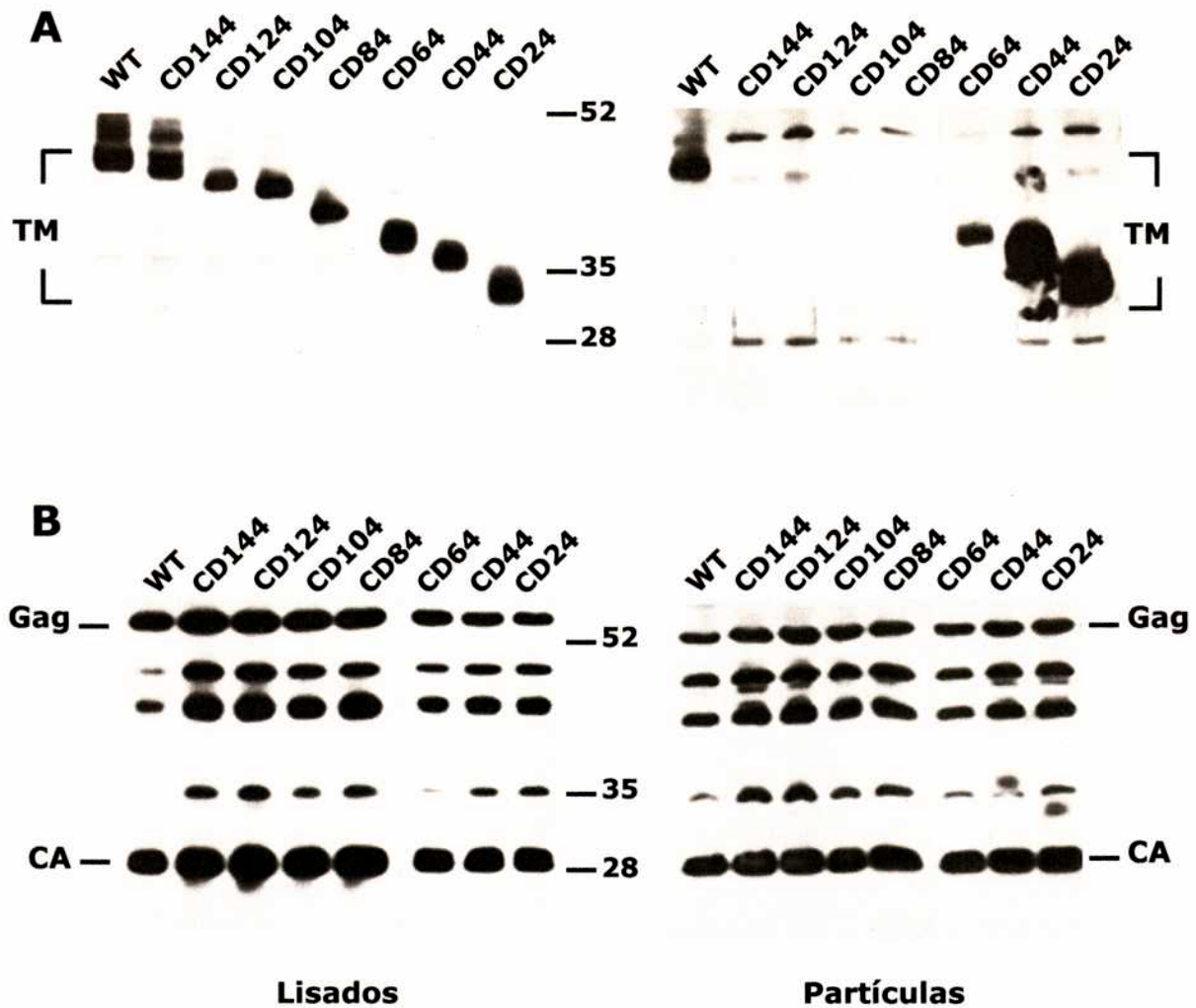


Figura II.3. Efecto del acortamiento progresivo del dominio citoplasmático de la proteína TM de SIV sobre la incorporación de Env a partículas. Se coinfectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que expresa Gag-PR junto con cada uno de los virus que expresan las Env truncadas (CD144 a CD24) o la Env salvaje (WT). A las 24 horas postinfección, las partículas virales fueron purificadas a partir del medio extracelular por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v) (**Partículas**). Las células fueron recuperadas y lisadas (**Lisados**). Las proteínas virales se detectaron por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína TM (**A**) o contra la proteína CA (**B**) de SIV. Se indican las posiciones del precursor Gag, de las proteínas TM y CA y de los marcadores de peso molecular (en kDa).

II.4. EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE LAS GLICOPROTEÍNAS ENV DE SIV CON DOMINIOS CITOPLASMÁTICOS TRUNCADOS

Para evaluar si las diferencias en la incorporación a partículas detectadas para las proteínas Env CD144 a CD24 eran debidas a alteraciones en su transporte a la superficie celular, se realizó un ensayo de biotinylación de proteínas de superficie. Para este ensayo, se infectaron células CV-1 con cada virus vaccinia expresando las proteínas Env CD144 a CD24. Como control, se incluyeron células CV-1 expresando la Env salvaje. Luego de la marcación metabólica, las proteínas de superficie fueron biotinyladas como se describió en Materiales y Métodos (sección I.4). Luego de lisar las células, las proteínas virales se inmunoprecipitaron con suero de monos infectados con SIV, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para visualizar las proteínas biotinyladas se utilizó estreptavidina conjugada a peroxidasa acoplada a reacción de quimioluminiscencia. Como se observa en la Figura II.4 (Superficie), el precursor Env y la subunidad SU de todas las glicoproteínas Env truncadas fueron detectados en superficie por el ensayo de biotinylación, lo cual indica que el acortamiento del CD de la subunidad TM no afecta el transporte de Env a la superficie celular. En el caso de la proteína Env CD144 se detectó, sin embargo, un nivel de SU biotinylada menor al obtenido para la Env salvaje (Fig. II.4, Superficie), lo que concuerda con la menor estabilidad del complejo SU-TM observado para la Env CD144 (ver Tabla II.1, Índice de asociación). Es interesante destacar que la remoción de 120 o 140 aminoácidos del extremo carboxilo de Env (mutaciones CD44 y CD24), que incrementa significativamente la incorporación de Env a partículas, no produce un aumento en los niveles de expresión en superficie de las Env CD44 o CD24 respecto de la Env salvaje. En este sentido, las proteínas CD44 y CD24 conservan la señal próxima a la región de anclaje a membrana que regula el grado de endocitosis de Env (Sauter *et al.*, 1996).

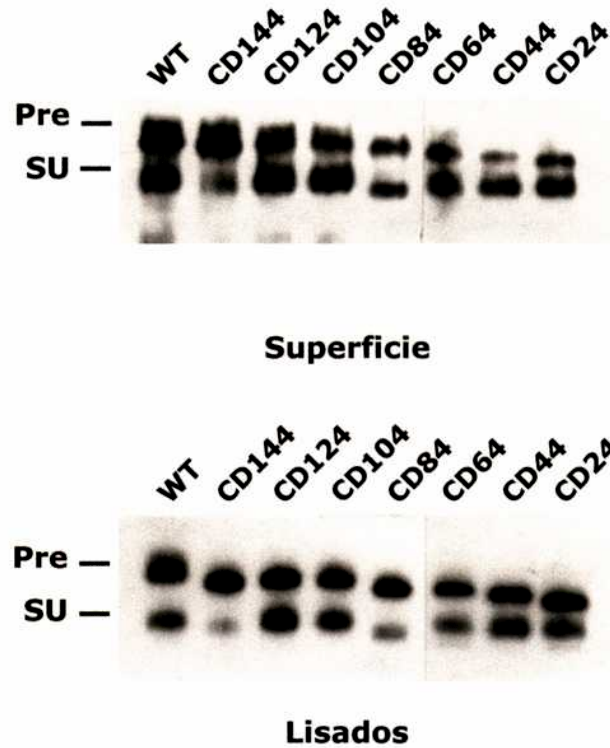


Figura II.4. Niveles de expresión en la superficie celular de las proteínas Env truncadas CD144 a CD24. Células CV-1 infectadas con los virus vaccinia que dirigen la expresión de cada Env truncada (CD144 a CD24) o de la Env salvaje (WT) fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S]metionina/cisteína y luego sometidas a biotilación como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas biotiladas se visualizaron por reacción con estreptavidina conjugada a peroxidasa acoplado a reacción de quimioluminiscencia (**Superficie**). El nivel de expresión total de Env en cada mutante se detectó por autorradiografía de la membrana luego de dejar decaer la reacción de quimioluminiscencia por 3 días (**Lisados**).

II.5. EFECTO SOBRE LA INFECTIVIDAD VIRAL DEL ACORTAMIENTO PROGRESIVO DEL DOMINIO CITOPASMÁTICO DE LA PROTEÍNA TM DE SIV

A continuación, decidimos investigar cómo pequeñas variaciones en la longitud del CD de la proteína TM afectan la capacidad de Env de mediar la entrada del virus a la célula. Para ello, se realizaron ensayos de infectividad de ciclo único (ver Capítulo I.5) en los cuales se cotransfectaron células 293T con el ADN proviral SIVmac *env*- junto con cada uno de los genes *env* mutados codificando para las proteínas Env CD144 a CD24. A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes de cultivo de cada una de las cotransfecciones fueron recogidos y se determinó el título viral en base a la actividad de TR. Fracciones equivalentes de cada sobrenadante, normalizadas por actividad de TR, fueron utilizadas para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. A las 48 horas, las células fueron fijadas y teñidas con X-Gal para detectar la actividad de β -Gal *in situ*.

En la Tabla II.2 se muestran los resultados obtenidos. Las deleciones que interfieren con la incorporación de Env a partículas, mutaciones CD144 a CD84, también redujeron drásticamente la infectividad. En efecto, las infectividades de los viriones resultantes de las cotransfecciones SIV *env* /*env* CD144 a *env* CD84 fueron en todos los casos inferiores al 2% de la infectividad de los viriones obtenidos de la cotransfección SIV *env* /*env* salvaje. El fenotipo presentado por el mutante CD64 fue inesperado ya que, a pesar de incorporarse a partículas en forma similar a la Env salvaje (ver Figura II.3), los viriones resultantes de la cotransfección SIV *env* /*env* CD64 no fueron infectivos.

Un fenotipo completamente distinto a los anteriores se observó para las proteínas Env CD44 y CD24 que incrementaron la infectividad viral 12 y 17 veces, respectivamente, respecto de la exhibida por los viriones llevando la glicoproteína Env salvaje. Estos resultados correlacionan con la capacidad aumentada que presentan las proteínas Env CD44 y CD24 de incorporarse a partículas (ver Figura II.3).

Glicoproteína Env provista en <i>trans</i>	Infectividad relativa
Env WT	1
CD144	<0,02
CD124	<0,02
CD104	<0,02
CD84	<0,02
CD64	<0,02
CD44	12,3 ± 3,3
CD24	16,7 ± 1,7

Tabla II.2. Infectividad en células MAGI-CCR5 de viriones obtenidos por complementación con las proteínas Env truncadas. Se cotransfectaron células 293T con el ADN proviral SIVmac *env*⁻ y cada gen *env* mutado CD144 a CD24 clonado en un plásmido de expresión. Los sobrenadantes de cada cotransfección fueron normalizados por actividad de TR y fracciones equivalentes de cada uno se utilizaron para infectar las células indicadoras MAGI-CCR5 en ensayos de infectividad de ciclo único. La infectividad se cuantificó como el número total de células azules obtenido para las coexpresiones SIVmac *env*⁻/Env truncada (CD144 a CD24) y referido al número total obtenido para viriones complementados con la proteína Env salvaje (Env WT) considerado 1. Los datos presentados corresponden a la media y la desviación estándar obtenidos en tres experimentos independientes.

II.6. INTRODUCCIÓN DE LAS MUTACIONES CD44 Y CD24 EN EL CONTEXTO DEL ADN PROVIRAL DE SIV

Como se describió en las secciones II.3 y II.5 de este capítulo, el acortamiento del CD de la proteína TM de SIV a 44 o 24 residuos resulta en un aumento significativo tanto de los niveles de incorporación de Env a partículas como de la infectividad en ensayos de complementación. Se decidió entonces investigar el efecto de estas mutaciones en el contexto del genoma viral. Para ello, los codones de terminación correspondientes a las mutaciones CD44 y CD24 fueron introducidos por mutagénesis dirigida en fragmentos de restricción *PshAI/NotI* (nucleótidos 8170 a 9996), los cuales fueron utilizados para reemplazar el fragmento salvaje correspondiente en el plásmido que lleva el ADN proviral salvaje (pSV-SIVsmmPBj1.9, PBjWT).

Dado que el marco de lectura del CD de la subunidad TM de SIV se superpone con el segundo exón de los genes *rev* y *tat*, los codones de terminación correspondientes a las mutaciones CD44 y CD24 fueron diseñados de forma tal de minimizar los cambios aminoacídicos en Tat y Rev. En efecto, los codones de terminación introducidos generan una única sustitución conservativa en el marco de lectura del gen *tat*. En el caso del marco de lectura de *rev*, resultó inevitable introducir un único cambio no conservativo. Sin embargo, ninguno de estos cambios aminoacídicos afectó la función de Tat y Rev, pues los niveles de expresión de las proteínas Gag y Env para los virus CD44 y CD24 fueron similares a los obtenidos para PBjWT (ver abajo).

Se transfectaron células 293T con el ADN proviral PBjWT o con los ADN provirales mutados, PBj-CD44 o PBj-CD24. A las 48 horas postransfección, se prepararon lisados celulares y se purificaron los viriones a partir de cada sobrenadante de transfección como se describió en la sección XVI.1 de Materiales y Métodos. Se detectaron luego las proteínas virales tanto en lisados como en la fracción particulada por Western blot utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas TM (Figura II.5, Parte A) o CA (Figura II.5, Parte B). Los resultados obtenidos indicaron que los ADN provirales PBj-CD44 y PBj-CD24 expresaron niveles de Env y Gag

similares a los observados para el virus salvaje (Figura II.5 Lisados, Partes A y B). Sin embargo, las glicoproteínas Env CD44 y CD24 se incorporaron a viriones en niveles significativamente superiores a los de la Env salvaje. Estos resultados de incorporación coinciden con los obtenidos en los ensayos de coexpresión de Gag-PR de SIV con las Env mutantes CD44 o Env CD24 (ver sección II.3 de este Capítulo).

II.7. ENSAYO DE INFECTIVIDAD EN CÉLULAS MAGI DE LOS VIRUS PBj-CD44 Y PBj-CD24

Se analizó luego la infectividad de los virus mutantes PBj-CD44 y PBj-CD24 usando el ensayo MAGI. Para ello, los sobrenadantes de cultivo resultantes de la transfección de células 293T con los ADN provirales PBj-CD44 y PBj-CD24 fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. Como control, se realizó en paralelo el mismo ensayo con el virus salvaje, PBjWT. El número de células azules contabilizado para cada virus mutante se refirió al obtenido para PBjWT (considerado como 1). Como se muestra en la Figura II.6, las infectividades de los virus mutantes PBj-CD44 y PBj-CD24 fueron aproximadamente 13 y 9 veces superiores, respectivamente, a la del virus PBjWT.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de complementación en los que se observó que las glicoproteínas Env CD44 y CD24 eran capaces de conferir a los viriones una infectividad muy superior a la mediada por la proteína Env salvaje (comparar Tabla II.1 y Figura II.6). Cabe mencionar que la infectividad de los viriones producidos por el mutante PBj-CD24 fue ligeramente inferior a la obtenida por *trans*-complementación de SIVmac *env* con la glicoproteína CD24, lo que refleja en este caso una diferencia de infectividad entre viriones a los que se les provee una proteína Env en *trans* y aquéllos que resultan de la expresión de un genoma viral completo.

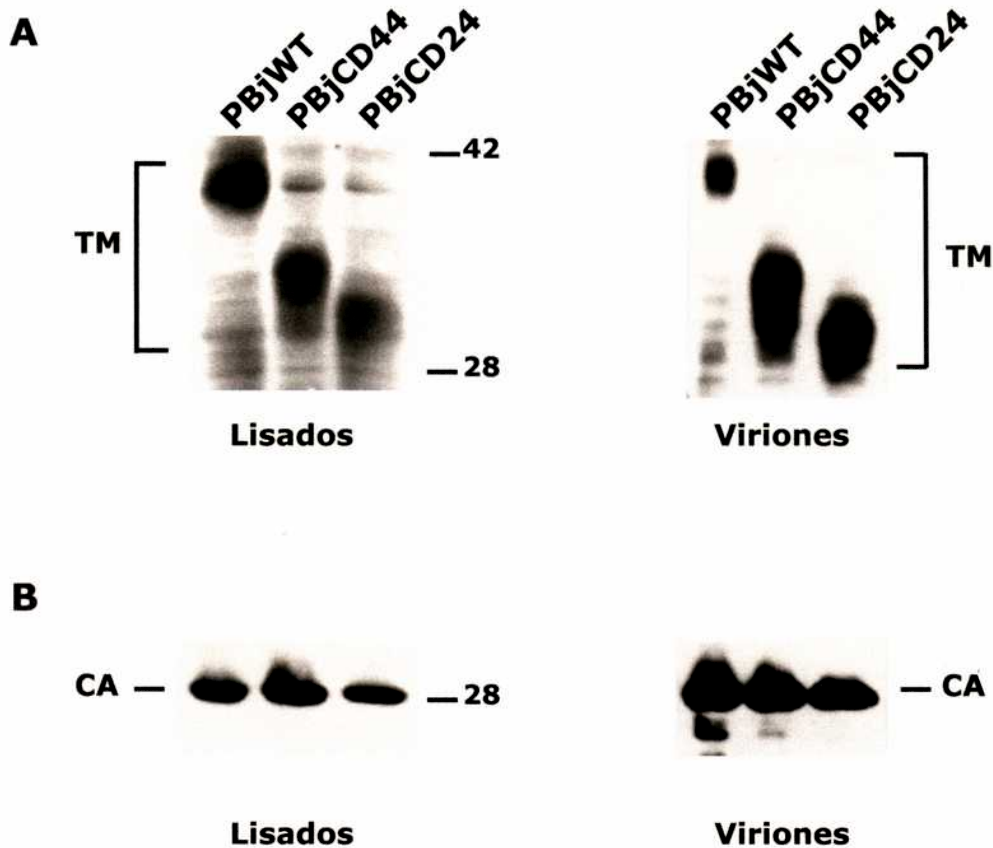


Figura II.5. Análisis de las mutaciones CD44 y CD24 expresadas en el contexto del virus. Células 293T fueron transfectadas con los ADN provirales PBjWT, PBj-CD44 o PBj-CD24. A las 48 horas postransfección, se prepararon lisados celulares (**Lisados**) y se recuperaron los viriones del sobrenadante de cultivo por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa 20% (**Viriones**). Muestras de cada fracción se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas virales se detectaron por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína TM (**A**) o contra la proteína CA (**B**). Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

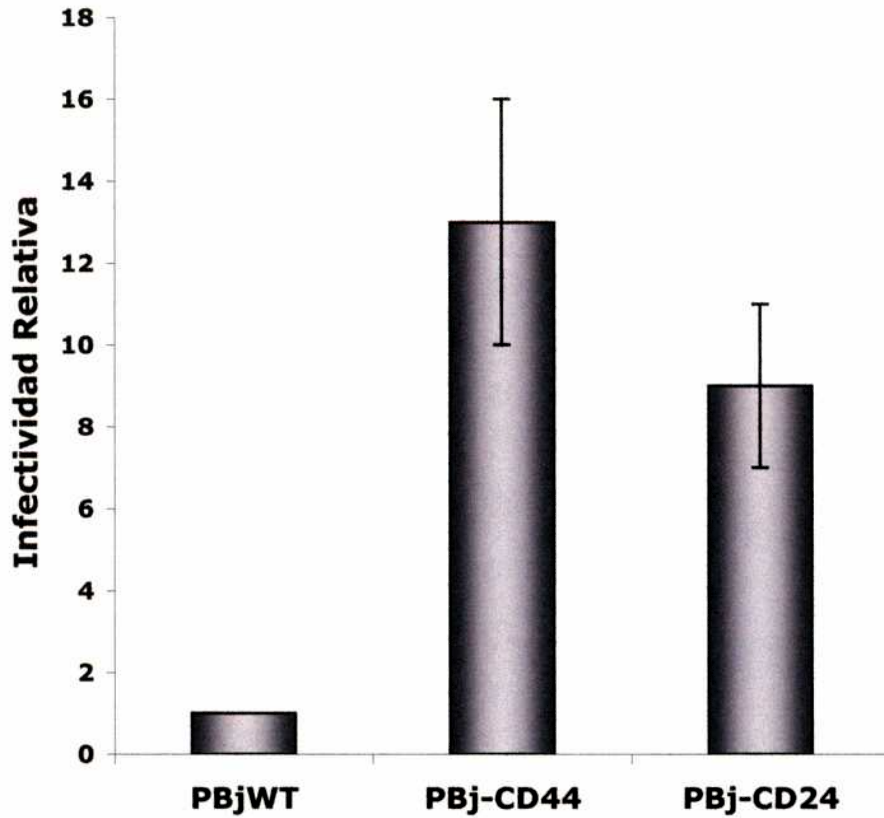


Figura II.6. Infectividad relativa de los viriones producidos por los mutantes PBj-CD44 y PBj-CD24. Sobrenadantes provenientes de la transfección de células 293T con PBjWT o con los mutantes PBj-CD44 o PBj-CD24 fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. Las células se fijaron 48 horas postinfección y se realizó la tinción *in situ* con X-Gal. El número de células azules para cada virus mutante se refirió al obtenido para PBjWT (considerado como 1). Se grafica la media y el desvío estándar correspondiente a tres ensayos independientes.

RESULTADOS CAPÍTULO III

III.1. REVERSIÓN DEL FENOTIPO DEFECTIVO CAUSADO POR LA MUTACIÓN Δ ENV832-837 EN EL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE LA GLICOPROTEÍNA ENV DE SIV

Los resultados presentados en los capítulos previos indican que el tercio carboxilo terminal del CD de la glicoproteína Env de SIV posee regiones necesarias para la incorporación de Env a partículas y para la infectividad viral. En particular, resultó de interés el fenotipo exhibido por la glicoproteína mutante Δ E4 en la cual se removieron los residuos 832 a 837 del CD de Env (motivo aminoacídico YLQYGW). La delección de estos residuos de la proteína Env de SIV inhibió la incorporación de Env a las partículas resultantes de la coexpresión de Gag-PR con la Env Δ E4 en el sistema de vaccinia recombinante (ver Capítulo I.3, mutante Δ E4) y redujo drásticamente la infectividad de los viriones obtenidos en el ensayo de *trans*-complementación SIVmac *env*⁻/Env Δ E4 (ver Capítulo I.6, mutante Δ E4).

Resultó entonces relevante investigar el efecto que tiene la delección Δ Env832-837 sobre la replicación viral en una línea celular linfoidea. Un clon molecular derivado de SIVsmmPBj1.9 conteniendo dicha delección, PBj Δ Env832-837, fue utilizado en estudios genéticos de evolución forzada con el objeto de examinar en más detalle el papel que juega el CD de la proteína TM de SIV en la infectividad viral.

III.2. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CLON MOLECULAR PBj Δ ENV832-837

La delección Δ Env832-837 se introdujo por la técnica de mutagénesis dirigida sobre un fragmento de restricción *PshAI/NotI* del clon de SIV PBj1.9 según se describe en Materiales y Métodos. El fragmento *PshAI/NotI* conteniendo la delección fue utilizado para sustituir al fragmento salvaje

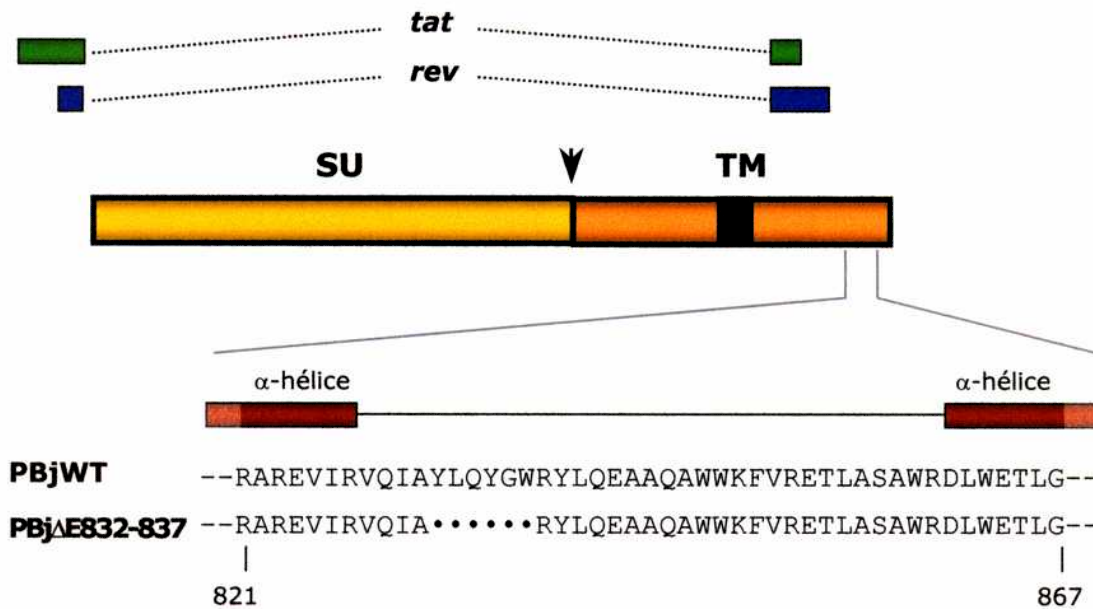


Figura III.1. Delección Δ Env832-837 introducida en el dominio citoplasmático de la proteína TM en el contexto del clon molecular SIVsmmPBj1.9. Se muestra un esquema del gen *env* de SIV indicando arriba los marcos abiertos de lectura para las proteínas Tat y Rev. El segundo exón de los genes *tat* y *rev* se superponen con la región del gen *env* de SIV que codifica para el CD de la glicoproteína Env. En la parte inferior, se presenta la secuencia del CD de la proteína Env de SIVsmmPBj1.9 (PBjWT) comprendida entre los residuos 821 a 867. Con el símbolo (•) se indican los aminoácidos removidos de la proteína Env en el virus mutante PBj Δ Env832-837.

correspondiente en el plásmido pSV-SIVsmmPBj1.9 (Figura III.1). Esta delección en el gen *env* no afecta a los marcos de lectura de los genes *tat* o *rev*.

Para caracterizar el virus PBj Δ Env832-837, se transfectaron células 293T con el ADN proviral mutado o con el provirus salvaje (PBjWT) como control. A las 48 horas postransfección, se prepararon lisados celulares y se purificaron los viriones por ultracentrifugación del medio extracelular. Estos ensayos mostraron que el clon PBj Δ Env832-837 expresa las proteínas Env y CA en niveles similares a los del virus salvaje (Figura III.2, Lisados). Sin embargo, los niveles a los cuales la glicoproteína Env mutante Δ 832-837 se incorpora a viriones son significativamente menores a los presentados por los viriones salvajes (Figura III.2, Viriones). Esto evidencia un defecto en la incorporación de la proteína Env Δ 832-837 similar al descrito utilizando el sistema del virus vaccinia (ver Capítulo I.3).

Por otra parte, los sobrenadantes de la transfección de las células 293T con los ADN provirales PBj Δ Env832-837 o PBjWT se normalizaron por actividad de TR y se utilizaron para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. Como se esperaba, la infectividad de los viriones PBj Δ Env832-837 fue de tan sólo un 1,33% respecto de la infectividad de viriones salvajes (Figura III.3). Este resultado concuerda con los datos de infectividad obtenidos en la *trans*-complementación SIVmac *env*/Env Δ E4 (ver Figura I.5).

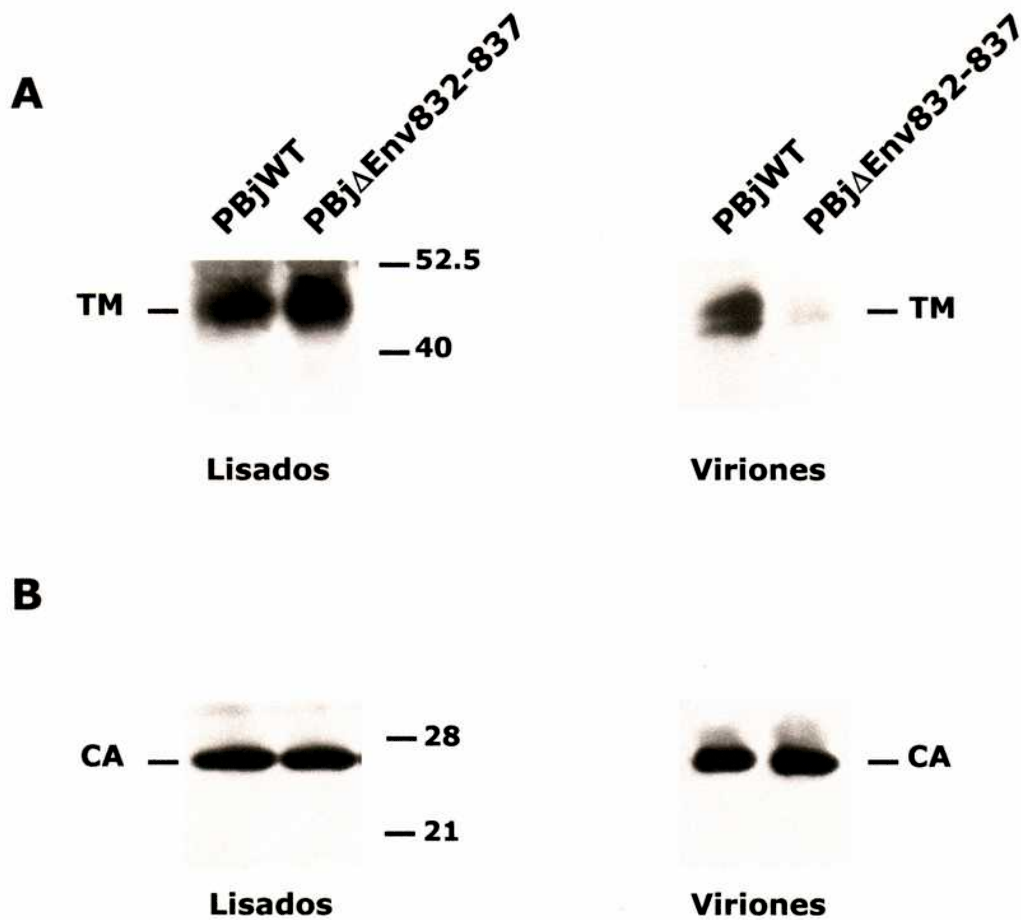


Figura III.2. Efecto sobre la incorporación de Env a viriones de la delección de los residuos 832-837 del dominio citoplasmático de TM. Se transfectaron células 293T con los ADN provirales PBJ Δ Env832-837 o PBJWT. A las 48 horas postransfección, las células fueron lisadas y los viriones purificados por ultracentrifugación. Las muestras fueron resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas virales se detectaron por Western blot utilizando anticuerpos monoclonales contra la proteína TM (**A**) o contra la proteína CA (**B**) de SIV. Se indican las movilidades de las proteínas TM, CA y las de los marcadores de peso molecular (en kDa).

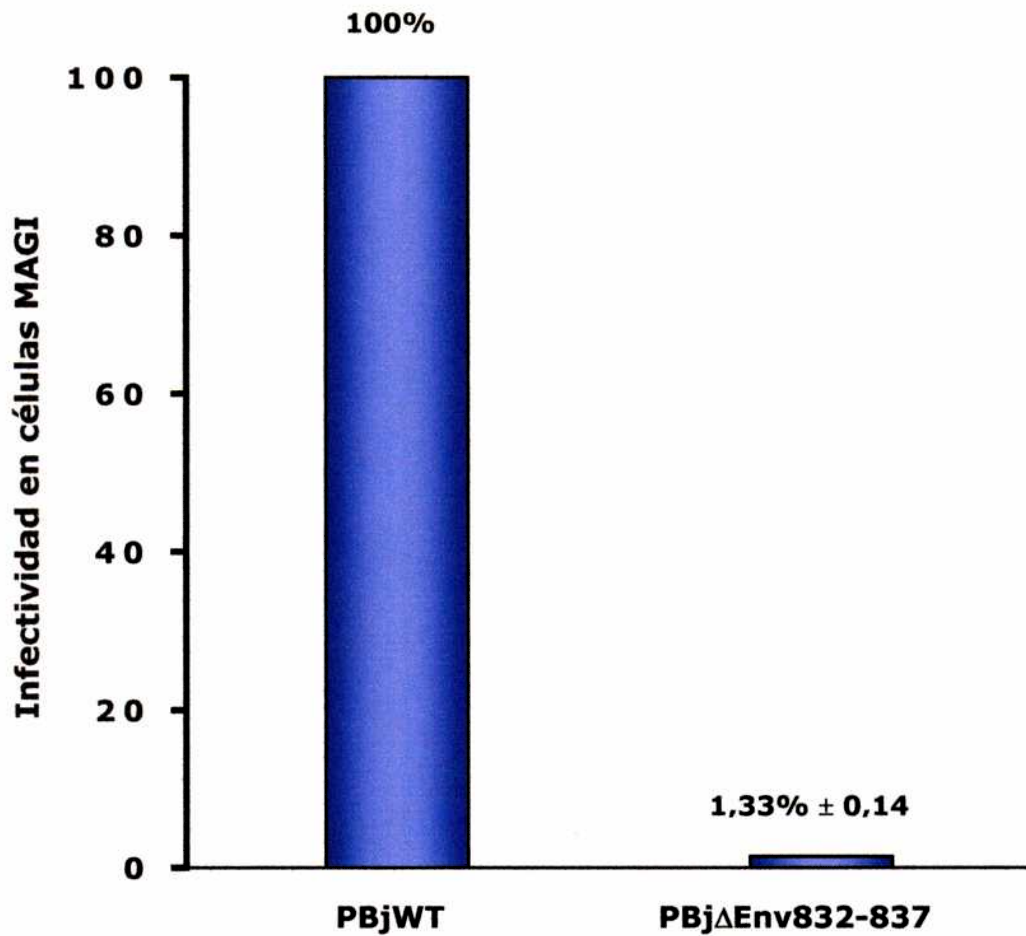


Figura III.3. Infectividad del virus mutante PBjΔEnv832-837 en células indicadoras MAGI-CCR5. Los sobrenadantes de transfección de células 293T conteniendo los virus PBjΔEnv832-837 o PBjWT fueron normalizados por actividad TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. A las 48 horas postinfección, las células se fijaron y se tiñeron *in situ* con X-Gal. El número de células azules obtenido para PBjΔEnv832-837 se refirió al obtenido para PBjWT (considerado 100%). Los datos presentados corresponden a la media y el desvío estándar de tres experimentos independientes.

III.3. REPLICACIÓN DEL VIRUS MUTANTE PBJ Δ ENV832-837 EN LA LÍNEA CELULAR LINFOIDEA CEMx174

Los resultados obtenidos hasta el momento demostraban que la mutación Δ Env832-837 reduce drásticamente tanto la incorporación de Env a viriones como la infectividad viral. Se decidió entonces estudiar el potencial replicativo del mutante PBJ Δ Env832-837 en células susceptibles CEMx174. En particular, se investigó la potencial emergencia de poblaciones virales revertantes conteniendo mutaciones secundarias que pudieran compensar la deficiencia del virus mutante. Para ello, se propagó el virus mutante PBJ Δ Env832-837 durante períodos prolongados de tiempo en células CEMx174.

Sobrenadantes de transfección de células 293T con los ADN provirales PBJWT o PBJ Δ Env832-837 fueron utilizados para infectar células CEMx174 como se describe en Materiales y Métodos (sección XVIII.1). Durante un período de 57 días se tomaron muestras de los sobrenadantes de infección cada 3 días y al final del experimento, se analizó la producción de virus, por medición de la actividad de TR, en cada una de las muestras tomadas. En la Figura III.4 se presenta la cinética de replicación del virus salvaje (PBJWT) y del virus mutante PBJ Δ Env832-837. El virus salvaje se replicó eficientemente en las células CEMx174 alcanzando un pico de actividad de TR (21ng/ml) a los 6 días postinfección. En cambio, durante los primeros 9 días postinfección no se detectó replicación del virus mutante PBJ Δ Env832-837. Sin embargo, la propagación del virus PBJ Δ Env832-837 durante un período de tiempo prolongado resultó en la detección de niveles modestos de actividad de TR a los 15 días postinfección (pico A), a los 27-33 días postinfección (pico B), y a los 39-45 días postinfección (pico C). Se obtuvo un perfil similar de replicación tanto para el virus mutante PBJ Δ Env832-837 como para el PBJWT al utilizar el ensayo MAGI de infectividad como parámetro de producción de viriones (datos no presentados).

La aparición de picos pequeños de actividad de TR a tiempos postinfección tardíos para el PBJ Δ Env832-837 sugirió la emergencia de poblaciones de virus revertantes. Para investigar esta hipótesis, los sobrenadantes de

cultivo correspondientes a los picos A, B y C, fueron utilizados para reinfectar células CEMx174. En paralelo, se reinfectaron células con el sobrenadante del pico de TR del PBJWT. Cada tres días, se tomaron muestras tanto de los sobrenadantes de cultivo como de las células infectadas y al final del experimento, se determinó la actividad de TR en cada punto como medida de producción viral. Como se muestra en la Figura III.5, las poblaciones A y C se replicaron con una cinética similar a la del virus salvaje, pero ligeramente retrasada (3 días). La población viral B mostró un perfil de replicación similar al de las poblaciones A y C (datos no presentados). Estos resultados indican que el pasaje del virus mutante PBJ Δ Env832-837 en células linfocíticas durante un período de tiempo prolongado resulta en la emergencia de poblaciones de virus revertantes.

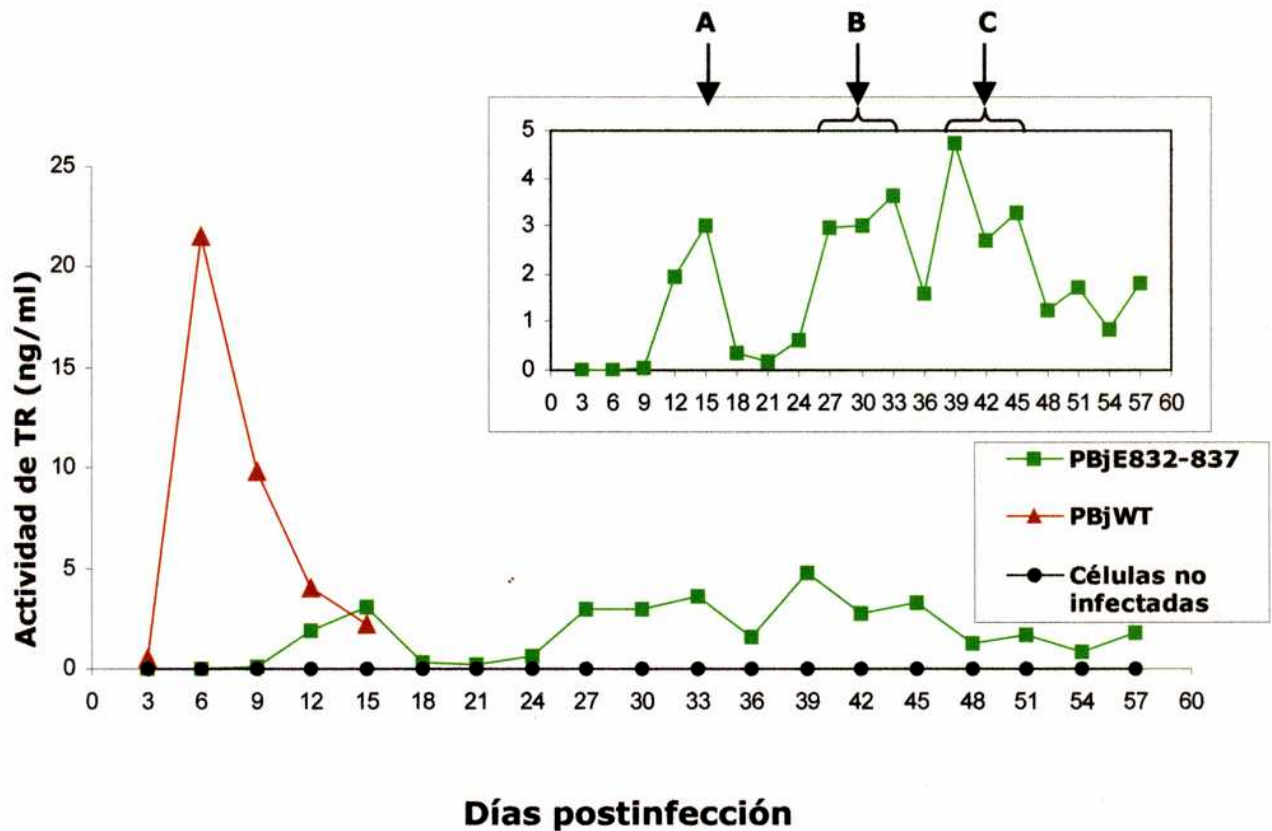


Figura III.4. Cinética de replicación de los virus PBj Δ Env832-837 y PBjWT en células CEMx174. Los sobrenadantes de células 293T transfectadas con los ADN provirales PBj Δ Env832-837 y PBjWT fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células CEMx174. Cada tres días se tomaron muestras de los sobrenadantes de infección y se filtraron a través de membranas de 0,45 μ m de poro. La producción de virus se evaluó por determinación de actividad de TR en los sobrenadantes de cultivo de cada punto. Como control negativo del ensayo de actividad de TR, se analizó la actividad de TR de un cultivo de CEMx174 no infectado que se propagó por igual período de tiempo (Células no infectadas). El resultado se expresó como masa de TR (ng)/volumen de sobrenadante de infección (ml). En detalle, se muestra la curva de replicación de PBj Δ Env832-837 expresada en menor escala para evidenciar los aumentos de actividad de TR. Las flechas indican las tres poblaciones virales (A, B y C) que poseen características de virus revertantes.

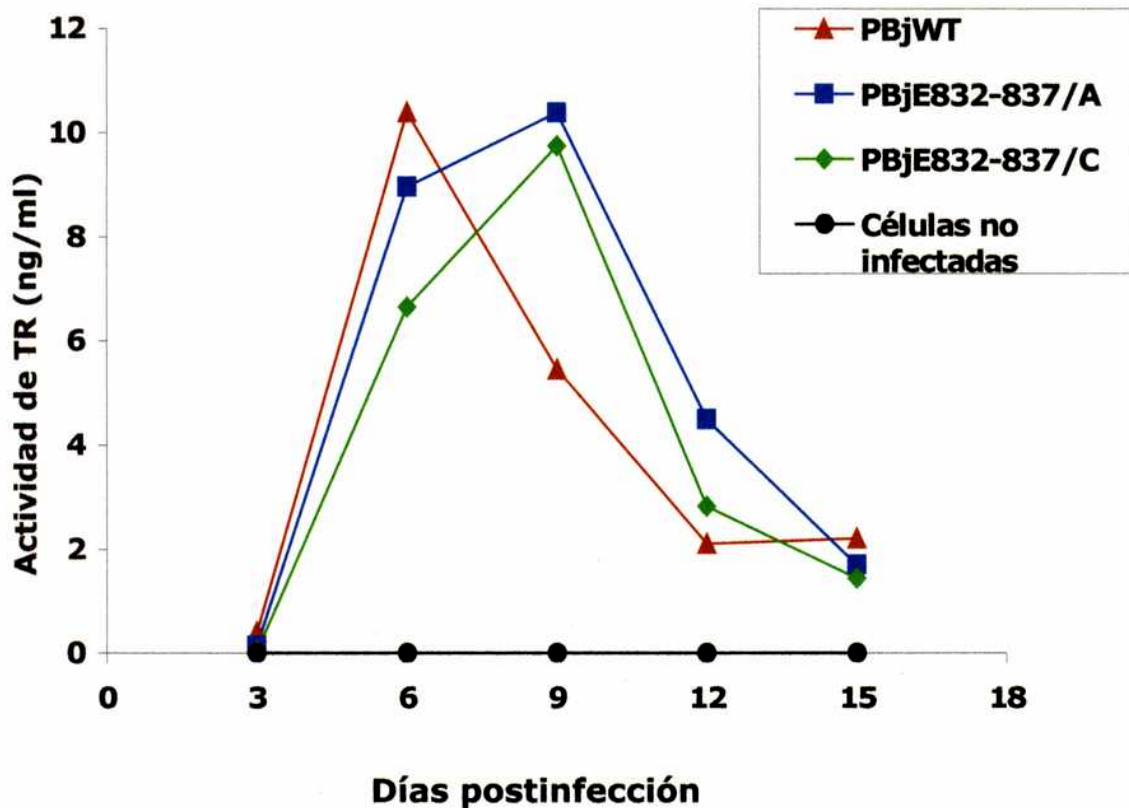


Figura III.5. Cinética de replicación de las poblaciones virales PBj Δ Env832-837 A y C. Los sobrenadantes de infección correspondientes a los picos de máxima actividad de TR de las poblaciones virales PBj Δ Env832-837 A y C fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar un cultivo fresco de células CEMx174. Cada tres días, se tomaron muestras de los sobrenadantes de cultivo y se guardaron a -80°C hasta el final del experimento. Los sobrenadantes recuperados fueron analizados para determinar actividad de TR. La actividad de TR se expresó como ng de TR /ml de sobrenadante. Como control negativo, se determinó la actividad de TR en un cultivo de células CEMx174 no infectadas que se propagaron por igual período de tiempo.

III.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES VIRALES REVERTANTES

Para identificar los cambios genéticos en las poblaciones revertantes que permitieron compensar el defecto replicativo causado por la delección original $\Delta\text{Env}832-837$, se decidió analizar las secuencias del CD de la proteína Env de estos virus. Se analizó además en los virus revertantes la región codificante para la proteína MA de SIV, pues se ha descrito recientemente en HIV-1 que el defecto replicativo causado por una mutación en el CD de la proteína TM era compensado por un único cambio aminoacídico en la proteína MA (Murakami & Freed, 2000a). Se purificó entonces el ADN genómico de las células CEMx174 infectadas correspondientes al día de mayor producción de actividad de TR para cada una de las poblaciones virales revertantes (Figura III.5). El ADN purificado se utilizó como templado para amplificar las regiones codificantes para el CD de la proteína Env y para la proteína MA. Los fragmentos de amplificación resultantes fueron clonados en el vector pUC19 y se secuenciaron por lo menos 6 clones independientes para cada una de las poblaciones virales revertantes (Tabla III.1). Todos los clones analizados conservaron la delección original $\Delta 832-837$ en el gen *env* (Figura III.6). En el caso de los clones derivados de la población A, todos presentaron una mutación secundaria que introduce un codón de terminación en la posición correspondiente al residuo de tirosina 778 de Env (mutación Y778Stop, Tabla III.1 y Figura III.6). Por otro lado, en la población C la mayoría de los clones presentaron un codón de terminación en la posición correspondiente al residuo triptofano 774 de Env (W774Stop). La mutación Y778Stop resulta en un acortamiento del CD a una longitud de 52 aminoácidos respecto de los 164 residuos que posee el CD salvaje, mientras que la mutación W774Stop resulta en un acortamiento aún mayor del CD dejándolo sólo con 48 residuos. Los clones derivados de la población B contenían la mutación secundaria Y778Stop o la W774Stop. Llamativamente, un clon derivado de este punto presentó ambas mutaciones en la misma molécula.

Por otro lado, el análisis de las secuencias codificantes para la proteína MA de los clones correspondientes a cada población revertante mostró que todos los virus contenían una secuencia idéntica a la codificada por el virus salvaje.

Estos resultados indican que la propagación prolongada del virus mutante PBJ Δ Env832-837 en células CEMx174 resulta en la aparición independiente de dos poblaciones revertantes que difieren en la longitud de la proteína Env que codifican.

Población de virus revertantes	Mutación ^a	Cambio aminoacídico en la glicoproteína Env ^b	Número de clones ^c
A	TAT $\underline{\text{T}}$ →TAA $\underline{\text{A}}$ (8699)	Y778→Stop	6 (6)
B	TAT $\underline{\text{T}}$ →TAA $\underline{\text{A}}$ (8699)	Y778→Stop	5
	TGG $\underline{\text{T}}$ →TAG $\underline{\text{G}}$ (8686)	W774→Stop	3
	TAT $\underline{\text{T}}$ →TAA $\underline{\text{A}}$ (8699)/ TGG $\underline{\text{T}}$ →TAG $\underline{\text{G}}$ (8686)	Y778→Stop/ W774→Stop	1 (9)
C	TAT $\underline{\text{T}}$ →TAA $\underline{\text{A}}$ (8699)	Y778→Stop	1
	TGG $\underline{\text{T}}$ →TAG $\underline{\text{G}}$ (8686)	W774→Stop	5 (6)

Tabla III.1. Análisis de las mutaciones secundarias encontradas en la secuencia que codifica para el dominio citoplasmático de la glicoproteína Env en las poblaciones revertantes A, B y C. El ADN genómico aislado a partir de células CEMx174 infectadas correspondientes al punto de máxima actividad de TR de las poblaciones A, B y C (Figura III.5), se utilizó para amplificar la región que codifica para el CD de la glicoproteína Env.

^a Se indica, para cada población, la mutación puntual encontrada y la posición en el genoma viral del nucleótido que presenta el cambio.

^b Se indica el cambio aminoacídico que produce la mutación puntual expresado en código de una letra.

^c Se indica el número de clones que presentaron la mutación y entre paréntesis el número total de clones analizados para cada población revertante.

	772	840
PBjWT	WPWQIEYIHFLIRQLIRLLTWLFSSCRDWLLRNCQTLQPVLSLSRTLQFQAREVIRVQIAYLQYGWRYL	
PBj		
$\Delta E_{832-837}$	WPWQIEYIHFLIRQLIRLLTWLFSSCRDWLLRNCQTLQPVLSLSRTLQFQAREVIRVQIA.....RYL	

PBj $\Delta Env_{832-837}$ /A

6 dones -----*-----.....-----

PBj $\Delta Env_{832-837}$ /B

5 dones -----*-----.....-----

3 dones --*-----.....-----

1 don --*--*-----.....-----

PBj $\Delta Env_{832-837}$ /C

5 dones --*-----.....-----

1 don -----*-----.....-----

Figura III.6. Secuencia aminoacídica del dominio citoplasmático de Env en las poblaciones de virus revertantes A, B y C. Se presenta la secuencia aminoacídica, en código de una letra, correspondiente a los residuos 772 a 840 de la glicoproteína Env del virus salvaje (PBjWT) y se indica la delección $\Delta 832-837$ (*) en el virus mutante PBj $\Delta Env_{832-837}$. Abajo, se presentan las secuencias de la región CD obtenidas para cada población de virus revertantes. Con el símbolo (-) se indica identidad de secuencia aminoacídica y con asterisco (*) la posición del codón de terminación presente en los dones.

III.5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CLONES MOLECULARES DE SIV LLEVANDO LAS MUTACIONES Y778STOP O W774STOP JUNTO CON LA DELECIÓN Δ 832-837

El análisis de la secuencia del CD de las proteínas Env de las poblaciones revertantes obtenidas por propagación del PBj Δ Env832-837 en células CEMx174 mostró la aparición de dos cambios secundarios compensatorios: la mutación Y778Stop o la W774Stop. Sin embargo, no podía descartarse la posibilidad de que hubieran aparecido otros cambios secundarios en otras regiones del genoma viral que contribuyeran al fenotipo revertante exhibido por las poblaciones A, B y C. Por esto, y con el fin de evaluar si las mutaciones secundarias Y778Stop y W774Stop son las responsables del fenotipo revertante, se decidió introducir dichas mutaciones en el contexto del ADN proviral PBj Δ Env832-837 y analizar el fenotipo de los virus resultantes. Para ello, se construyeron ADN provirales llevando las mutaciones dobles Δ 832-837/Y778Stop y Δ 832-837/W774Stop en el gen *env*. Las construcciones resultantes se utilizaron para transfectar células 293T y los stocks virales obtenidos fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. La infectividad de los mutantes PBj Δ Env832-837/Y778Stop y PBj Δ Env832-837/W774Stop fue 2 y 1,7 veces superior, respectivamente, a la infectividad presentada por el virus salvaje (Figura III.7).

Se comparó también la cinética de replicación en células CEMx174 de estos dobles mutantes con respecto a la del virus salvaje. Como se muestra en la Figura III.8, los virus mutantes PBj Δ Env832-837/Y778Stop y PBj Δ Env832-837/W774Stop alcanzaron niveles de actividad de TR en el pico de propagación superiores al obtenido por el virus salvaje (PBjWT), si bien el pico de TR fue alcanzado por los virus mutantes con un leve retraso de dos días respecto de PBjWT.

Se evaluó entonces si la recuperación de la capacidad replicativa exhibida por los virus mutantes PBj Δ Env832-837/W774Stop y PBj Δ Env832-837/Y778Stop respecto del fenotipo defectivo del virus original PBj Δ Env832-837 era acompañada también por una reversión del bloqueo en la

incorporación de la proteína Env a viriones. Para ello, se transfectaron células 293T con los ADN provirales PBjWT, PBj Δ Env832-837/W774Stop o PBj Δ Env832-837/Y778Stop y se analizaron las proteínas virales presentes tanto en lisados celulares como en viriones por Western blot. Estos ensayos mostraron que las glicoproteínas Env mutantes Δ Env832-837/Y778Stop y Δ Env832-837/W774Stop se incorporaron eficientemente a viriones (Figura III.9). La cuantificación de las proteínas virales presentes en viriones indicó que en los mutantes PBj Δ Env832-837/Y778Stop y PBj Δ Env832-837/W774Stop los niveles de TM incorporados eran 5 veces superiores respecto del nivel de TM en los viriones salvajes (Figura III.9, Parte A, Viriones). Esto contrasta con el fenotipo defectivo de incorporación de Env a viriones causado por la mutación original Δ Env832-837 (comparar con la Figura III.2).

En conclusión, estos estudios demuestran que las mutaciones Y778Stop y W774Stop en el gen *env* de SIV son suficientes para revertir el bloqueo en la incorporación de Env a viriones y en la replicación viral causado por la delección Δ Env832-837.

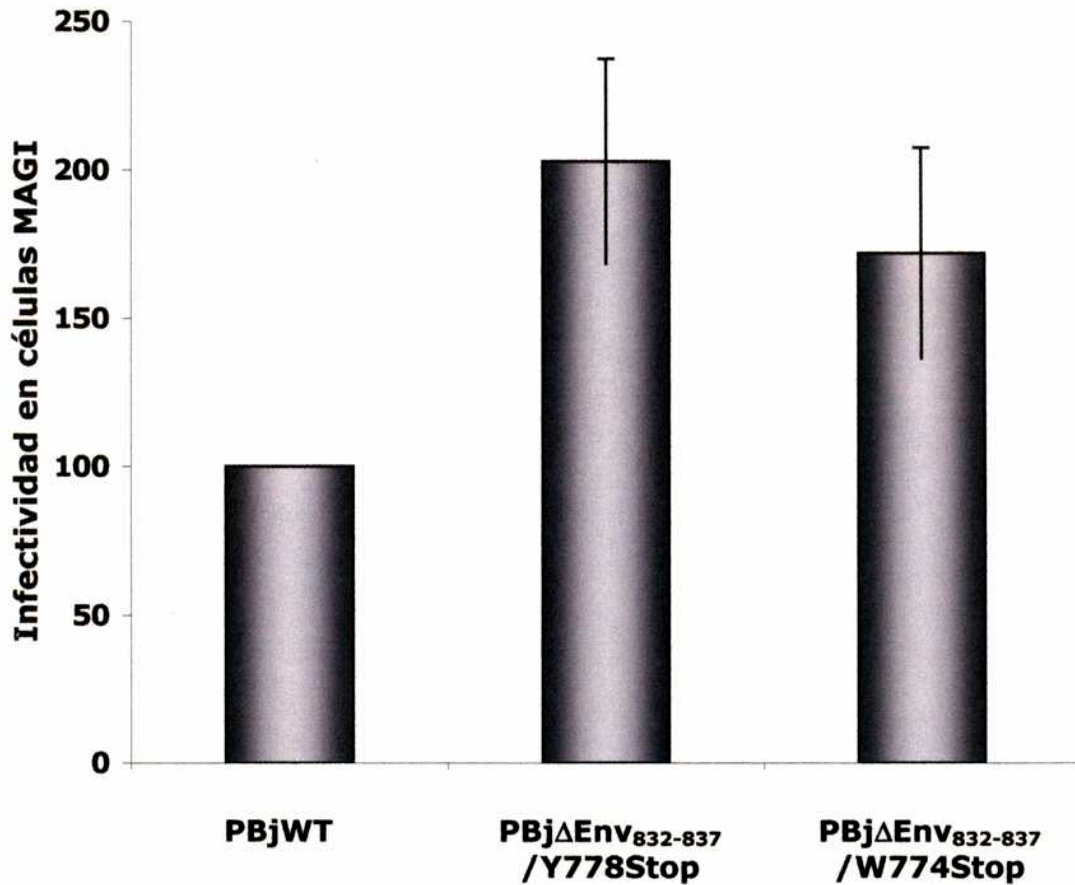


Figura III. 7. Infectividad en células MAGI-CCR5 de los viriones PBj Δ Env₈₃₂₋₈₃₇/Y778Stop y PBj Δ Env₈₃₂₋₈₃₇/W774Stop. Los sobrenadantes de transfección de células 293T conteniendo los virus PBj Δ Env₈₃₂₋₈₃₇/Y778Stop, PBj Δ Env₈₃₂₋₈₃₇/W774Stop o salvaje (PBjWT) fueron normalizados por actividad TR y utilizados para infectar células indicadoras MAGI-CCR5. A las 48 horas postinfección, las células MAGI-CCR5 se fijaron y se tiñeron *in situ* con X-Gal. El número de células azules obtenido para los virus mutantes se refirió al obtenido para el virus salvaje (considerado 100%). Los datos presentados corresponden a la media y el desvío estándar de cuatro experimentos independientes.

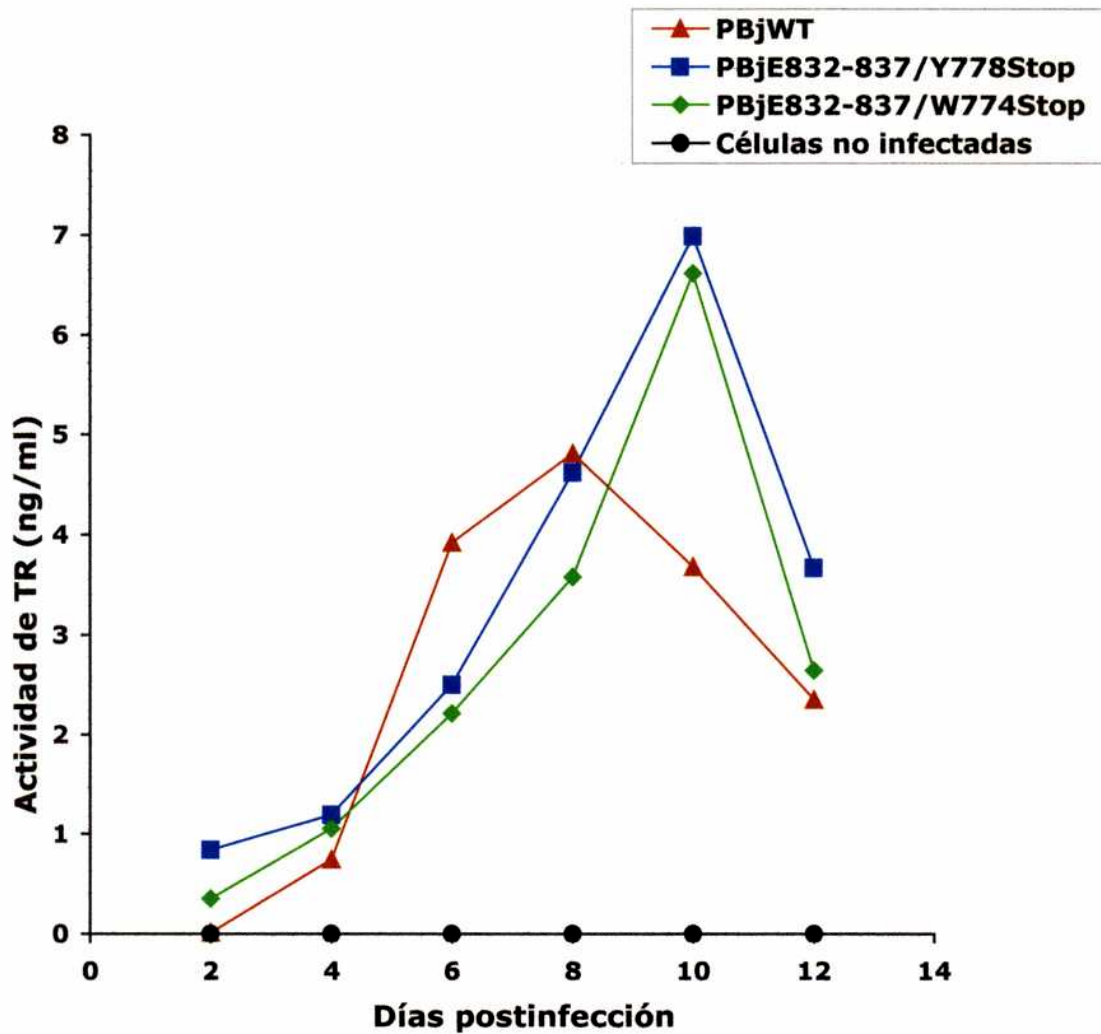


Figura III.8. Cinética de replicación de los clones moleculares PBj Δ Env832-837/Y778Stop y PBj Δ Env832-837/W774Stop. Los sobrenadantes de transfección de células 293T conteniendo los virus PBj Δ Env832-837/Y778Stop, PBj Δ Env832-837/W774Stop o PBjWT fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células CEMx174. Cada dos días, se tomaron muestras de los sobrenadantes de infección y al final del experimento se determinó la actividad de TR en alícuotas de los sobrenadantes de las células infectadas. Como control, se determinó la actividad de TR en las células CEMx174 no infectadas propagadas por igual período de tiempo. Los resultados se expresaron en ng de TR / ml de sobrenadante de infección.

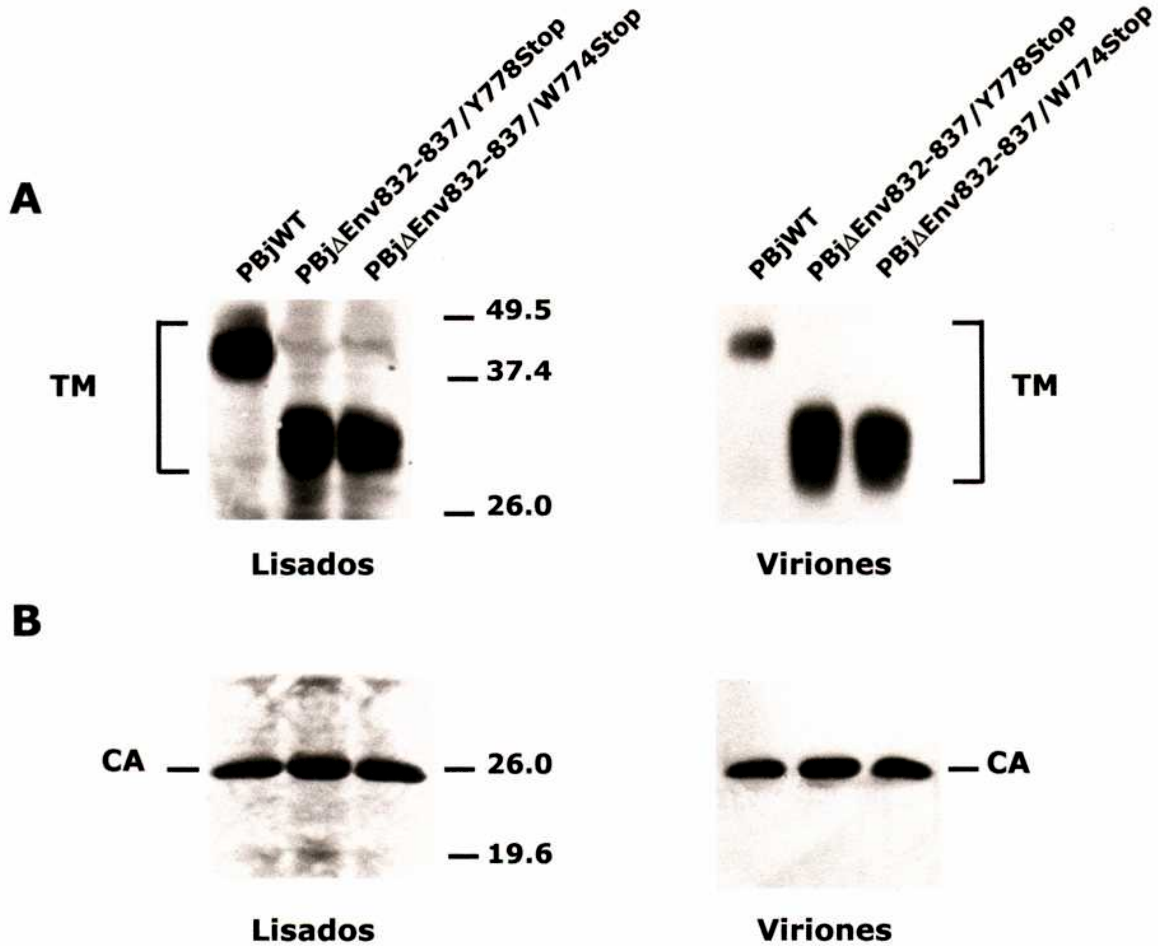


Figura III.9. Efecto sobre la incorporación de la proteína Env a viriones de las mutaciones Y778Stop y W774Stop expresadas en el contexto del virus PBjΔEnv832-837. Se transfectaron células 293T con los clones moleculares SIVsmmPBj1.9 (PBjWT) o PBjΔEnv832-837/Y778Stop o PBjΔEnv832-837/W774Stop. A las 48 horas postransfección, se prepararon los lisados celulares y se purificaron los viriones por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa. Las proteínas virales de los lisados celulares y de viriones fueron resultas por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Para la detección de las proteínas virales, se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos monoclonales contra las proteínas TM (**A**) o CA (**B**) de SIV. Se indican las movilidades de las proteínas TM, CA y de los marcadores de peso molecular (en kDa).

III.6. CAPACIDAD FUSOGENICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS ENV Δ 832-837/Y778STOP O Δ 832-837/W774STOP

La entrada de HIV y SIV a las células blanco está mediada por interacciones entre la glicoproteína viral Env y los dos componentes del receptor celular. Este evento dispara la fusión entre la membrana viral y la membrana plasmática de la célula blanco durante la infección. Sin embargo, ésta no es la única vía a través de la cual el virus se disemina. Existe un mecanismo de diseminación viral célula-célula que permite evitar el medio extracelular y que es producto de la fusión de las membranas de células infectadas que expresan en su superficie la glicoproteína Env con la de células que presentan en su superficie el complejo receptor-correceptor. Esta propiedad de la glicoproteína viral Env de mediar la fusión de membranas celulares es utilizada para evaluar la capacidad fusogénica de esta proteína. Se decidió entonces estudiar la capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env Δ 832-837/Y778Stop y Δ 832-837/W774Stop.

El ensayo de fusión utilizado consiste en transfectar células 293T con una construcción que dirige la síntesis de las proteínas Env, Tat y Rev. A las 48 horas postransfección, las células transfectadas se cocultivan con células indicadoras MAGI-CCR5. Si la glicoproteína Env en estudio es capaz de reconocer el complejo receptor-correceptor (CD4-CCR5) en la superficie de las células indicadoras y de mediar la fusión de membranas celulares, la proteína Tat, expresada originalmente en las células transfectadas, difundirá a las células MAGI-CCR5 y activará el promotor LTR que controla la expresión de la enzima β -Gal. Luego de la tinción *in situ* con X-Gal, se determina el número promedio de sincicios azules, así como el número promedio de núcleos por sincicio.

Plásmidos dirigiendo la expresión de las proteínas Tat, Rev y cada una de las proteínas Env siguientes: salvaje (WT), Δ 832-837, Δ 832-837/Y778Stop o Δ 832-837/W774Stop (ver Materiales y Métodos, sección XX), fueron utilizados para transfectar células 293T. A las 48 horas postransfección, las células transfectadas fueron recuperadas y agregadas en una relación 1:10 a células MAGI-CCR5. Luego de la fijación de las células y tinción con X-Gal,

los sincicios azules fueron cuantificados. Los datos obtenidos mostraron que las glicoproteínas Env mutantes $\Delta 832-837/Y778Stop$ y $\Delta 832-837/W774Stop$ son más eficientes en mediar la fusión célula-célula que la proteína Env salvaje o la mutante $\Delta 832-837$ (Tabla III.2 y Figura III.10). Este aumento en la capacidad fusogénica de las Env mutantes $\Delta 832-837/Y778Stop$ y $\Delta 832-837/W774Stop$ se refleja en un incremento del número de sincicios/campo así como en un mayor número promedio de núcleos por sincicio.

Estos resultados indican que el acortamiento del CD de la proteína TM a 52 o 48 residuos, que resulta de la aparición de las mutaciones Y778Stop o W774Stop, incrementa la capacidad fusogénica de la glicoproteína viral Env de SIV.

Proteína Env	Capacidad fusogénica relativa^a	Número de núcleos por sincicio^b
WT	100	11,6 ± 3,3
Δ832-837	102 ± 19	11,2 ± 3,7
Δ832-837/Y778Stop	201 ± 19	38,7 ± 16,7
Δ832-837/W774Stop	159 ± 24	30,7 ± 10,7

Tabla III.2. Análisis de la capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env de SIV con las mutaciones Δ832-837, Δ832-837/Y778Stop y Δ832-837/W774Stop. Se transfectaron células 293T con las construcciones dirigiendo la síntesis de las proteínas Tat y Rev y una de las glicoproteínas Env siguientes: salvaje (WT), Δ832-837, Δ832-837/Y778Stop o Δ832-837/W774Stop. A las 48 horas postransfección, las células fueron disgregadas y agregadas en relación 1:10 a monocapas de células indicadoras MAGI-CCR5. Luego de 18-24 horas, las células se fijaron y se tiñeron con X-Gal.

^a Para el cálculo de la capacidad fusogénica relativa de cada proteína Env mutada, se realizó el recuento del número de sincicios (considerados como aquellas estructuras celulares con al menos 5 núcleos) por campo visual en por lo menos 20 campos y el número promedio de sincicios se refirió al número obtenido para la Env salvaje (considerado como 100%).

^b Se seleccionaron al azar por lo menos 20 sincicios y se determinó el número promedio de núcleos por sincicio.

Los resultados presentados se obtuvieron a partir de 3 experimentos de transfección independientes y cada ensayo fue realizado por triplicado.

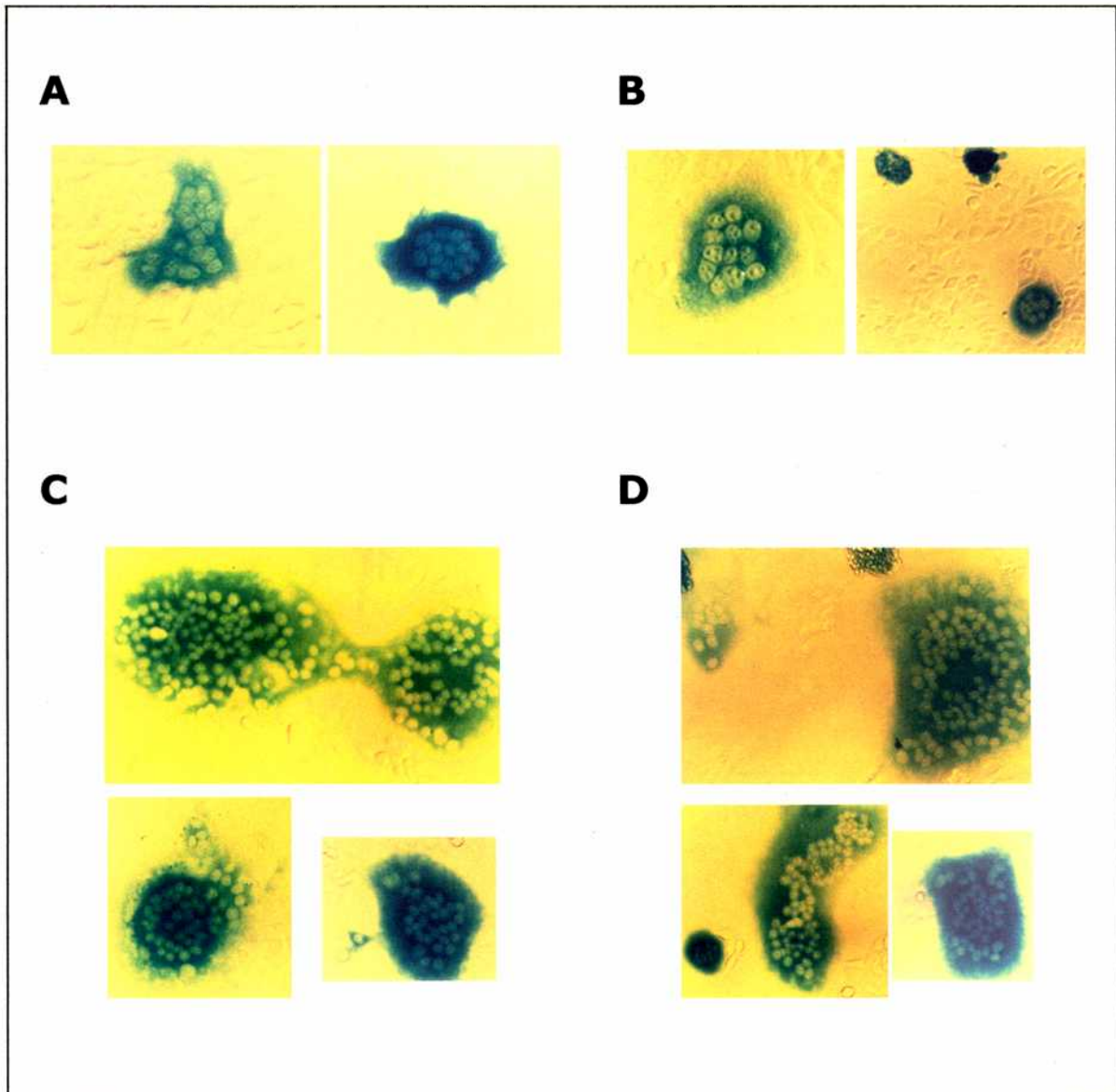


Figura III.10. Efecto de las mutaciones $\Delta 832-837/Y778Stop$ y $\Delta 832-837/W774Stop$ sobre la capacidad fusogénica de Env. Masas sinciciales obtenidas por cocultivo de monocapas de células indicadoras MAGI-CCR5 con las células 293T expresando las glicoproteínas Env: salvaje (**A**), $\Delta 832-837$ (**B**), $\Delta 832-837/Y778Stop$ (**C**) o $\Delta 832-837/W774Stop$ (**D**). Las fotografías fueron tomadas con luz blanca y con un aumento de 200x, salvo las mostradas en la parte **A** y la de la izquierda en **B** que fueron tomadas con un aumento de 400x.

DISCUSIÓN

Las glicoproteínas de envoltura de SIV y HIV cumplen funciones que son críticas para la replicación viral y la patogénesis, siendo además estas proteínas el blanco de la respuesta inmune del hospedador. Por esto, el análisis del proceso de incorporación de la glicoproteína Env a los viriones es relevante no sólo para alcanzar una mayor comprensión de las estrategias replicativas de los virus SIV y HIV, sino también para el desarrollo racional de estrategias antivirales. SIV y HIV poseen glicoproteínas Env con dominios citoplasmáticos particularmente largos, de 164 y 150 residuos, respectivamente, que los diferencia del resto de los retrovirus cuyas glicoproteínas Env poseen CDs de 20 a 40 residuos. Las partículas de SIV y HIV deben entonces acomodar glicoproteínas Env con dominios citoplasmáticos inusualmente largos en la estructura de la partícula que forma el precursor Gag durante la morfogénesis viral. La proximidad espacial entre el CD de la glicoproteína Env y la proteína MA, que se encuentra inmediatamente por debajo de la envoltura viral, ha llevado a proponer la existencia de una interacción entre estos dos dominios. Estudios realizados en SIV y HIV sugieren que la incorporación de Env a viriones resulta de la interacción entre el dominio MA de Gag y el CD de la glicoproteína Env: la coexpresión de las proteínas MA y Env de SIV utilizando el sistema del virus vaccinia resulta en el ensamblado de partículas pseudovirales capaces de incorporar la glicoproteína Env (González *et al.*, 1993); mutaciones tanto en el dominio MA de SIV como en el de HIV-1 interfieren con la incorporación de Env a partículas (Dorfman *et al.*, 1994b; Freed & Martin, 1995, 1996; González *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Ono *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1992); un único cambio aminoacídico en la proteína MA de HIV-1 fue suficiente para revertir el defecto en la incorporación y en la infectividad viral impuesto por una pequeña delección en el CD de TM (Murakami & Freed, 2000a); un anticuerpo monoclonal específico para la proteína Gag de SIV fue capaz de coinmunoprecipitar las proteínas Gag y Env a partir de células permeabilizadas con saponina (Vincent *et al.*, 1999); se ha demostrado una asociación específica entre la proteína MA y el CD de Env de HIV-1 utilizando ensayos de interacción *in vitro* (Cosson, 1996). En esta misma línea de evidencias, nuestro

laboratorio ha demostrado recientemente que ciertas mutaciones en el extremo amino de la proteína MA de SIV incrementan significativamente los niveles de incorporación de Env a viriones, confiriendo a los mismos una mayor capacidad infectiva y replicativa (Manrique *et al.*, 2003).

En este trabajo de Tesis se investigó el rol que cumple el dominio citoplasmático de la subunidad TM de SIV tanto en el proceso de incorporación de Env a viriones como en la infectividad viral. Para ello, se siguieron dos estrategias diferentes de mutagénesis dirigida del gen *env* de SIV: por un lado, se introdujeron en el CD de la proteína TM pequeñas deleciones internas de 4 a 7 aminoácidos respetando el marco de lectura, y por otro lado, se realizaron acortamientos progresivos de 20 residuos desde el extremo carboxilo del CD.

Las deleciones introducidas en el tercio amino terminal (mutaciones $\Delta E9$ a $\Delta E12$) y en la región central (mutaciones $\Delta E1$ a $\Delta E3$) del CD de la proteína Env no afectaron la incorporación de Env a viriones ni la infectividad viral. En cambio, las deleciones en el tercio carboxilo terminal del CD de la proteína TM (mutaciones $\Delta E4$ a $\Delta E8$) redujeron significativamente tanto la incorporación de Env a partículas como la infectividad viral, sin afectar la síntesis, el procesamiento ni la expresión en la superficie celular de Env.

En base a los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta las evidencias en favor de una interacción entre la proteína MA y el CD de Env mencionadas antes, se puede especular que las deleciones $\Delta E4$ a $\Delta E8$ podrían remover residuos específicos involucrados en la interacción MA/Env, impidiendo así la incorporación de Env a las partículas virales. Por otro lado, y al no contarse con información estructural sobre la conformación que adquiere el CD, cabe también la posibilidad de que alguna de estas deleciones modifique la accesibilidad de los aminoácidos del CD que participan en la interacción con la proteína MA. Teniendo en cuenta que podrían existir factores celulares que faciliten la interacción Gag/Env, no puede descartarse que alguna de las deleciones $\Delta E4$ a $\Delta E8$ pueda interferir con el reclutamiento por parte del CD de Env de factores celulares que modulen la incorporación de Env a viriones. En este sentido, se describió que la incorporación a viriones de una glicoproteína Env de HIV-1 con una mutación en el CD era dependiente de

la línea celular en la cual se ensayaba la replicación del virus (Murakami & Freed, 2000b), sugiriendo que algún factor presente en ciertas líneas celulares podría intervenir en la asociación de Env a viriones.

El concepto de que dominios en el tercio carboxilo terminal del CD de Env de SIV son necesarios para la incorporación de Env a viriones, elaborado a partir de la caracterización en esta Tesis de los mutantes de delección interna de Env, se halla también sustentado por los resultados obtenidos con las proteínas Env truncadas. El acortamiento progresivo desde el extremo carboxilo de la proteína TM de SIV permitió analizar cómo pequeñas variaciones en la longitud del CD afectan tanto la incorporación de Env a partículas como la infectividad viral. El estudio del fenotipo exhibido por estos 7 mutantes de la proteína Env permitió determinar que la sola eliminación de los últimos 20 residuos del extremo carboxilo del CD (mutante CD144) es suficiente para bloquear la incorporación de Env a partículas. La eliminación progresiva de 40, 60 u 80 residuos desde el extremo carboxilo (mutantes CD124 a CD84) produjo un fenotipo defectivo similar al descrito para la glicoproteína CD144, siendo indetectables los niveles de incorporación de Env a partículas y de infectividad. Estas glicoproteínas Env mutantes se expresan eficientemente en la superficie celular, lo cual permite descartar que su incapacidad de asociarse a partículas sea producto de un defecto en su transporte a la membrana plasmática.

Merece ser destacado el fenotipo observado para la proteína Env mutante CD64 cuyo CD carece de los 100 residuos carboxilo terminales. Esta glicoproteína mutante se incorpora a partículas en niveles similares a los de la Env salvaje. Sin embargo, los viriones portadores de la Env CD64 no fueron infectivos en el ensayo de ciclo único en células MAGI-CCR5. Este resultado sugiere que, aunque la glicoproteína CD64 se incorpora eficientemente a las partículas virales, lo hace de una manera biológicamente inactiva, pues es incapaz de mediar la entrada de los viriones a las células blanco. En este sentido, se ha descrito que ciertas mutaciones en el CD de la glicoproteína Env de HIV-1 inhiben la infectividad

viral sin afectar la incorporación de Env a viriones (Murakami & Freed, 2000a; Piller *et al.*, 2000).

Resulta interesante comparar los fenotipos de las proteínas Env mutantes CD64 y CD44, cuyos CDs difieren en longitud en tan sólo 20 aminoácidos. La remoción de los 120 residuos carboxilo terminales del CD (mutación CD44) produjo un gran incremento tanto de los niveles de asociación de Env a partículas como de la infectividad viral (superior a 10 veces) en comparación con los observados en los mismos ensayos con la glicoproteína Env salvaje. Un fenotipo similar al del mutante CD44 se observó al acortar el CD a un tamaño de 24 aminoácidos (mutante CD24).

La caracterización fenotípica de las glicoproteínas Env con deleciones internas en su CD o con CDs truncados presentada en este trabajo de Tesis demuestra la importancia del tercio carboxilo terminal del CD de la proteína Env de SIV en la incorporación de esta proteína a viriones. Sin embargo, proteínas Env con CDs cortos de 44 o 24 residuos exhiben una capacidad de asociación a partículas significativamente superior a la de la Env salvaje. Para conciliar estas observaciones, puede proponerse que el mecanismo a través del cual se incorporan a viriones glicoproteínas Env con CDs cortos es diferente del utilizado por la proteína Env salvaje, con un CD largo de 164 aminoácidos. Las proteínas Env con CDs cortos probablemente eluden tanto las interacciones Gag/Env que normalmente median la asociación de Env salvaje a viriones, así como las restricciones estéricas impuestas por la oligomerización de Gag en la estructura de la partícula viral. En favor de este argumento, hemos demostrado previamente que mutaciones en el dominio MA de Gag de SIV que bloquean la incorporación de la glicoproteína Env salvaje a viriones, no interfieren con la incorporación de proteínas Env con CDs de 18 aminoácidos (González *et al.*, 1996) o de 44 residuos de longitud (Manrique *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que las partículas de HIV-1 son capaces de incorporar glicoproteínas Env de otros retrovirus no relacionados únicamente si presentan CDs cortos (Mammano *et al.*, 1995). Sin embargo, aunque las glicoproteínas Env con CDs cortos pueden asociarse a las partículas virales, este proceso ocurre de manera aparentemente desregulada, pues los niveles de incorporación de Env a

viriones y la infectividad son muy superiores a los conferidos por la glicoproteína Env salvaje.

Durante la caracterización de las proteínas Env mutantes construidas en este trabajo de Tesis, resultó de gran interés el fenotipo exhibido por la mutante $\Delta E4$, en la cual se eliminaron los residuos 832 a 837 de la glicoproteína Env de SIV. Esta delección en el CD bloqueó la incorporación de Env a viriones, reduciendo drásticamente la infectividad viral. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto que produce esta delección sobre la capacidad replicativa del virus en la línea linfoidea CEMx174, la cual es altamente susceptible a la infección con SIV. El virus PBJ Δ Env832-837 fue incapaz de replicarse en células CEMx174. Sin embargo, al cultivar las células infectadas inicialmente con este virus por un período prolongado de tiempo emergieron 3 poblaciones virales revertantes. Estas poblaciones, correspondientes a los 15, 27-33 y 39-45 días postinfección, presentaron una cinética de replicación similar a la del virus salvaje al ser utilizadas para infectar cultivos frescos de células CEMx174. El análisis por secuenciación de las regiones que codifican para el CD de las proteínas Env de estas poblaciones virales reveló la aparición de mutaciones secundarias adicionales a la delección original. En la primera población, el cambio nucleotídico detectado fue T→A en la posición 8699, mientras que en la última población viral el cambio fue G→A en la posición 8686 del genoma viral. Estos cambios resultaron en el reemplazo de los codones de tirosina 778 o de triptófano 774 por codones de terminación, lo que genera glicoproteínas Env truncadas con CDs de 52 o 48 residuos de longitud, respectivamente. La segunda población revertante, que surgió a los 27-33 días postinfección, se hallaba compuesta por virus conteniendo la mutación Y778Stop o la W774Stop, indicando que esta población representa una mezcla de virus genéticamente distintos. En esta segunda población, se encontraron evidencias de virus llevando ambas mutaciones secundarias en el mismo gen *env*. Estos virus podrían ser recombinantes originados por un mecanismo de "cambio de templado" de la TR durante la retrotranscripción de un genoma compuesto por dos moléculas de ARN diferentes empaquetadas en la misma partícula viral. Estos viriones con genomas

heterodiméricos podrían haberse originado como consecuencia de la coinfección de una misma célula con dos virus genéticamente distintos, uno llevando la mutación Y778Stop y el otro llevando la W774Stop. Aunque el mecanismo de recombinación es muy complejo, la frecuencia con que se detecta durante la replicación de SIV y HIV es muy alta, incluso mayor a la frecuencia de aparición de mutaciones puntuales (Hu & Temin, 1992; Vartanian *et al.*, 1991; Wain-Hobson *et al.*, 2003).

La caracterización de los clones moleculares PBj Δ Env832-837/Y778Stop y PBj Δ Env832-837/W774Stop, portadores de las mutaciones secundarias en el contexto del genoma del virus defectivo PBj Δ Env832-837, permitió comprobar que estos cambios secundarios son suficientes para restaurar la capacidad replicativa del virus, perdida por causa de la delección original Δ Env832-837. Este efecto sobre la replicación viral se vió acompañado por una reversión del defecto de incorporación de Env a viriones provocado por la delección original.

Del análisis de los resultados obtenidos surge el interrogante de porqué solamente surgieron virus revertantes con proteínas Env con CDs de 52 o 48 aminoácidos y no se seleccionaron revertantes con CDs de otra longitud. Una explicación surge del estudio de la serie de glicoproteínas Env truncadas realizado en esta Tesis. Glicoproteínas Env con CDs de 144 a 84 residuos no son incorporadas a las partículas virales, mientras que una Env con un CD de 64 residuos es incorporada a los viriones, pero en una forma biológicamente inactiva ya que no es capaz de mediar la entrada del virus a la célula. En cambio, una glicoproteína Env con un CD de 44 residuos permite la asociación de la glicoproteína viral a las partículas y confiere infectividad a los viriones. Esto permite explicar porqué el fenotipo defectivo impuesto por la delección Δ Env832-837 no podría haber sido complementado por la aparición de SIVs con CDs de 106 aminoácidos, los cuales resultarían de la aparición de un codón de terminación en el gen *env* inmediatamente por delante de la delección original: la glicoproteína Env resultante en este caso no podría ser incorporada a los viriones. Por esta misma razón, tampoco se podrían haber seleccionado virus revertantes con proteínas Env con CDs de 64 a 106 aminoácidos.

Se ha descrito la aparición de un codón de terminación en el gen *env* de SIV_{mac} que genera una glicoproteína viral con un CD de 18 residuos al propagar este virus en una línea celular T humana (Chakrabarti *et al.*, 1989; Hirsch *et al.*, 1989a; Kodama *et al.*, 1989). Este mecanismo surgiría para revertir un impedimento en la entrada del virus a una línea celular no permisiva expandiendo así el rango de huésped (Johnston *et al.*, 1993). En este trabajo de Tesis, se demuestra que la recuperación de la capacidad replicativa del mutante PBjΔEnv832-837 se debe también a la aparición de un codón de terminación prematuro en el gen *env*. Sin embargo, la longitud a la cual el CD de la proteína Env se acorta (52 o 48 aminoácidos) para revertir, en una línea celular susceptible, el defecto en la incorporación de Env a viriones y en la replicación causado por una delección en el CD es diferente de la descrita (18 aminoácidos) para permitir la entrada de un SIV salvaje a células no susceptibles.

Se han descrito aislamientos virales de SIV, como los SIV_{smmE543}, SIV_{mac17E-Fr} y SIV_{mac316} (Hirsch *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1992) que fueron obtenidos por pasaje reiterado de SIV en monos macacos y finalmente aislados de monos que desarrollaban neuropatologías asociadas al SIDA. Estos aislamientos se caracterizan por ser macrófago-trópicos en lugar de linfotrópicos como las cepas originales con las que se inocularon los monos. Estos virus aislados de cerebro y con tropismo por macrófagos poseen, entre otros cambios en la glicoproteína viral, dominios citoplasmáticos truncados. Estas evidencias indican que el acortamiento en la longitud del dominio citoplasmático de Env de SIV podría contribuir, junto con otros cambios aminoacídicos en Env, a un mecanismo utilizado naturalmente por el virus para ampliar su tropismo. En este sentido, se ha demostrado que el acortamiento del CD de HIV-1 produce cambios estructurales que se transmiten al ectodominio de la subunidad TM e incluso a la subunidad SU, apoyando la idea de una interdependencia estructural y funcional entre ambos dominios (Edwards *et al.*, 2002). En efecto, al acortar el CD de la proteína Env de HIV-1 a 27 aminoácidos se incrementa la sensibilidad del virus a la neutralización por anticuerpos monoclonales

dirigidos contra los sitios de la SU que unen CD4 y CXCR4 (Edwards *et al.*, 2002).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta Tesis a partir de los estudios de mutagénesis dirigida del gen *env* de SIV y de evolución forzada de un SIV defectivo, demuestran la importancia del dominio citoplasmático de la glicoproteína Env en la modulación de la infectividad viral.


CONCLUSIONES


La caracterización fenotípica realizada en esta Tesis de una serie de mutantes de la glicoproteína Env de SIV permitió establecer que:

- Deleciones internas en las regiones amino terminal y central del CD de la glicoproteína Env de SIV no afectan la asociación de Env a partículas ni la infectividad viral.
- En cambio, deleciones internas en el tercio carboxilo terminal del CD interfieren con el proceso de incorporación de Env a partículas y con la infectividad viral, sin afectar la síntesis, el procesamiento ni la expresión en la superficie celular de Env. El mismo fenotipo defectivo se obtiene al remover 20 a 100 aminoácidos desde el extremo carboxilo de Env. Estos resultados sugieren que dominios presentes en el tercio carboxilo terminal de la glicoproteína Env de SIV son necesarios para la incorporación de Env a partículas y, en consecuencia, para permitir la entrada del virus a la célula.
- Proteínas Env con CDs de 44 o 24 aminoácidos se incorporan a viriones con mayor eficiencia que la glicoproteína salvaje, incrementando por lo menos 10 veces la infectividad viral. Se propone en este caso que estas glicoproteínas Env con CDs truncados eluden las interacciones específicas con la proteína Gag y/o las restricciones estéricas impuestas por la estructura de la partícula viral, que sí son operativas durante el proceso de incorporación de la glicoproteína Env salvaje, con un CD de 164 aminoácidos.

Los estudios de evolución forzada del virus mutante PBj Δ Env832-837, en el cual la incorporación de Env a viriones y la infectividad se hallan inhibidas, permitieron establecer que la capacidad replicativa del virus es restaurada por mutaciones puntuales que causan el acortamiento del CD de Env a 52 o 48 aminoácidos. Estos resultados indican la importancia de variaciones en la longitud del CD de Env en la modulación de la infectividad viral e ilustran la capacidad adaptativa de SIV frente a presiones de selección.


CRISTINA CELMA


SILVIA A. GONZÁLEZ
DIRECTOR DE TESIS


138
JOSÉ L. APPORUCHINO
DIRECTOR ASISTENTE

BIBLIOGRAFÍA

- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E. & Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**: 853-864.
- Aldovini, A. & Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**: 1920-1926.
- Allan, J.S. (1991). Receptor-mediated activation of immunodeficiency viruses in viral fusion. *Science* **252**: 1322-1323.
- Ashorn, P.A., Berger, E.A. & Moss, B. (1990). Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cells. *J. Virol.* **64**: 2149-2156.
- Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P.A., Hahn, B.H. & Sharp, P.M. (2003). Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**: 1713.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**: 1209-1211.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871
- Bates, P. (1996). Chemokine receptors and HIV-1: An attractive pair?. *Cell* **86**: 1-3.
- Bernstein, H.B., Tucker, S.P., Hunter, E., Schutzbach, J.S. & Compans, R.W. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides. *J. Virol.* **68**: 463-468.
- Blacklow, S.C., Lu, M. & Kim, P.S. (1995). A trimeric subdomain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* **34**: 14955-14962.
- Boyd, M.T., Simpson, G.R., Cann, A.J., Johnson, M.A. & Weiss, R.A. (1993). A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J. Virol.* **67**: 3649-3652.
- Brown, D.A. & London, E. (2000). Structure and functions of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**: 17221-17224.
- Bryant, M. & Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 523-527.

Bukrinsky, M.I., Sharova, N., McDonald, T.L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W.G. & Stevenson, M. (1993). Association of integrase, matrix and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6125-6129.

Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P. & Luban, J. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J. Virol.* **73**: 8527-8540.

Bültmann, A., Eberle, J. & Haas, J. (2000). Ubiquitination of the human immunodeficiency virus type 1 Env glycoprotein. *J. Virol.* **74**: 5373-5376.

Bültmann, A., Muranyi, W., Seed, B. & Haas, J. (2001). Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* **75**: 5263-5276.

Carter, C.A. (2002). Tsg101: HIV-1's ticket to ride. *TRENDS Microbiol* **10**, 203-205.

Carr, C.M. & Kim, P.S. (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **73**: 823-832.

Cayabyab, M., Karlsson, G.B., Etemad-Moghadam, B.A., Hofmann, W., Steenbeke, T., Halloran, M., Fanton, J.W., Axthelm, M.K., Letvin, N.L. & Sodroski, J. (1999). Changes in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins responsible for the pathogenicity of a multiply passaged simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2). *J. Virol.* **73**: 976-984.

Chackerian, B., Long, E.M., Luciw, P.A. & Overbaugh, J. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **71**: 3932-3939.

Chakrabarti, S., Brechling, K. & Moss, B. (1985). Vaccinia virus expression vector: coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell Biol.* **5**: 3403-3409.

Chakrabarti, L., Emerman, M., Tiollais, P. & Sonigo, P. (1989). The cytoplasmic domain of simian immunodeficiency virus transmembrane protein modulates infectivity. *J. Virol.* **63**: 4395-4403.

Chambers, P., Pringle, C.R. & Easton, A.J. (1990). Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**: 3075-3080.

- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. & Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273.
- Chan, D.C. & Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**: 681-684.
- Charneau, P., Alizon, M. & Clavel, F. (1992). Second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **66**: 2814-2820
- Chen, S.S., Lee, C.N., Lee, W.R., McIntosh, K. & Lee, T.H. (1993). Mutational analysis of the leucine zipper-like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **67**: 3615-3619.
- Chen, Z., Telfier, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D.D. & Marx, P.A. (1996). Genetic characterization of new west african simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency viruses type 2 subtypes and genetically diverse virus from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* **70**: 3617-3627.
- Chen, Z., Zhou, P., Ho, D.D., Landau, N.R. & Marx, P.A. (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* **71**: 2705-2714.
- Chesebro, B., Buller R., Portis, J. & Wehrly, K. (1990). Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J. Virol.* **64**: 215-221.
- Clapham, P.R., Blanc, D. & Weiss, R.A. (1991). Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by simian immunodeficiency virus. *Virology* **181**: 703-715.
- Clapham, P.R. & McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **83**: 1809-1829.
- Coffin, J.M. (1992). Structure and classification of retroviruses. En *The Retroviridae* (ed. J.A. Levy). Plenum Press, New York, vol. 1, pp. 19-50.
- Coffin, J.M. (1996). Retroviridae and their replication. En *Virology* (eds. B.N. Fields *et al.*). Raven Press, New York, pp. 1767-1848.
- Cohen, E.A., Dehni, G., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A. (1990). Human immunodeficiency virus Vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**: 3097-3099.

- Collins, K.L. & Baltimore, D. (1999). HIV's evasion of the cellular immune response. *Immunol. Rev.* **168**: 65-74.
- Cosson, P. (1996). Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**: 5783-5788.
- Cullen, B.R. (1990). The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor?. *Cell* **63**: 655-657.
- Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. & Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767.
- Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P.J., Essex, M. & Desrosiers, R.C. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**: 1201-1204.
- Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C. & Haseltine, W.A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**: 941-947.
- Delchambre, M., Gheysen, D., Thines, D., Thiriart, C., Jacobs, E., Verdin, E., Horth, M., Burny, A. & Bex, F. (1989). The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* **8**: 2653-2660.
- Delwart, E.L., Mosialos, G. & Gilmore, T. (1990). Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 703-706.
- Desrosiers, R.C. (1988). The simian immunodeficiency viruses. *Annu. Rev. Immunol.* **42**: 607-625.
- Devico, A., Silver, A., Thronton, A.M., Sarngadharan, M.G. & Pal, R. (1996). Covalently crosslinked complexes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 and CD4 receptor elicit a neutralizing immune response that includes antibodies selective for primary virus isolates. *Virology* **218**: 258-263.
- Dewhurst, S., Embretson, J.E., Anderson, D.C., Mullins, J.I. & Fultz, P.N. (1990). Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVsmmPBj14. *Nature* **345**: 636-640.
- Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Höglund, S. & Göttinger, H.G. (1994a). Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**: 8180-8187.

Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A. & Göttlinger, H.G. (1993). Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* **67**: 6159-6169.

Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W.A. & Göttlinger, H.G. (1994b). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**: 1689-1696.

Douglas, N.W., Munro, G.H. & Daniels, R.S. (1997). HIV/SIV glycoproteins: structure-function relationships. *J. Mol. Biol.* **273**: 122-149.

Dubay, J.W., Dubay, S.R., Shin, H.J. & Hunter, E. (1995). Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **69**: 4675-4682.

Dubay, J.W., Roberts, S.J., Brody, B. & Hunter, E. (1992a). Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* **66**: 4748-4756.

Dubay, J.W., Roberts, S.J., Hahn, B.H. & Hunter, E. (1992b). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* **66**: 6616-6625.

Earl, P.L., Koenig, S. & Moss, B. (1991). Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **65**: 31-41.

Edwards, T.G., Wyss, S., Reeves, J.D., Zolla-Pazner, S., Hoxie, J.A., Doms, R.W. & Baribaud, F. (2002). Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **76**: 2683-2691.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**: 872-877.

Fletcher, T.M., Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M.A., Stivahtis, G., Sharp, P.M., Emerman, M., Hahn, B.H. & Stevenson, M. (1996). Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIVsm. *EMBO J.* **15**: 6155-6165.

Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. (2000). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control.* (ed. S. Jane Flint). ASM Press, Washington, D.C., pp 762-764.

- Forster, M.J., Mulloy, B. & Nermut, M.V. (2000). Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **298**: 841-857.
- Franke, E.K., Yuan, H.E, Bossolt, K.L., Goff, S.P. & Luban, J. (1994). Specificity and sequence requirements for interactions between various retroviral Gag proteins. *J. Virol.* **68**: 5300-5305.
- Freed, E.O., Englund, G. & Martin, M.A. (1995). Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* **69**: 3949-3954.
- Freed, E.O., & Martin, M.A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**: 1984-1989.
- Freed, E.O. & Martin, M.A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* **70**:341-351.
- Freed, E.O., Orenstein, J.M., Buckler-White, A.J. & Martin, M.A. (1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* **68**: 5311-5320.
- Fuller, S.D., Wilk, T., Gowen, B.E., Kräusslich, H.-G. & Vogt, V.M. (1997). Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr. Biol.* **7**: 729-738.
- Fultz, P.N. & Zack, P.M. (1994). Unique lentivirus-host interactions: SIVsmmPBj14 infection of macaques. *Virus Res.* **32**: 205-225.
- Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y. & Weiss, C.D. (1998). Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 276-279. (Erratum en: *Nat. Struct. Biol.* [1998] **5**: 612.)
- Gabuzda, D.H., Lever, A., Terwilliger, E. & Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**: 3306-3315.
- Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. & Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**: 379-388.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., & Markham, P.D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.

Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I. & Hill, C.P. (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**: 849-853.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M. & Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**: 436-441.

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G. & Sundquist, W.I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**: 55-65.

Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**: 617-638.

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. & De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**: 103-112.

Goddard, C., Aquino, A., Glazer, R.I. & Felsted, R.L. (1989). Chemical characterization of p17gag from human immunodeficiency virus as an N-terminally myristoylated protein. *Eur. J. Biochem.* **182**: 323-326.

Goff, S.P. (2001). The retroviridae and their replication. En *Fields Virology* (eds. D.M. Knipe & P.M. Howley). Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A., vol. 2, pp:1871-1939.

González, S.A. & Affranchino, J.L. (1995). Mutational analysis of the conserved cysteine residues in the simian immunodeficiency virus matrix protein. *Virology* **210**: 501-507.

González, S.A. & Affranchino, J.L. (1998). Substitution of leucine 8 in the simian immunodeficiency virus matrix protein impairs particle formation without affecting N-myristylation of the Gag precursor. *Virology* **240**: 27-35.

González, S.A., Affranchino, J.L. & Burny, A. (1994). Expression of biologically active envelope glycoprotein from the acutely pathogenic simian immunodeficiency virus SIV_{smmPBJ}. *Virus Genes* **8**: 75-78.

González, S.A., Affranchino, J.L., Gelderblom, H.R. & Burny, A. (1993). Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* **194**: 548-556.

- González, S.A., Burny, A. & Affranchino, J.L. (1996). Identification of domains in the simian immunodeficiency virus matrix protein essential for assembly and envelope glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **70**: 6384-6389.
- Gorelick, R.J., Chabot, D.J., Rein, A., Henderson, L.E. & Arthur, L.O. (1993). The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *J. Virol.* **67**: 4027-4036.
- Göttlinger, H.G., Dorfman, T., Cohen, E. & Haseltine, W.A. (1993). Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by *gag* gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7381-7385.
- Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5781-5785.
- Haffar, O., Garrigues, J., Travis, B., Moran, P., Zarlino, J. & Hu, S.-L. (1990). Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, *gag-env* particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system. *J. Virol.* **64**: 2653-2659.
- Hammar-skjöld, M.-L. (1997). Regulation of retroviral RNA export. *Semin. Cell Dev. Biol.* **8**: 83-90.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M. & Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**: 607-614.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hart, T.K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R.W., Lambert, D.M., Petteway, S.R. Jr., Leary, J. & Bugelski, P.J. (1991). Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2189-2193.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. & Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7311-7315.
- Hill, C.P., Worthylake, D., Bancroft, D.P., Christensen, A.M. & Sundquist, W.I. (1996). Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: Implications for membrane association and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3099-3104.

- Hirsch, V.M., Edmondson, P., Murphey-Corb, M., Arbeille, B., Johnson, P.R. & Mullins, J.I. (1989a). SIV adaptation to human cells. *Nature* **341**: 573-574.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H. & Johnson, P.R. (1989b). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**: 389-392.
- Hirsch, V., Adger-Johnson, D., Campbell, B., Goldstein, S., Brown, C., Elkins, W.R. & Montefiori, D.C. (1997). A molecularly cloned, pathogenic, neutralization-resistant simian immunodeficiency virus, SIVsmE543-3. *J. Virol.* **71**: 1608-1620.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hu, S.L., Travis, B.M., Garrigues, J., Zarling, J.M, Sridhar, P., Dykers, T., Eichberg, J.W. & Alpers, C. (1990). Processing, assembly, and immunogenicity of human immunodeficiency virus core antigens expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology* **179**: 321-329
- Hu, W.S. & Temin, H.M. (1992). Effect of gamma radiation on retroviral recombination. *J. Virol.* **66**: 4457-4463.
- Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A. & Freed, E.O. (1995). P6 Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**: 6810-6818.
- Huet, T. Cheynier, R. Meyerhans, A. Roelants, G. & Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**: 356-359.
- Hunter, E. (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Sem. Virol.* **5**: 71-83.
- Hunter, E. (1997). gp41, a multifunctional protein involved in HIV entry and pathogenesis. En *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid sequences* (eds. B. Korber, B. Hahn, B. Foley, J.W. Mellors, T. Leitner, G. Myers, F. McCutchan & C.L. Kuiken). Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, pp iii-55-iii-73.
- Hunter, E. & Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**: 187-253.
- Jacks, T. (1990). Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**: 93-124.

- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. & Varmus, H.E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 *gag-pol* expression. *Nature* **331**: 280-283.
- Johnson, W.E. & Desrosiers, R.C. (2002). Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu. Rev. Med.* **53**: 499-518.
- Johnston, P.B., Dubay, J.W. & Hunter, E. (1993). Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells. *J. Virol* **67**: 3077-3086.
- Jones, K.A. & Peterlin, B.M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 717-743
- Jowett, J.B. & Jones, I.M. (1993). Glycosylation of the external domain of SIV gp41 is influenced by the cytoplasmic tail. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**: 197-198.
- Jowett, J.B., Hockley, D.J., Nermut, M.V. & Jones, I.M. (1992). Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J. Gen. Virol.* **73**: 3079-3086. (*Erratum en: J. Gen. Virol.* [1993] **74**: 943.)
- Kalland, K.-H., Szilvay, A.M., Langhoff, E. & Haukenes, G. (1994). Subcellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J. Virol.* **68**: 1475-1485.
- Karacostas, V., Nagashima, K., Gonda, M.A. & Moss, B. (1989). Human immunodeficiency virus-like particles produced by a vaccinia virus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8964-8967.
- Kent, K.A., Rud, E., Corcoran, T., Powell, C., Thiriart, C., Collignon, C. & Stott, E.J. (1992). Identification of two neutralizing and 8 non-neutralizing epitopes on simian immunodeficiency virus envelope using monoclonal antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**: 1147-1151.
- Kestler, H.W.^{3rd}, Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. & Desrosiers, R.C. (1991). Importance of the *nef* gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**: 651-662.
- Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M. & Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**: 1302-1307.

Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J. & Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: Evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**: 3708-3713.

Kimpton, J. & Emerman, M. (1992). Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.* **66**: 2232-2239.

Kirchhoff, F., Pöhlmann, S., Hamacher, M., Means, R.E., Kraus, T., Überla, K. & Di Marzio, P. (1997). Simian immunodeficiency virus variants with differential T-cell and macrophage tropism use CCR5 and an unidentified cofactor expressed in CEMx174 cells for efficient entry. *J. Virol.* **71**: 6509-6516.

Kodama, T., Wooley, D.P., Naidu, Y.M., Kestler, H.W.^{3rd}, Daniel, M.D., Li, Y. & Desrosiers, R.C. (1989). Significance of premature stop codons in *env* of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **63**: 4709-4714.

Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M. & Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4686-4690.

Koito, A., Stamatatos, L. & Cheng Mayer, C. (1995). Small amino acid sequence changes within the V2 domain can affect the function of a T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120. *Virology* **206**: 878-884.

Kraus, G., Behr, E., Baier, M., König, H. & Kurth, R. (1990). Simian immunodeficiency virus reverse transcriptase. Purification and partial characterization. *Eur. J. Biochem.* **192**: 207-213.

LaBranche, C.C., Sauter, M.M., Haggarty, B.S., Vance, P.J., Romano, J., Hart, T.K., Bugelski, P.J., Marsh, M. & Hoxie, J.A. (1995). A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* **69**: 5217-5227.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J.R., Whittle, P.J., Danley, D.E., Geoghegan, K.F., Hawryklik, S.J., Lee, S.E., Scheld, K.G. & Hobart, P.M. (1989). X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature* **342**: 299-302.

Lee, Y.-M., Tang, X.-B., Cimakasky, L.M., Hildreth, J.E. & Yu, X.-F. (1997). Mutations in the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 inhibit surface expression and virion incorporation of viral envelope glycoproteins in CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* **71**: 1443-1452.

Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V. & King, N.W. (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* **230**:71-73.

Lewis, P., Hensel, M. & Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* **11**: 3053-3058. (Erratum en: *EMBO J.* [1992] **11**: 4249.)

Lindwasser, O.W. & Resh, M.D. (2001). Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization on barges, raft-like membrane microdomains. *J. Virol.* **75**: 7913-7924.

Lu, M., Blacklow, S.C. & Kim, P.S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 1075-1082.

Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. & Goff, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**: 1067-1078.

Luo, L., Li, Y. & Kang, C.Y. (1990). Expression of *gag* precursor protein and secretion of virus-like *gag* particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* **179**: 874-880.

Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A. & Göttlinger, H.G. (1995). Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69**: 3824-3830.

Mammano, F., Ohagen, A., Hoglund, S. & Göttlinger, H.G. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* **68**: 4927-4936.

Manrique, J.M., Celma, C.C.P., Hunter, E., Affranchino, J.L. & González, S.A. (2003). Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N-terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein. *J. Virol.* **77**: 10881-10888.

Means, R.E. & Desrosiers, R.C. (2000). Resistance of native, oligomeric envelope on simian immunodeficiency virus to digestion by glycosidases. *J. Virol.* **74**: 11181-11190.

- Meyer, B.E. & Malim, M.H. (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **8**: 1538-1547.
- Miller, M.D., Wang, B. & Bushman, F.D. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes containing discontinuous plus strands are competent to integrate in vitro. *J. Virol.* **69**: 3938-3944
- Moore, J.P. & Sodroski, J. (1996). Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J. Virol.* **70**: 1863-1872.
- Mori, K., Ringler, D.J., Kodama, T. & Desrosiers, R.C. (1992). Complex determinants of macrophage tropism in *env* of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **66**: 2067-2075.
- Morikawa, Y., Hockley, D.J., Nermut, M.V. & Jones, I.M. (2000). Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J. Virol.* **74**: 16-23.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W. & Klenk, H.-D. (1999). Processing and routing of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res.* **60**: 55-65.
- Mulligan, M.J., Yamshchikov, G.V., Ritter, G.D. Jr., Gao, F., Jin, M.J., Nail, C.D., Spies, C.P., Hahn, B.H. & Compans, R.W. (1992). Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. *J. Virol.* **66**: 3971-3975.
- Murakami, T. & Freed, E.O. (2000a). Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and α -helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **74**: 3548-3554.
- Murakami, T. & Freed, E.O. (2000b). The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 343-348.
- Murphey-Corb, M., Martin, L.N., Rangan, S.R., Baskin, G.B., Gormus, B.J., Wolf, R.H., Andes, W.A., West, M. & Montelaro, R.C. (1986). Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* **321**: 435-437.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., Leu, C.-T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L. & Springer, J.P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**: 615-620.

- Ono, A. & Freed, E.O. (1999). Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J. Virol.* **73**: 4136-4144.
- Ono, A. & Freed, E.O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13925-13930.
- Ono, A., Huang, M. & Freed, E.O. (1997). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions. *J. Virol.* **71**: 4409-4418.
- Paillart, J.-C. & Göttlinger, H.G. (1999). Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of Gag membrane targeting. *J. Virol.* **73**: 2604-2612.
- Peeters, M., Fransen, K., Delaporte, E., Van den Haesevelde, M., Gershy-Damet, G.M., Kestens, L., van der Groen, G. & Piot, P. (1992). Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (Simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* **6**: 447-451.
- Peeters, M., Honore, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R.W. & Delaporte, E. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* **3**: 625-630.
- Perrin, S. & Gilliland, G. (1990). Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7433-7438
- Piller, S.C., Dubay, J.W., Derdeyn, C.A. & Hunter, E. (2000). Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. *J. Virol.* **74**: 11717-11723.
- Rao, Z., Belyaev, A.S., Fry, E., Roy, P., Jones, I.M., & Stuart, D.I. (1995). Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature* **378**: 743-747.
- Reimann, K.A., Li, J.T., Voss, G., Lekutis, C., Tenner-Racz, K., Racz, P., Lin, W., Montefiori, D.C., Lee-Parritz, D.E., Lu, Y., Collman, R.G., Sodroski, J. & Letvin, N.L. (1996). An *env* gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high *in vivo* replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**: 3198-3206.
- Ritter, G.D.Jr., Mulligan, M.J., Lydy, S.L. & Compans, R.W. (1993). Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology* **197**: 255-264.

Rouso, I., Mixon, M.B., Chen, B.K. & Kim, P.S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13523-13525.

Salzwedel, K., West, J.T. & Hunter, E. (1999). A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol.* **73**: 2469-2480.

Sanfridson, A., Cullen, B.R. & Doyle, C. (1994). The simian immunodeficiency virus Nef protein promotes degradation of CD4 in human T cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 3917-3920.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Saucier, M., Hodge, S., Dewhurst, S., Gibson, T., Gibson, J.P., McClure, H.M. & Novembre, F.J. (1998). The tyrosine-17 residue of Nef in SIVsmmPBj14 is required for acute pathogenesis and contributes to replication in macrophages. *Virology* **244**: 261-272.

Sauter, M.M., Pelchen-Matthews, A., Bron, R., Marsh, M., LaBranche, C.C., Vance, P.J., Romano, J., Haggarty, B.S., Hart, T.K., Lee, W.M. & Hoxie, J.A. (1996). An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.* **132**: 795-811.

Schneider, J., Kaaden, O., Copeland, T.D., Oroszlan, S. & Hunsmann, G. (1986). Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycopolyptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 2533-2538.

Shacklett, B.L., Denesvre, C., Boson, B. & Sonigo, P. (1998). Features of the SIVmac transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain that are important for Env functions. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**: 373-383.

Sharma, D.P., Zink, M.C., Anderson, M., Adams, R., Clements, J.E., Joag, S.V. & Narayan, O. (1992). Derivation of neurotropic simian immunodeficiency virus from exclusively lymphocyte-tropic parental virus: pathogenesis of infection in macaques. *J. Virol.* **66**: 3550-3556.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. & Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**: 646-650.

Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

Spies, C.P. & Compans, R.W. (1994). Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology* **203**: 8-19.

Stevens, S. and Griffith, J. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 5557-5561.

Swingler, S., Brichacek, B., Jacque, J.-M., Ulich, C., Zhou, J. & Stevenson, M. (2003). HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* **424**: 213-219.

Tang, C., Ndassa, Y. & Summers, M.F. (2002). Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 537-543.

Tautz, D. & Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**: 14-19.

Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213.

Vartanian, J.-P., Meyerhans, A., Åsjö, B. & Wain-Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J. Virol.* **65**: 1779-1788.

Venable, R.M., Pastor, R.W., Brooks, B.R. & Carson, F.W. (1989). Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**: 7-22.

Veronese, F.D., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Gallo, R.C. & Sarngadharan, M.G. (1988). Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus *gag* gene products p17 and p24. *J. Virol.* **62**: 795-801.

VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T.J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. & Carter, C.A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7724-7729.

Viglianti, G.A., Sharma, P.L. & Mullins, J.I. (1990). Simian immunodeficiency virus displays complex patterns of RNA splicing. *J. Virol.* **64**: 4207-4216.

Vincent, M.J., Melsen, L.R., Martin, A.S. & Compans, R.W. (1999). Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J. Virol.* **73**: 8138-8144.

- Wain-Hobson, S., Renoux-Elbé, C., Vartanian, J.-P. & Meyerhans, A. (2003). Network analysis of human and simian immunodeficiency virus sequence sets reveals massive recombination resulting in shorter pathways. *J. Gen. Virol.* **84**: 885-895.
- Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R. & Malim, M.H. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J. Exp. Med.* **174**: 1477-1482.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**: 426-430.
- West, J.T., Johnston, P.B., Dubay, S.R. & Hunter, E. (2001). Mutations within the putative membrane-spanning domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein define the minimal requirements for fusion, incorporation, and infectivity. *J. Virol.* **75**: 9601-9612.
- Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992). Retained *in vitro* infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the *env* gene product. *Virology* **189**: 167-177.
- Wilk, T., Pfeiffer, T., Bukovsky, A., Moldenhauer, G. & Bosch, V. (1996). Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology* **218**: 269-274.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. & Strebel, K. (1992a). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**: 226-234.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. & Strebel, K. (1992b). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**: 7193-7200.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. & Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**: 179-183.
- Wyatt, R., Thali, M., Tilley, S., Pinter, A., Posner, M., Ho, D., Robinson, J. & Sodroski, J. (1992). Relationship of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable loop to a component of the CD4 binding site in the fourth conserved region. *J. Virol.* **66**: 6997-7004.
- Yang, C., Spies, C.P. & Compans, R.W. (1995). The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9871-9875.

Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.-H. & Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**: 4966-4971.

Yu, X., Yuan, X., McLane, M., Lee, T.-H. & Essex, M. (1993). Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* **67**: 213-221

Yuan, X., Yu, X., Lee, T.-H. & Essex, M. (1993). Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J. Virol.* **67**: 6387-6394.

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C. & Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**: 94-98.

Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W. & Resh, M.D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**: 2556-2569.

Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M. & Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**: 594-597.

Zingler, K. & Littman, D.R. (1993). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases Env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J. Virol.* **67**: 2824-2831.