

Tesis Doctoral

Rol de la proteína matriz (MA) del virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) en el ensamblado viral : relación funcional entre la MA de FIV y la de los lentivirus de primates

Manrique, Mariana Lorena

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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 Master's and 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:

Manrique, Mariana Lorena. (2004). Rol de la proteína matriz (MA) del virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) en el ensamblado viral : relación funcional entre la MA de FIV y la de los lentivirus de primates. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3696_Manrique

Cita tipo Chicago:

Manrique, Mariana Lorena. "Rol de la proteína matriz (MA) del virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) en el ensamblado viral : relación funcional entre la MA de FIV y la de los lentivirus de primates". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3696_Manrique

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



“Rol de la proteína matriz (MA) del virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) en el ensamblado viral. Relación funcional entre la MA de FIV y la de los lentivirus de primates”

Autor: Mariana Lorena Manrique

Director: Dr. José Luis Affranchino

Lugar de trabajo: Centro de Virología Animal (CEVAN-CONICET)

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

2004

Quisiera agradecer a las siguientes personas sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible:

Mi director, el Dr. José Luis Affranchino por la formación y el apoyo recibido durante este tiempo.

La Dra. Silvia A. González por aportar con su valiosa experiencia científica en el diseño, realización y discusión de este trabajo doctoral.

Mis compañeras: Cecilia Celma y Julieta Manrique, por todo lo compartido durante esta experiencia.

El Dr. Hockley (The National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido) por sus estudios de microscopía electrónica y discusión sobre ensamblado retroviral.

Y a mi familia a la que le debo todo.

<u>Resumen</u>	p.1
<u>Abstract</u>	p.3
<u>Abreviaturas</u>	p.5
<u>Introducción</u>	
1. Familia <i>Retroviridae</i>	
1.1. Generalidades	p.7
1.2. Taxonomía	p.7
1.3. Organización genómica y expresión de las proteínas virales	p.8
1.3.1. Poliproteína Gag	p.10
1.3.2. Glicoproteína viral Env	p.11
1.4. Estructura del virión	p.13
1.5. Ciclo de replicación viral	p.13
1.5.1. Transcripción reversa	p.14
1.5.2. Integración	p.16
2. Lentivirus	
2.1. Generalidades	p.17
2.1.1. Organización genómica	p.18
2.1.2. Tat y TAR	p.19
2.1.3. Rev y RRE	p.19
2.1.4. Vif o factor de infectividad viral	p.20
2.1.5. Nef	p.21
2.1.6. Vpr	p.21
2.1.7. Vpu	p.21
3. Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV)	p.21
3.1. Organización genómica	p.22
3.2. Replicación y tropismo	p.25
3.3. Infecciones producidas por FIV	p.25
3.4. Respuesta inmune	p.26
3.5. Manifestaciones clínicas de la infección con FIV	p.26

4. Ensamblado lentiviral	p.28
4.1. La proteína MA	p.29
4.2. La proteína CA	p.30
4.3. La proteína NC	p.31
4.4. Otros dominios de Gag	p.32

5. Objetivos de la tesis	p.33
--------------------------	------

Materiales y Métodos

1. Células y virus	p.34
2. Construcción y obtención de los virus vaccinia recombinantes que expresan el gen <i>gag</i> o el dominio MA de FIV	p.34
2.1. Amplificación del gen <i>gag</i> y de la región codificante para el dominio MA de FIV	p.34
2.2. Clonado del gen <i>gag</i> y del dominio MA de FIV en el vector de transferencia pMJ601	p.36
2.3. Transformación de bacterias competentes	p.37
2.4. Purificación de ADN plasmídico	p.38
2.5. Mutagénesis dirigida del dominio MA de FIV	p.38
2.6. Construcción de los genes <i>gag</i> de FIV llevando las mutaciones en el dominio MA	p.42
2.7. Secuenciación por el método de Sanger	p.42
2.7.1. Preparación del molde de ADN	p.42
2.7.2. Reacción de hibridación	p.43
2.7.3. Elongación y terminación de la cadena	p.43
2.8. Infección-transfección de células CV-1	p.43
2.9. Selección de los virus vaccinia recombinantes	p.44
3. Caracterización de los virus vaccinia recombinantes	p.45
3.1. Expresión de proteínas recombinantes y marcación metabólica	p.45
3.2. Ensayos de Western blot	p.46
3.3. Microscopía electrónica	p.47

4. Construcción del virus vaccinia recombinante que expresa la poliproteína Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.47
5. Caracterización del virus vaccinia recombinante que expresa la poliproteína quimérica Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.49
5.1. Análisis de la expresión y del ensamblado de la poliproteína Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.49
5.2. Marcación metabólica con [³ H]ácido mirístico	p.49
5.3. Fraccionamiento subcelular	p.50
6. Construcción de los provirus quiméricos SIV(MA _{FIV1-36}), SIV(MA _{FIV37-130}) y SIV(MA _{FIV1-130})	p.51
6.1. Quimera SIV(MA _{FIV1-130})	p.51
6.2. Quimera SIV(MA _{FIV1-36})	p.52
6.3. Quimera SIV(MA _{FIV37-130})	p.52
7. Construcción del provirus quimérico SIV(MA _{FIV1-130})/G31K/G33K	p.55
8. Construcción del provirus quimérico FIV(MA _{SIV1-130})	p.56
9. Transfección y análisis de la expresión de los ADN provirales por Western Blot	p.59
10. Ensayo de la actividad de transcriptasa reversa (TR)	p.60
11. Ensayo MAGI de infectividad viral	p.61
12. Curva de replicación viral en células MYA-1	p.62
13. Soluciones	p.63
13.1. Electroforesis en gel de agarosa	p.63
13.2. Medios de crecimiento para bacterias	p.63
13.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico	p.63
13.4. Secuenciación	p.63

13.5. Inmunoprecipitación y electroforesis de proteínas	p.64
13.6. Ensayos de Western blot	p.65
13.7. Fraccionamiento subcelular	p.66

Resultados I

I. Identificación de dominios de ensamblado en la proteína MA de FIV

I.1. Expresión de las proteínas Gag y MA de FIV	p.67
I.2. Mutagénesis dirigida del dominio MA del gen <i>gag</i> de FIV	p.68
I.3. Expresión y caracterización fenotípica de las poliproteínas Gag mutantes	p.70
I.4. Microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag salvaje de FIV y los mutantes del dominio MA de FIV	p.78

Resultados II

II. Relación funcional entre las proteínas MA de FIV y de SIV

II.1. Expresión y ensamblado de la poliproteína Gag quimérica SIV(MA _{FIV1-130})	p.80
II.2. Análisis por microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.82
II.3. Miristilación de la quimera Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.83
II.4. Localización subcelular de la poliproteína Gag _{SIV} (MA _{FIV1-130})	p.86
II.5. Construcción de los ADN provirales quiméricos derivados de SIV	p.89
II.6. Expresión y ensamblado de los virus quiméricos SIV(MA _{FIV1-36}), SIV(MA _{FIV37-130}) y SIV(MA _{FIV1-130})	p.89

II.7. Incorporación de la glicoproteína viral Env de SIV a los viriones quiméricos SIV(MA _{FIV1-36}) y SIV(MA _{FIV37-130})	p.91
II.8. Efecto de la sustitución aminoacídica G31K/G33K sobre el ensamblado del virus quimérico SIV(MA _{FIV1-130})	p.93
II.9. Coexpresión de la proteína Gag quimérica SIV(MA _{FIV1-130}) con la Gag salvaje de SIV	p.95
II.10. Expresión y ensamblado del virus quimérico FIV(MA _{SIV1-130})	p.100
II.11. Cinética de replicación del virus quimérico FIV(MA _{SIV1-130})	p.103
 <u>Discusión</u>	
I. Identificación de dominios funcionales en la proteína MA de FIV	p.105
II. Relación funcional entre las proteínas MA de FIV y de SIV	p.108
 <u>Conclusiones</u>	
	p.112
 <u>Referencias</u>	
	P.114

El virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) es un lentivirus que causa en gatos domésticos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA de humanos. Por ello, el sistema FIV-gato doméstico es considerado un modelo adecuado para el estudio de las infecciones producidas por el virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV). El gen *gag* de FIV, al igual que el del resto de los lentivirus, codifica para el precursor poliproteico Gag el cual se ensambla en partículas virales en la membrana plasmática de la célula infectada. Gag es procesado por la proteasa viral en las proteínas maduras de la cápside: matriz (MA), cápside y nucleocápside. Sin embargo, se desconocía hasta el momento la contribución de cada uno de los dominios de Gag de FIV al ensamblado viral. Con el objeto de estudiar el proceso de ensamblado de FIV, utilizamos el sistema del virus vaccinia para reproducir la formación de partículas a través de la expresión del gen *gag*. Los estudios bioquímicos y de microscopía electrónica realizados con células infectadas con este virus vaccinia recombinante demostraron que la poliproteína Gag de FIV se autoensambla en partículas con morfología lentiviral que son liberadas al medio extracelular. Para estudiar el rol de la proteína MA de FIV en la morfogénesis viral, se construyeron virus vaccinia recombinantes llevando mutaciones en este dominio del gen *gag* de FIV. La caracterización del fenotipo de estas proteínas Gag mutadas llevó a la identificación de dominios en la MA de FIV necesarios para el transporte de Gag a la membrana plasmática y para el ensamblado de partículas virales. Por otra parte, se decidió estudiar la relación estructural y funcional que existe entre la proteína MA de FIV y la del virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), caracterizando el fenotipo de ensamblado de virus quiméricos derivados de SIV o FIV, en los que se reemplazó total o parcialmente el dominio MA de un virus por el del otro. El reemplazo total de la MA de SIV por su equivalente de FIV (quimera SIV[MA_{FIV1-130}]) interfiere con el ensamblado de Gag en viriones. La poliproteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) no se asocia eficientemente a membranas a pesar de miristilarse en igual nivel que el precursor Gag de SIV. El defecto en el ensamblado de la proteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) es revertido por mutaciones que incrementan el carácter básico de la MA de FIV (mutación G31K/G33K) o por la coexpresión con el precursor Gag salvaje de SIV. Esto último indica que la proteína Gag quimérica mantiene la capacidad de establecer interacciones Gag-Gag. Por otro lado, las proteínas Gag quiméricas SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) en las que se sustituyó parcialmente el dominio MA de SIV por la región equivalente de FIV, se ensamblan en viriones con la misma eficiencia que el precursor Gag salvaje de SIV. Sin embargo, estos viriones son incapaces de

incorporar eficientemente la glicoproteína viral de envoltura y resultan significativamente menos infecciosos que el virus SIV salvaje. Finalmente, se construyó el virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}) que contiene la MA de SIV en reemplazo de la de FIV. Este virus quimérico no sólo se ensambla eficientemente en viriones, sino que además es capaz de replicarse en una línea celular linfoidea felina. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen así a comprender la homología funcional que existe entre las proteínas MA de lentivirus evolutivamente distantes.

Palabras clave: virus de inmunodeficiencia de felinos; virus de inmunodeficiencia de simios; proteína matriz; proteína Gag; ensamblado viral.

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus that induces in cats an immunodeficiency syndrome similar to AIDS caused by human immunodeficiency viruses (HIVs) in humans. These similarities make the feline-FIV system a useful model for the study of HIV-1 infections. The FIV *gag* gene, like that of other lentiviruses, codes for the polyprotein precursor Gag that assembles into particles at the plasma membrane of infected cells. Gag is processed by the viral protease into the matrix (MA), capsid and nucleocapsid proteins which form the mature virions. However, the contribution of each of the FIV Gag domains to virus assembly had not as yet been addressed. To study the assembly process of FIV, we made use of the vaccinia virus system to reproduce particle formation by expressing the FIV *gag* gene. The biochemical and electron microscopy studies performed with cells infected with this recombinant vaccinia virus demonstrated that the FIV Gag polyprotein self-assembles into typical lentiviral particles that are released into the extracellular medium. To study the role of the FIV MA protein in virus morphogenesis, we generated a series of recombinant vaccinia viruses carrying mutations within the MA domain of the FIV *gag* gene. Phenotypic characterization of these FIV Gag mutants led to the identification of MA domains that are necessary for Gag transport to the plasma membrane and for particle production. Moreover, we investigated the structural and functional relationship between the FIV MA protein and that of the primate lentivirus simian immunodeficiency virus (SIV) by analyzing the assembly phenotype of SIV- and FIV-derived chimeric viruses in which the MA-coding region was partially or fully swapped. The replacement of the SIV MA domain with that of FIV (chimera SIV[MA_{FIV1-130}]) severely impairs Gag assembly into virions. The chimeric Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) polyprotein exhibits low membrane-binding capacity despite being myristylated in a wild-type manner. The assembly defect of the chimeric Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) is reversed either by mutations that increase the basic character of the FIV MA (mutation G31K/G33K) or by coexpression with the wild-type SIV Gag precursor; which indicates that the chimeric Gag protein retains the ability to participate in Gag-Gag interactions. Furthermore, the chimeric Gag polyproteins SIV(MA_{FIV1-36}) and SIV(MA_{FIV37-130}), in which SIV MA regions were replaced by their equivalent counterpart of the FIV MA, assemble into virions as efficiently as wild-type SIV Gag. However, these chimeric viruses do not incorporate the viral envelope glycoprotein and are significantly less infectious than wild-type SIV virions. Finally, we constructed the chimeric FIV(MA_{SIV1-130}) virus containing the SIV MA-coding region in the context of the FIV genome. This chimeric virus not only assembles into virions with an efficiency similar to

that of FIV, but is able to replicate in a feline lymphoid cell line as well. The results presented in this thesis thus provide further insight into the functional homology between MA proteins from distantly related lentiviruses.

Key words: feline immunodeficiency virus; simian immunodeficiency virus; matrix protein; Gag protein; viral assembly.

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARN_t	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
β-Gal	β-galactosidasa
BrdU	5-bromo-desoxiuridina
BSA	seroalbúmina bovina
°C	grados centígrados
CA	proteína cápside
Ci	Curie
CrFK	células felinas de riñón Crandell
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>
et al.	y colaboradores
FIV	virus de inmunodeficiencia de felinos
Ig	inmunoglobulina
IN	integrasa viral
kb	mil pares de bases
kDa	mil daltons
KV	mil volts
LB	medio Luria-Bertani
LTR	repeticiones terminales largas
M	molar
mM	10 ⁻³ molar
MA	proteína matriz

µg	10 ⁻⁶ gramos
µl	10 ⁻⁶ litros
µM	10 ⁻⁶ molar
ml	10 ⁻³ litros
moi	multiplicidad de infección
ng	10 ⁻⁹ gramos
NP-40	nonidet P-40
nt	nucleótido
NC	proteína nucleocápside
nm	10 ⁻⁹ metros
ORF	marco de lectura abierto
pb	pares de bases
PBS	solución salina de buffer fosfato
PBST	solución salina de buffer fosfato-0,1% Tween 20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pmol	10 ⁻¹² moles
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PR	proteasa viral
p/v	peso/volumen
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	virus de inmunodeficiencia de simios
SU	subunidad de superficie de la glicoproteína viral de envoltura
TK	timidina quinasa
TM	subunidad de transmembrana de la glicoproteína viral de envoltura
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

1.1. Generalidades

La familia *Retroviridae* incluye a virus con una envoltura lipídica que deriva de la membrana plasmática de la célula infectada cuyo genoma está compuesto por dos moléculas idénticas de ARN de polaridad positiva.

Los retrovirus poseen una estrategia de replicación que los distingue del resto de los virus ya que involucra una etapa esencial de transcripción reversa a través de la cual el ARN viral es copiado a ADN lineal doble cadena para luego ser traslocado al núcleo celular donde se inserta en los cromosomas de la célula infectada. La forma integrada y estable del ADN viral se llama provirus, el cual se replica y expresa junto con el resto de los genes celulares utilizando para ello la maquinaria celular (Coffin, 1996). En los extremos del ADN proviral se encuentran los LTR (repeticiones terminales largas) que son secuencias repetidas e idénticas que se forman durante el proceso de transcripción reversa, las cuales poseen tres elementos: U3, R y U5. El sitio de iniciación de la transcripción está ubicado entre las secuencias U3 y R mientras que el sitio de poliadenilación se localiza entre los elementos R y U5 en el LTR 3'. El elemento U3 posee la mayoría de las secuencias reguladoras de la transcripción que incluyen un promotor y secuencias "enhancer" o moduladoras del nivel de transcripción que responden a proteínas transactivadoras celulares y virales (Coffin, 1996).

El estudio de los retrovirus ha tenido un gran impacto en distintas áreas de la biología y la medicina, tales como la biología molecular (aislamiento y caracterización de la transcriptasa reversa viral), el estudio del control del ciclo celular, la oncogénesis y más recientemente, en biotecnología y terapia génica al utilizarse genomas retrovirales modificados para transducir células de mamíferos y expresar establemente genes exógenos (Miller, 1992; Temin, 1992; Varmus, 1988).

1.2. Taxonomía

Los retrovirus se dividen según su organización genómica en simples y complejos (Coffin, 1992). Todos poseen tres genes principales, *gag*, *pol* y *env*, que codifican para las proteínas estructurales y las enzimas virales. Los retrovirus simples sólo tienen esta información elemental, mientras que el genoma de los retrovirus complejos codifica además para proteínas regulatorias adicionales. De acuerdo con la última convención (Coffin, 1992), existen siete géneros dentro de la familia *Retroviridae*: el grupo del virus

de la leucemia murina o MLV (prototipo "virus de la leucemia murina de Moloney", M-MLV), el grupo de los virus del sarcoma y leucosis aviar o ASLV (prototipo "virus del sarcoma de Rous", RSV), los virus tipo B (prototipo "virus del tumor mamario de ratón", MMTV), los virus tipo D (prototipo "virus de mono Mason-Pfizer", M-PMV), los lentivirus (prototipo "virus de inmunodeficiencia de humanos tipo 1", HIV-1), el grupo de los virus de la leucemia humana y bovina (prototipo "virus de la leucemia T humana", HTLV) y finalmente, los spumavirus (prototipo "virus espumoso humano", HFV). Este agrupamiento tiene en cuenta la homología de la secuencia del gen *pol* que codifica para la transcriptasa reversa viral (TR), el sitio donde ocurre el ensamblado viral (membrana plasmática o citoplasma) y la presencia o ausencia de genes accesorios. La morfología que exhiben las partículas virales maduras también es utilizada como criterio para clasificar a los retrovirus; en particular, la forma que adopta el llamado "core" viral (Figura 1; Gelderblom, 1991). Los retrovirus con morfología tipo C, como por ejemplo MLV o ASLV, tienen el "core" en posición central. Los virus tipo B, como por ejemplo MMTV, exhiben "cores" excéntricos. Los virus tipo D, como M-PMV, tienen el "core" elongado. Los virus tipo B y D, al igual que los spumavirus, se diferencian del resto porque el proceso de ensamblado tiene lugar en el citoplasma de la célula infectada. Las partículas son luego transportadas a la membrana plasmática donde brotan al medio extracelular. Algunos retrovirus presentan una morfología distinta al resto, como los lentivirus. Estos virus son similares a los virus tipo C, ya que se ensamblan en la membrana plasmática de la célula infectada, pero los viriones maduros presentan "cores" en forma de cono (Figura 1).

1.3. Organización genómica y expresión de las proteínas virales

Todos los retrovirus poseen tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para un precursor poliproteico que es clivado por la proteasa viral para generar las proteínas maduras de la cápside viral: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC) (Coffin, 1996). El gen *pol* codifica para una poliproteína, Gag-Pol, que luego de ser procesada genera todas las enzimas necesarias para la replicación viral: proteasa (PR), integrasa (IN) y transcriptasa reversa (TR) (Coffin, 1996). El comienzo del gen *pol* se superpone con el extremo 3' del gen *gag* y ambos genes son traducidos a partir del mismo ARN mensajero, pero en distintos marcos de lecturas. Esto es posible ya que opera un mecanismo de cambio del marco de lectura ("frameshifting"). Este evento

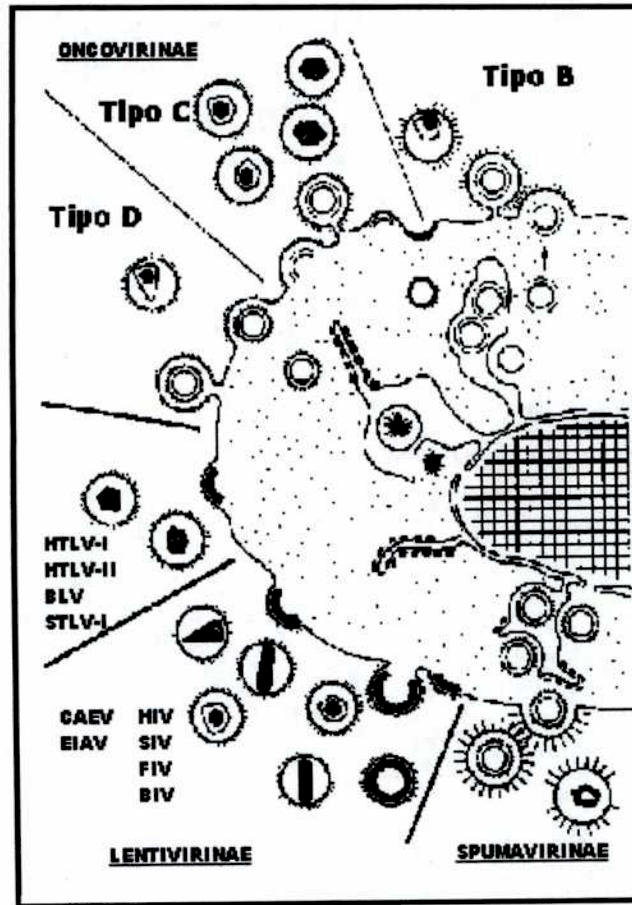


FIGURA 1. Clasificación taxonómica de la familia *Retroviridae* en base a la morfología del "core" viral y el sitio de ensamblado (Gelderblom, 1991). HTLV-I y HTLV-II, virus de la leucemia T humana tipo I y II; BLV, virus de la leucemia bovina; STLV-I, virus de la leucemia T de simios; CAEV, virus de la artritis encefalitis caprina; EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; HIV, virus de inmunodeficiencia de humanos; SIV, virus de inmunodeficiencia de simios; FIV, virus de inmunodeficiencia de felinos; y BIV, virus de inmunodeficiencia de bovinos

ocurre aproximadamente 1 cada veinte veces, produciendo niveles de la proteína Gag superiores a los de la proteína Gag-Pol (Goff, 2001).

Por último, el gen *env* codifica para la glicoproteína de envoltura (Env), que media la entrada del virión a la célula al establecer interacciones con el receptor presente en la superficie de la célula blanco. La glicoproteína Env es clivada por proteasas celulares para dar una subunidad de superficie (SU) y una subunidad de transmembrana (TM), las cuales permanecen asociadas mediante uniones no covalentes (Hunter & Swanstrom, 1990; Oroszlan & Luftig, 1990).

El provirus integrado en el genoma celular es transcrito a partir del promotor viral para dar ARN mensajeros, los cuales sufren modificaciones similares a las de los ARN mensajeros celulares: adición de 7-metil-Guanosina (Cap) en el extremo 5', poliadenilación del extremo 3', metilación de sitios internos y empalme de exones o "splicing" (Goff, 2001). La población de ARN mensajeros que sufre empalme de exones genera mensajeros subgenómicos que dan lugar a la glicoproteína viral Env y, en el caso de los virus complejos, a las proteínas regulatorias. En cambio, la población de ARN viral que no sufre empalme de exones es utilizada como ARN genómico o traducida para dar los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol (Goff, 2001).

1.3.1. Poliproteína Gag

La poliproteína Gag es el precursor de las proteínas estructurales de la partícula viral. Varios estudios han demostrado que el precursor Gag posee la información necesaria para dirigir el ensamblado y la liberación de las partículas virales (Hunter, 1994). Cuando se expresa Gag en ausencia del resto de las proteínas virales utilizando sistemas de expresión como el del virus vaccinia recombinante o el de baculovirus, se produce el ensamblado de Gag en partículas pseudovirales ("virus-like particles") (Gheysen *et al.*, 1989; Karacostas *et al.*, 1989). Debido a esto, los estudios de la morfogénesis y ensamblado retroviral se han concentrado en el producto de este gen *gag*.

La poliproteína Gag se sintetiza en el citoplasma celular para luego ensamblarse en partículas virales. Para que el proceso de ensamblado viral ocurra en forma eficiente, las moléculas del precursor Gag deben establecer interacciones con la membrana plasmática y con otros componentes del virión como el ARN genómico, la glicoproteína Env y moléculas de Gag-Pol. Las proteínas Gag de todos los retrovirus se hallan organizadas de la misma forma. El orden de los dominios desde el extremo amino

terminal es MA-X-CA-Y-NC-Z, donde X, Y y Z representan regiones espaciadoras que pueden generar péptidos pequeños (Hunter, 1994; Swanstrom & Wills, 1997; Wills & Craven, 1991). Cabe mencionar que los diferentes dominios de Gag cumplen sus funciones mientras forman parte del precursor.

Debido al rol primordial del precursor Gag en el ensamblado retroviral, se realizará una descripción detallada de su función más adelante en esta tesis (ver sección 3 de Introducción)

1.3.2. Glicoproteína viral Env

La superficie de los viriones retrovirales se halla rodeada por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula infectada, en la cual se insertan las moléculas de la glicoproteína viral Env (Figura 2). En la primera etapa de la infección viral, la proteína Env interacciona con el receptor de la superficie celular y media la fusión de la membrana celular con la viral, permitiendo así la entrada del virus a la célula susceptible (Hunter, 1994). La proteína Env se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso como un precursor, el cual es modificado por procesos de N- y O-glicosilación y posteriormente clivado proteolíticamente en el trans-Golgi (Hunter, 1994). El clivaje del precursor da lugar a un complejo formado por una subunidad de superficie (SU) y una subunidad transmembrana (TM). La subunidad SU es la que establece interacciones altamente específicas con el receptor de la superficie celular determinando así el tropismo del virus. Esta subunidad está compuesta por regiones conservadas que contribuyen probablemente a mantener la estructura de la molécula y regiones variables que están expuestas en la superficie de la proteína y que facilitan el escape del virus al reconocimiento inmunológico del hospedador durante la infección (Douglas *et al.*, 1997). La subunidad TM de la proteína Env de todos los retrovirus consta de un dominio extracelular con una región hidrofóbica que media la fusión de la membrana viral con la membrana celular, un dominio de anclaje a membrana y un dominio citoplasmático que se extiende en el citoplasma de la célula infectada (Hunter & Swanstrom, 1990). En las células infectadas, los complejos SU-TM son transportados en vesículas hasta la membrana plasmática donde son incorporados a la partícula retroviral durante el proceso de brotación (Hunter, 1994).

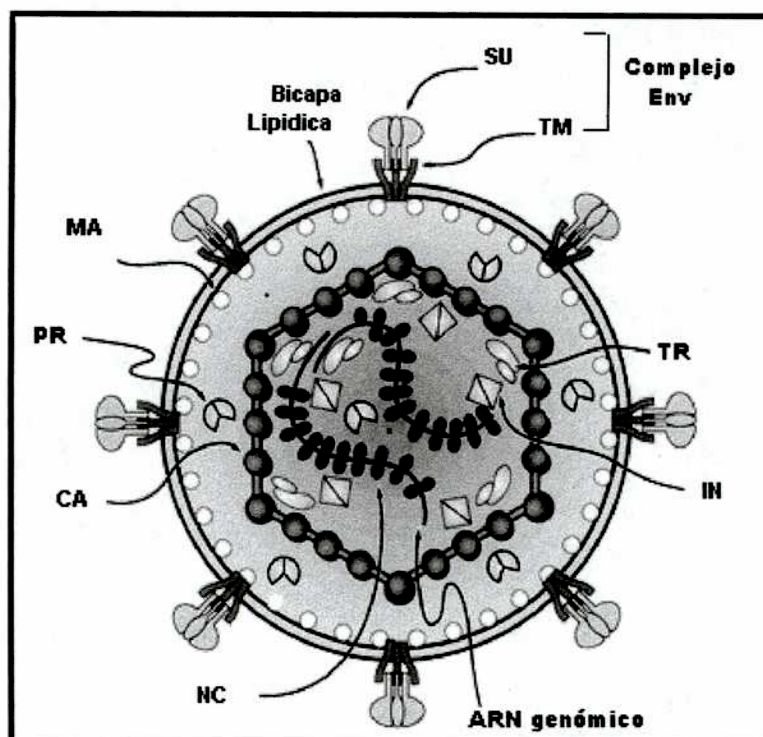


FIGURA 2. Esquema de una partícula retroviral madura (adaptado de Coffin, 1996). La envoltura viral está formada por una bicapa lipídica derivada de la célula infectada en la cual se inserta la glicoproteína Env como un complejo SU-TM. Las proteínas estructurales internas del virión matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC) derivan del procesamiento proteolítico del precursor Gag. Los productos del gen *pol* son las enzimas transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (IN) virales.

1.4. Estructura del virión

El virión maduro está compuesto por cubiertas proteicas derivadas de la poliproteína Gag (Figura 2) (Coffin, 1996). La proteína MA forma la capa proteica externa por debajo de la membrana lipídica. Atravesando la membrana, se encuentra la subunidad TM del complejo glicoproteico Env. Se han presentado evidencias que indican que en el caso de los virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV-1) y de simios (SIV), el dominio citoplasmático de TM establecería interacciones con la proteína MA (Freed & Martin, 1996; González *et al.*, 1996). La otra cubierta proteica está formada por la proteína CA que forma el "core" viral (Figura 2). Es interesante destacar que el orden en que se disponen las distintas cubiertas proteicas que conforman la partícula viral coincide con el orden de estas proteínas en el precursor Gag (Coffin 1996). La cubierta más interna está formada por la proteína NC y el ARN genómico viral. Dentro del "core" viral, se encuentran también las enzimas TR, IN y PR (Figura 2).

1.5. Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación de los retrovirus comienza cuando el virus ingresa a la célula blanco estableciendo interacciones específicas entre la glicoproteína Env y un receptor presente en la superficie celular (Hunter & Swanstrom, 1990) (Figura 3). Esta interacción específica define tanto la especie animal susceptible a la infección como el tipo celular en el que puede llevarse a cabo la replicación viral. Posteriormente, se fusionan la membrana viral con la celular produciéndose así la entrada de la cápside viral o "core" a la célula. Se produce entonces la desorganización de la partícula viral y la proteína TR realiza la transcripción reversa del ARN genómico para generar el ADN lineal doble cadena que se integrará al genoma de la célula hospedadora (Figura 3).

La TR, es una enzima con actividad de polimerasa que utiliza al ARN como molde para sintetizar ADN. Además, exhibe actividad de ribonucleasa H (ARNasa H) degradando al ARN una vez que lo utilizó como molde (Katz & Skalka, 1994). La secuencia de aminoácidos de la TR se halla conservada entre los distintos géneros retrovirales y es utilizada en estudios de filogenia viral (Doolittle *et al.*, 1989). A pesar de la similitud entre las secuencias de aminoácidos, la estructura cuaternaria de la TR difiere entre los diferentes géneros retrovirales, debido a que pueden formarse homodímeros o heterodímeros. En efecto, las moléculas de TR pueden sufrir procesamiento diferencial por la PR viral. Es el caso de la TR de HIV-1 que posee una estructura heterodimérica formada por un polipéptido (p66) que posee actividad de polimerasa y de ARNasa H y

uno de menor tamaño (p51), el cual deriva de p66 pero carece de la actividad de ARNasa H y sólo contribuye a mantener la conformación activa de la enzima (Le Grice *et al.*, 1991).

Una vez generado el ADN viral por retrotranscripción, éste es transportado al núcleo de la célula donde la enzima IN inserta la copia del genoma retroviral en el ADN cromosomal de la célula, generando así el provirus estable (Figura 3) (Goff, 2001). Una vez finalizada la integración del ADN viral, éste es transcrito para generar los mensajeros virales que son traducidos para dar los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol. Según el género retroviral, el ensamblado viral puede ocurrir en el citoplasma o en la membrana plasmática. Durante el proceso de brotación, los viriones adquieren la envoltura lipoproteica en la que se halla anclada la glicoproteína Env (Figura 3) (Hunter, 1994).

La enzima PR comienza a actuar durante la brotación, procesando proteolíticamente los precursores Gag y Gag-Pol, lo que induce grandes cambios morfológicos en la partícula viral, la cual es liberada al medio extracelular como virión maduro e infeccioso (Hunter, 1994). La transcripción reversa y la integración son los pasos distintivos del ciclo de vida de los retrovirus, mientras que el resto de los eventos que se producen son similares a los de otros virus con envoltura. Estos dos procesos hacen que las infecciones por retrovirus sean permanentes.

1.5.1. Transcripción reversa

En 1970, Howard Temin sugirió por primera vez que algunos virus cuyo genoma está compuesto por moléculas de ARN se replicaban utilizando un intermediario de ADN, el cual se incorporaba al genoma del hospedador. Esta idea surgió de experimentos realizados con inhibidores de la síntesis del ADN que bloqueaban las etapas tempranas de la replicación retroviral. Howard Temin y David Baltimore encontraron simultáneamente actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN en viriones purificados de ASLV a la que la denominaron actividad de transcriptasa reversa (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). La capacidad de sintetizar una copia de ADN a partir de su genoma de ARN e insertarlo en el genoma de la célula hospedadora infectada explicaría la biología de los retrovirus que establecen infecciones persistentes con capacidad de transformar rápida y efectivamente a la célula infectada. La transcripción reversa comienza cuando el complejo que forma el genoma viral con la proteína NC entra al citoplasma celular. Los genomas retrovirales llevan una molécula

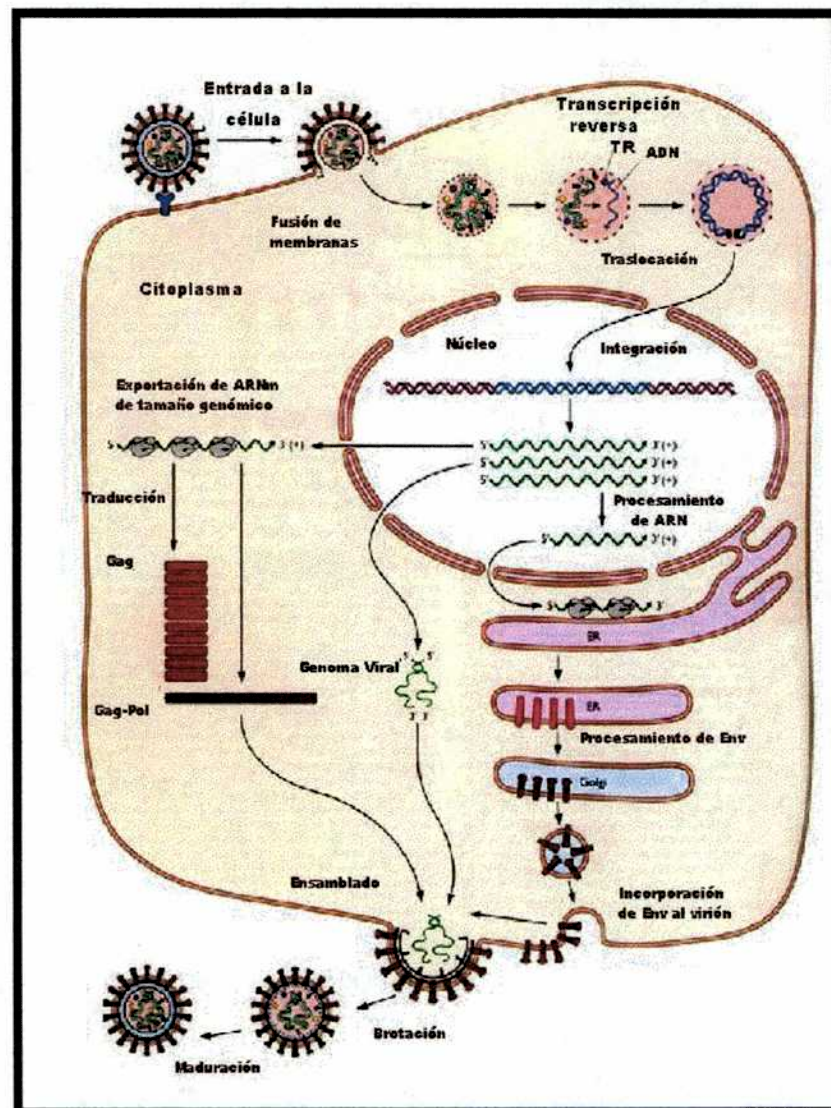


FIGURA 3. Esquema del ciclo de replicación retroviral (adaptado de Flint *et al.*, 2000). El ciclo de vida retroviral puede ser resumido en los siguientes pasos: (1) la infección viral comienza con la interacción específica de la glicoproteína Env con el receptor celular. (2) Se produce la fusión de membranas y la posterior entrada del virus a la célula liberando la cápside o “core” viral dentro del citoplasma. Una serie de eventos llevan a la desorganización de la partícula, dejando expuesto el complejo formado por la proteína NC, las enzimas TR e IN y el ARN genómico viral. (3) El ARN viral es copiado a ADN doble cadena por la TR. (4) El complejo de preintegración es trasladado al núcleo celular. (5) Una vez en el núcleo, se produce la integración del ADN viral en el cromosoma celular. (6) Se sintetizan los ARN mensajeros (ARNm) a partir del provirus integrado. (7) Una fracción de los ARN sintetizados son exportados al citoplasma sin sufrir procesamiento previo.

(Figura 3, continuación) (8) En los ribosomas libres del citoplasma, los ARNm son traducidos para dar lugar a los precursores Gag y Gag-Pol. (9) Además, los ARN virales no procesados sirven como ARN genómico, el cual es empaquetado en la partícula viral. (10) Otra población de ARNm sufre la eliminación de sus intrones para generar los ARNm maduros de Env y de otras proteínas con función regulatoria. (11) Los ARNm de Env son traducidos en el retículo endoplasmático rugoso. (12) Una vez sintetizado, el precursor Env es procesado para dar el complejo SU-TM el cual es transportado a través de la vía biosintética secretoria hasta la membrana plasmática. (13) La glicoproteína Env se inserta en la membrana plasmática. (14) Se produce el ensamblado de Gag y Gag-Pol en partículas junto con el empaquetamiento del ARN genómico. (15) Se produce la brotación de la partícula y la incorporación de la glicoproteína Env a la partícula viral inmadura. (16) Los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol de las partículas virales inmaduras son procesados proteolíticamente por PR generando así una partícula viral madura e infecciosa.

del ARN_t para lisina unida por complementariedad de bases a la región PB ("primer binding") localizada cerca del extremo 5' del ARN viral.

La transcripción reversa se inicia utilizando el grupo hidroxilo (-OH) libre del extremo 3' de esta molécula de ARN_t para lisina (Peters & Dahlberg, 1979). La síntesis de la cadena de ADN se extiende hasta la región R en el extremo 5' del genoma viral. Luego, la región de ADN recién sintetizada hibrida con la región R del extremo 3' del ARN viral, lo que permite la síntesis del ADN de polaridad negativa generando 5'-ARN_t-U5'-R'-U3'-PP-*env*'-*pol*'-*gag*'-PB'-3' (Gilboa *et al.*, 1979; Moelling *et al.*, 1971; Swanstrom *et al.*, 1981; Varmus *et al.*, 1978). La elongación de la cadena de ADN sobre el molde de ARN ocurre simultáneamente con la degradación del mismo por la actividad de ARNasa H de la TR. Sin embargo, la degradación no es completa. El ARN genómico contiene una secuencia de oligopurinas llamada PP, la cual es resistente a la degradación mediada por la actividad de ARNasa H. Esto genera pequeños cebadores de ARN que permiten la síntesis de la cadena positiva de ADN (Luo *et al.*, 1990). La síntesis de la cadena positiva es llevada a cabo utilizando como molde la cadena de ADN de polaridad negativa. El producto final es una molécula de ADN doble cadena con extremos romos.

1.5.2. Integración

El proceso de integración es un paso esencial del ciclo de vida de todos los retrovirus, ya que permite mantener establemente al genoma viral en la célula infectada. Una vez integrado, el provirus se replica junto con los cromosomas celulares y puede ser

transmitido genéticamente como elemento integral del genoma celular. La integración asegura una asociación estable entre el ADN proviral y el cromosoma hospedador evitando que el ADN viral sea degradado. Por otro lado, la integración permite la transcripción eficiente de los genes virales para generar los mensajeros que dan lugar a las proteínas virales (Hughes *et al.*, 1981; Majors & Varmus, 1981).

El proceso de integración comienza una vez finalizada la transcripción reversa del genoma viral. Durante este proceso, el ADN viral pierde dos bases en cada uno de sus extremos 3' como consecuencia de la actividad endonucleolítica de la IN dejando extremos 5' simple cadena (Engelman *et al.*, 1991). Luego, el complejo de ADN viral-IN es traslocado al núcleo. En la mayoría de los retrovirus, el complejo de preintegración entra al núcleo durante la mitosis, ya que la membrana nuclear se encuentra desorganizada (Lewis & Emerman, 1994; Roe *et al.*, 1993). En cambio, los lentivirus pueden hacerlo durante la interfase celular utilizando un transporte activo a través del poro nuclear (Bukrinsky *et al.*, 1992). Una vez en el núcleo, se produce la unión del complejo ADN viral-IN al ADN celular. Los grupos hidroxilo en los extremos 3' del ADN viral atacan nucleofilicamente la unión fosfodiéster de la cadena de ADN celular (Craigie *et al.*, 1990). La energía liberada durante la ruptura de la unión fosfodiéster es utilizada para formar nuevas uniones, produciéndose de este modo la ligación del ADN viral al ADN blanco. Finalmente, es la TR viral la que completa el proceso de integración duplicando 4-6 bases del ADN celular (Goff, 2001).

2. Lentivirus

2.1. Generalidades

Los lentivirus comprenden un género dentro de la familia *Retroviridae*. Este grupo de virus cobró especial importancia en 1983 cuando se aisló el virus de inmunodeficiencia de humanos HIV-1 y se comprobó que era el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) de humanos (Clements & Wong-Staal, 1992).

Históricamente, el primer lentivirus fue identificado en 1904 por Vallée y Carrée quienes aislaron un agente transmisible de un caballo que presentaba anemia hemolítica (Clements & Wong-Staal, 1992). Este agente correspondía al virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). El concepto de enfermedad viral "lenta" fue introducido por Sigurdsson cuando identificó al virus maedi-visna que causaba infecciones en ovejas

(Sigurdsson & Palsson, 1958). Estos virus estaban asociados a largos períodos de incubación y por ello, se los llamó virus lentos y al género que los agrupa, lentivirus. En base a su tropismo celular y a las manifestaciones clínicas de las enfermedades que producen, los lentivirus se dividen en dos grupos. Los virus que causan inmunodeficiencia e infectan linfocitos T, monocitos y macrófagos, y los virus que causan enfermedades específicas en distintos órganos mediadas por el sistema inmune. Este último grupo de virus que incluye, entre otros, al virus maedi-visna y al virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV), infecta predominantemente monocitos y macrófagos (Clements & Wong-Staal, 1992). Los virus que producen inmunodeficiencia incluyen a los virus de primates (HIV-1, HIV-2 y SIV), de felinos (FIV) y de bovinos (BIV).

2.1.1. Organización genómica

Desde el punto de vista de su organización genómica, los lentivirus poseen además de los genes *gag*, *pol* y *env*, genes accesorios localizados entre los genes *pol* y *env*, así como en el extremo 3' del gen *env*. Estos genes adicionales codifican para las proteínas Vif, Tat, Rev, y en algunos lentivirus, para los productos Vpr, Vpx, Vpu y Nef (Emerman & Malim, 1998). La presencia de genes auxiliares en los lentivirus correlaciona con la complejidad de su ciclo de vida. HIV-1 tiene el mayor número de genes adicionales: *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* y *nef* (Cullen & Greene, 1990) (Figura 4). HIV-2 y SIV exhiben una complejidad genómica similar a la de HIV-1, pero poseen el gen *vpx* en lugar del gen *vpu* (Desrosiers, 1990). Los virus maedi-visna y CAEV presentan un número menor de marcos de lectura adicionales, limitándose a los genes *vif*, *tat* y *rev* (Saltarelli *et al.*, 1990; Sonigo *et al.*, 1985).

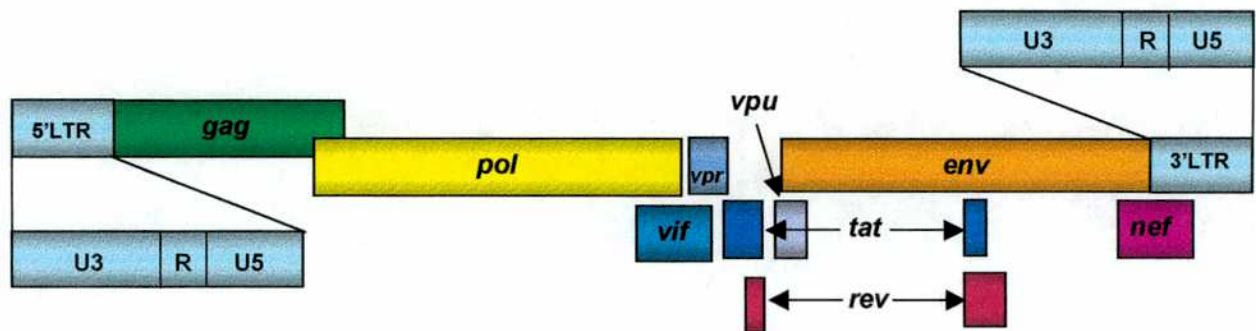


FIGURA 4. Esquema de la organización genómica de HIV-1 como ejemplo de un genoma lentiviral complejo. Se indica la ubicación en el genoma viral de los LTR, los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* y los auxiliares *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*.

2.1.2. Tat y TAR La transcripción de los lentivirus es iniciada por factores celulares y por la ARN polimerasa II. Las secuencias que interactúan con los factores de transcripción se hallan en la región U3 del LTR 5'. Los virus de inmunodeficiencia contienen sitios de unión para los factores NF-kappa B y SP1, mientras que los virus visna y CAEV contienen sitios para los factores AP-1 y AP-4 (Hess *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1986; Saltarelli *et al.*, 1990). Además de estos factores celulares, la transcripción de los lentivirus se halla regulada por la proteína viral Tat. La proteína Tat se produce tempranamente en el ciclo de replicación a partir de un ARNm multiprocesado y su función principal es estimular la transcripción a partir de la región promotora en el LTR 5'. Tat actúa sobre una región de estructura secundaria llamada TAR presente en el ARN naciente (Jones & Peterlin, 1994). A diferencia de HIV-1 y SIV, no se ha identificado una secuencia TAR en los lentivirus como FIV, visna y CAEV. En estos virus, la proteína trans-activadora Tat se uniría a motivos AP-1 ubicados en el LTR 5' (de Parseval & Elder, 1999).

2.1.3. Rev y RRE El producto primario de la transcripción de los lentivirus es una molécula de ARN cuya longitud es similar a la del genoma viral. Esta molécula sirve de sustrato para la generación de ARNm subgenómicos a través del proceso de empalme de exones ("splicing"). Sin embargo, una fracción del ARN original de tamaño completo debe permanecer sin sufrir procesamiento de manera que pueda ser utilizado tanto como mensajero de las proteínas Gag y Pol como ARN genómico, el cual es empaquetado en la partícula viral. Existen entonces tres especies de ARNm en las

células infectadas: a) ARNs completos de tamaño genómico, b) ARNm que sufrieron un único empalme de exones y c) ARNs con empalme múltiple de exones (Hammarskjöld, 1997). Por lo tanto, el proceso de empalme de exones debe ser cuidadosamente regulado para lograr el balance adecuado entre estas tres especies de ARNm virales. Esta regulación es llevada a cabo por la proteína viral Rev que facilita el transporte desde el núcleo al citoplasma de los ARNm virales intactos así como de los que sufrieron un único empalme de exones (Emerman *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1989). La proteína Rev es traducida a partir de un ARNm viral multiprocesado, el cual es exportado al citoplasma en las etapas tempranas de la infección. Luego, gracias a una señal de localización nuclear presente en la proteína Rev, ésta ingresa al núcleo donde ejerce su función. Rev funciona uniéndose a una secuencia en el ARN genómico llamada "elemento respondedor a Rev" o RRE. Esta secuencia se encuentra en la región del gen *env*, tanto en los ARNm virales intactos como en aquéllos que sufrieron un único empalme de exones. En cambio, la región RRE no está presente en los mensajeros multiprocesados (Hammarskjöld, 1997). Una vez asociada a los ARNm virales que poseen intrones, Rev media la exportación de estas moléculas al citoplasma, ya que cuenta también con una señal de exportación de núcleo a citoplasma. Por lo tanto, Rev exhibe una capacidad de tránsito núcleo-citoplasma bidireccional.

2.1.4. Vif o factor de infectividad viral Todos los lentivirus a excepción de EIAV codifican para la proteína Vif, la cual es necesaria para la replicación viral y la patogénesis *in vivo* (Gabuzda *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1995). Si bien la función de Vif ha sido objeto de numerosos estudios, trabajos realizados recientemente en HIV-1 han logrado definir con mayor claridad el rol que cumple esta proteína en el ciclo viral. La proteína Vif de HIV-1 es requerida para suprimir una actividad antiviral presente en linfocitos T humanos (Sheehy *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la expresión del gen celular *CEM15* inhibe la replicación de un mutante de HIV-1 deficiente en el gen *vif*, ya que la proteína CEM15 modifica nucleótidos del genoma viral a través de su actividad de desaminasa, lo que resulta en una hipermutación del genoma viral y en la inactivación de genes (Zhang *et al.*, 2003). La actividad inhibitoria del producto de este gen es contrarrestada por la expresión de la proteína Vif (Sheehy *et al.*, 2002). El hecho que la actividad de Vif requiera de la interacción con un factor celular específico contribuye a explicar porqué la función de la proteína Vif de un dado lentivirus tiene

restricciones respecto del tipo celular y la especie de la que derivan las células (Simon *et al.*, 1995).

2.1.5. **Nef** La proteína Nef promueve la endocitosis del receptor CD4 y disminuye los niveles en la superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad clase I inhibiendo así la lisis de las células infectadas con HIV-1 mediada por los linfocitos T citotóxicos (Aiken *et al.*, 1994; Collins & Baltimore, 1999). Recientemente, se ha demostrado que la proteína Nef de HIV-1 participa de un complejo mecanismo que permite la infección de células T quiescentes (Swingler *et al.*, 2003). En los macrófagos infectados con HIV-1, la proteína Nef induciría la liberación de factores que actuarían sobre linfocitos B. Estos linfocitos B, al ponerse en contacto con células T quiescentes, permitirían la infección por HIV-1.

2.1.6. **Vpr** En la mayoría de los retrovirus, la entrada del ADN copia del genoma viral al núcleo requiere de la división celular y de la consiguiente desorganización de la membrana nuclear. En cambio, en los lentivirus de primates la proteína Vpr, la cual es empaquetada en la partícula viral, permite el transporte del complejo de preintegración al núcleo en ausencia de división celular (Heinzinger *et al.*, 1994).

2.1.7. **Vpu** La proteína Vpu es distintiva de HIV-1 y de SIVs muy relacionados genéticamente con HIV-1. Esta proteína promueve la degradación de CD4 en el retículo endoplásmico evitando así que la glicoproteína Env, cuyo transporte se realiza también a través de la vía secretoria celular, quede retenida por asociación con CD4 (Willey *et al.*, 1992a, 1992b).

3. Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV)

El virus de inmunodeficiencia de felinos es un lentivirus que genera en gatos domésticos (*Felis catus*) y en felinos salvajes una supresión del sistema inmune debido a la pérdida gradual de linfocitos T CD4⁺. Este lentivirus fue aislado por primera vez en 1987 de gatos domésticos del estado de California, E.E.U.U. Estos gatos presentaban infecciones persistentes que inducían un síndrome de inmunodeficiencia adquirida similar al SIDA de humanos (Pedersen *et al.*, 1987). FIV exhibe similitudes con los virus de primates HIV y SIV en lo que respecta a la morfología de los viriones, la

organización y variabilidad genómicas, el ciclo de replicación, el potencial patogénico y la susceptibilidad a drogas antivirales (Bendinelli *et al.*, 1995). Debido a estas características, el sistema FIV-gato doméstico ha despertado gran interés como modelo para el desarrollo de estrategias terapéuticas, vacunas y drogas antivirales destinadas a controlar las infecciones causadas por HIV. Por otro lado, FIV es un patógeno importante de felinos domésticos y salvajes, por lo que su estudio tiene relevancia desde el punto de vista de la medicina veterinaria.

FIV se halla distribuido ampliamente en todo el mundo. Su prevalencia varía con la ubicación geográfica, la edad y el género de los gatos estudiados. Las prevalencias estimadas de la infección por FIV en gatos domésticos son del 6% en el Reino Unido (Hosie *et al.*, 1989), del 8% en Alemania (Fuchas *et al.*, 1994), del 12% en Japón (Ishida *et al.*, 1989) y del 1-14% en E.E.U.U. (Pedersen *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1989). FIV se transmite de un felino a otro a través de mordeduras (Yamamoto *et al.*, 1989). En este sentido, se ha demostrado que la saliva de gatos natural y experimentalmente infectados con FIV contiene tanto células infectadas como virus libre (Matteucci *et al.*, 1993). Otras formas naturales de transmisión de FIV, como la sexual, no han sido claramente demostradas. Respecto de la posibilidad de transmisión vertical, ésta ha sido demostrada únicamente infectando hembras experimentalmente (Callanan *et al.*, 1991; Ueland & Nesse, 1992). La transmisión experimental es fácilmente realizable tanto con células infectadas como con virus libre. La vía más eficiente es la inoculación subcutánea. En cambio, las vías que utilizan la mucosa vaginal o rectal son menos eficientes y requieren de células infectadas o altas dosis de virus libre (Bendinelli *et al.*, 1995).

3.1. Organización genómica

La organización genómica de FIV es similar a la del resto de los lentivirus en lo que respecta a su complejidad (Olmsted *et al.*, 1989; Talbott *et al.*, 1989). Análisis filogenéticos realizados a partir de las secuencias de las proteínas Gag y Pol de FIV y las del resto de los lentivirus indican que FIV se halla más relacionado con los lentivirus EIAV, CAEV y maedi visna que con los lentivirus de primates HIV y SIV. Sin embargo, la inmunopatogénesis y las manifestaciones clínicas de la enfermedad que provoca la infección con FIV lo asemejan más a HIV y a SIV que a los lentivirus de animales no primates (Bendinelli *et al.*, 1995).

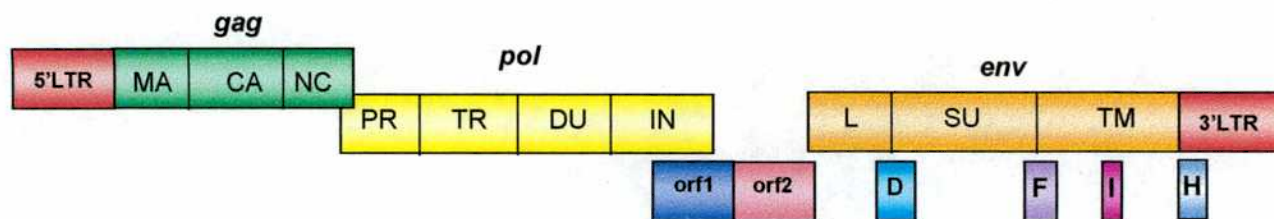


FIGURA 5. Organización genómica de FIV (adaptado de Bendinelli *et al.*, 1995). Se indican los tres genes principales *gag*, *pol* y *env* y las proteínas que genera el procesamiento proteolítico de estos precursores. Gag genera las proteínas matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). El precursor Pol da lugar a las enzimas proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR), dUTPasa (DU) e integrasa (IN). La proteína Env consta de un péptido líder (L) y de las subunidades de superficie (SU) y de transmembrana (TM). En este esquema también se señalan otros 6 marcos abiertos de lectura (ORF) que exhibe FIV: ORF 1 y 2, D, F, I y H. ORF 1 y 2 corresponden a los genes *vif* y *tat*, respectivamente, mientras que los ORF D y H, a los dos exones del gen *rev*.

El gen *gag* codifica para una poliproteína de 450 aminoácidos con una movilidad electroforética aparente de 50 kDa. Este precursor es clivado por la proteasa viral para dar las proteínas maduras de la cápside viral: MA (14,5 kDa), CA (24,5 kDa) y NC (7 kDa) (Steinman *et al.*, 1990) (Figura 5). Por otro lado, se ha demostrado que el dominio MA del precursor Gag de FIV es modificado, al igual que el de otros retrovirus, por la adición de ácido mirístico en su extremo amino terminal (Elder *et al.*, 1993).

El gen *pol* se expresa como un precursor poliproteico, Gag-Pol, por medio de un mecanismo de corrimiento del marco de lectura (Morikawa & Bishop, 1992). La región Pol de la poliproteína está compuesta por las enzimas virales PR (13 kDa), TR (65 kDa), dUTPasa o DU (14 kDa) e IN (Figura 5). La enzima DU es de particular interés, ya que sólo se ha identificado en FIV y EIAV (Elder *et al.*, 1992). De la comparación de la DU de FIV con las secuencias de la familia de enzimas dUTPasa, se infirió que la DU de FIV posee una actividad enzimática similar (Elder *et al.*, 1992). La proteína DU ejercería su función en las etapas tempranas del ciclo de vida viral ya que es empaquetada en el virión. La función de esta enzima sería la de disminuir la incorporación inapropiada de dUTP en el ADN viral durante la transcripción reversa, reduciendo así la tasa de mutación y aumentando la estabilidad genética de FIV (Elder *et al.*, 1992). La función ejercida por la enzima DU de FIV sería particularmente

importante durante la replicación del virus en aquellas células que poseen bajos niveles de dUTPasa como, por ejemplo, los macrófagos.

La traducción del gen *env* se lleva a cabo en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático y genera un precursor glicoproteico de 145-150 kDa. Este es rápidamente procesado generando un polipéptido de 130 kDa (gp130) por la eliminación del péptido líder (Figura 5). Luego, gp130 es procesada en el aparato de Golgi para generar las glicoproteínas maduras SU (gp95) y TM (gp40) (Verschoor *et al.*, 1993) (Figura 5). El gen *env* es el de mayor variabilidad a nivel nucleotídico respecto del resto de los genes virales. Estas variaciones no están distribuidas al azar sino que se encuentran en regiones específicas. Se han definido nueve regiones variables (V) (Pancino *et al.*, 1993). El análisis filogenético de las regiones variables V3, V4 y V5, presentes en la subunidad SU, señalan que el grado de diversidad encontrado en los distintos aislamientos virales está relacionado con la localización geográfica de los mismos. En base a esto, FIV ha sido dividido en tres subtipos distintos A, B y C que exhiben divergencias del 18% al 26% (Sodora *et al.*, 1994).

Los LTR de FIV poseen una longitud similar a los de CAEV, EIAV y visna y están compuestos por un promotor CCATT, una o dos regiones TATA, una señal de poliadenilación y elementos "enhancer" o moduladores de la transcripción como AP-4, AP-1, NF- κ B y ATF1 (Phillips *et al.*, 1990). En el LTR 5' se encuentra el sitio de unión del iniciador de la síntesis de ADN, el ARN_t para lisina.

Además de los genes *gag*, *pol* y *env* comunes a todos los retrovirus, FIV presenta 6 marcos abiertos de lectura (ORFs): 1, 2, D, F, I y H que se hallan conservados en los distintos aislamientos de FIV (Figura 5). ORF 1, correspondería al gen *vif* de FIV (Tomonaga *et al.*, 1992). Mutantes de FIV deficientes en *Vif* son incapaces de infectar tanto células monocíticas de sangre periférica como líneas celulares felinas derivadas de fibroblastos o de linfocitos felinos (Shacklett & Luciw, 1994; Tomonaga *et al.*, 1992). El ORF 2 coincide en tamaño y localización genómica con el gen *tat* de los virus visna y CAEV (Davis & Clements, 1989; Kalinski *et al.*, 1994). Se encuentra ubicado entre los genes *vif* y *env* y codifica para la proteína Tat que es esencial para la replicación viral, ya que actúa sobre la región LTR de FIV promoviendo la transactivación de la transcripción viral (de Parseval & Elder, 1999). Deleciones o mutaciones en esta región disminuyen la capacidad de FIV de replicarse eficientemente en linfocitos felinos de sangre periférica (Tomonaga *et al.*, 1993). En FIV, la proteína Tat actuaría en las regiones AP-1, C/EBP y ATF1 presentes en la región LTR (de Parseval & Elder, 1999).

Los exones del gen *rev* de FIV han sido ubicados en dos regiones: el primer exón se extiende desde la región intragénica del extremo 3' del gen *pol* hasta la región L en el gen *env* (de Parseval & Elder, 1999). El segundo exón se encuentra en el ORF H ubicado en el extremo 5' del LTR 3' (Figura 5). La proteína Rev es traducida a partir de un ARNm que proviene del empalme de estos dos exones. Al igual que otros lentivirus, la proteína Rev actúa uniéndose al elemento RRE en el ARN genómico, el cual se encuentra en el extremo 3' del gen *env*. La función de esta proteína regulatoria es la de promover el transporte de ARN mensajeros no empalmados desde el núcleo hacia el citoplasma celular (de Parseval & Elder, 1999).

3.2. Replicación y tropismo

FIV posee la capacidad de infectar una gran variedad de células, entre ellas, linfocitos T y B, células de la línea monocítica-macrófagos, células de la microglía y astrocitos (English *et al.*, 1993). Al igual que en el caso de HIV-1, la infección por FIV resulta en la pérdida progresiva de células T CD4⁺ generando una disfunción gradual del sistema inmune cuyo desenlace es una inmunodeficiencia. Sin embargo, FIV no utiliza el receptor CD4 como vía de entrada a la célula, sino que utiliza como receptor primario a la molécula CD134 cuya expresión se halla restringida, en felinos, a los linfocitos T CD4⁺ (Shimojima *et al.*, 2004). Además, FIV utiliza como correceptor al receptor de quimioquinas CXCR4, el cual es utilizado como correceptor por algunos aislamientos de HIV-1 (Poeschla & Looney, 1998). Las diferencias en el tropismo celular entre distintos aislamientos de FIV están determinadas por variaciones en la secuencia primaria de la proteína Env y en la secuencia del LTR proviral (Frey *et al.*, 2001). Los efectos citopáticos que presentan las células infectadas con FIV incluyen cambios en la morfología celular, formación de sincicios (inducidos por la proteína Env) y lisis celular. Sin embargo, estos efectos varían entre los aislamientos virales y el tipo de célula infectada (Bendinelli *et al.*, 1995).

3.3. Infecciones producidas por FIV

Durante la primera semana de la infección de gatos con FIV se detecta una concentración máxima de ADN y ARN virales en médula, timo y nódulos linfáticos. En otros tejidos como riñón, pulmón e hígado, los niveles encontrados son más bajos. El 25-75% de las células infectadas con FIV *in vivo* son linfocitos T; sin embargo, cuando aparecen los primeros signos clínicos de la infección primaria la proporción de

macrófagos infectados y de otras células no T aumenta drásticamente (Beebe *et al.*, 1994). El ADN proviral de FIV puede ser detectado en linfocitos T vírgenes, CD4⁺, CD8⁺ y en células B Ig⁺. Después de 2-6 semanas de infección, los niveles máximos de provirus se encuentran en células CD4⁺ y luego de tres meses, en células B Ig⁺ (English *et al.*, 1993). La presencia de provirus en células B diferencia al tropismo celular de FIV respecto del de otros lentivirus.

3.4. Respuesta inmune

Durante la infección con FIV, se desarrollan tanto una respuesta humoral caracterizada por la presencia de anticuerpos neutralizantes como celular específica contra FIV. Los anticuerpos neutralizantes son importantes para la eliminación del virus durante la infección temprana y las células T citotóxicas desempeñan un rol posterior eliminando las células infectadas (Hohdatsu *et al.*, 2003). Otro mecanismo de defensa contra la infección con FIV incluye una actividad no citotóxica de las células T CD8⁺ que impide la replicación de FIV mediante la secreción de factores solubles con actividad antiviral (Hohdatsu *et al.*, 2003). La respuesta humoral es fuerte y elevada durante el curso de la infección con FIV. Probablemente, la respuesta del sistema inmune contribuya a mantener la infección bajo control, pero finalmente la incapacidad del hospedador de eliminar al virus es lo que permite la persistencia del mismo y el desarreglo progresivo de la función inmune (Bendinelli *et al.*, 1995). Se ha estudiado en gatos infectados con FIV el desarrollo de anticuerpos neutralizantes con capacidad de inhibir tanto la replicación viral como la formación de sincicios en células fibroblásticas de riñón de gato CrFK. Uno de los epitopes capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes se localiza en la región V3 de la glicoproteína Env (Pancino *et al.*, 1993). Luego de 5-6 semanas de la infección, la producción de anticuerpos neutralizantes anti-FIV es activa, alcanzando una meseta a los 3-4 meses postinfección que se mantiene durante largos períodos de tiempo (Tozzini *et al.*, 1993).

3.5. Manifestaciones clínicas de la infección con FIV

La enfermedad provocada por la infección con FIV puede ser dividida en cinco fases en base a la gravedad de las manifestaciones clínicas que exhiben los animales infectados (Ishida & Tomoda, 1990):

- 1) Fase aguda: En general, se extiende durante las primeras cuatro semanas postinfección. En muchos casos, la infección primaria es silenciosa pero comúnmente se manifiesta como una enfermedad transitoria con linfadenopatía generalizada.
 - 2) Fase asintomática: Después que desaparecen los síntomas de la fase aguda, la infección es clínicamente silenciosa durante largos períodos de tiempo, pudiéndose extender durante años. Aún en esta fase, es posible aislar virus en células monocíticas periféricas, plasma y saliva (Matteucci *et al.*, 1993). La evolución de la infección es lenta y la duración de esta fase no se correlaciona con su prognosis.
 - 3) Linfadenopatía persistente y generalizada: Se caracteriza por un aumento generalizado en el tamaño de los nódulos linfáticos. En esta etapa hay signos evidentes de la enfermedad tales como fiebres recurrentes, anorexia y pérdida de peso (Pedersen *et al.*, 1989).
 - 4) Conjunto de manifestaciones relacionadas al SIDA (ARC, "AIDS-related complex"): Este término se introdujo en la medicina para indicar un grupo de manifestaciones clínicas que no llegan a completar la definición de SIDA. Es útil para las infecciones provocadas por FIV, ya que no se conoce en profundidad la patología que provoca la infección con este virus. En esta fase los gatos infectados presentan infecciones secundarias crónicas en la cavidad oral y en el tracto respiratorio superior. La mayoría de los casos que presentan ARC desarrollan luego FAIDS (síndrome de inmunodeficiencia adquirida de felinos) (Ishida & Tomoda, 1990).
 - 5) Síndrome de inmunodeficiencia adquirida de felinos (FAIDS): Es muy similar al SIDA de humanos. Los gatos clínicamente enfermos presentan infecciones secundarias graves y, en los casos más severos, sufren desórdenes neoplásicos y neurológicos (Lafrado *et al.*, 1993). Los gatos infectados pueden presentar tumores e infecciones múltiples causadas por agentes oportunistas y resistentes al tratamiento.
- Aún cuando las infecciones provocadas por FIV se caracterizan por la aparición de manifestaciones clínicas bien definidas, el defecto principal que caracteriza a este síndrome es la disfunción inmune y la eliminación progresiva de linfocitos T CD4⁺. La desaparición de estas células de la circulación se desarrolla en dos etapas; primero, hay una disminución rápida durante la infección primaria, seguida de una reducción más gradual de estas células. En los gatos infectados, la relación de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ se invierte debido a la disminución de las células T CD4⁺ y a la expansión de las células citotóxicas CD8⁺. Por otro lado, el recuento de células B permanece constante durante la infección (Bendinelli *et al.*, 1995).

El ensamblado de los lentivirus ocurre en la etapa final del ciclo de replicación. Es el proceso por el cual todos los componentes del virión se organizan en una estructura ordenada para formar una partícula viral con capacidad infectiva y replicativa. De este modo, se garantiza la transferencia del genoma viral de una célula a otra. Aún cuando se han identificado los componentes que conforman la partícula viral, la información con la que se cuenta respecto de los mecanismos involucrados en el proceso de ensamblado lentiviral es limitada y proviene fundamentalmente de estudios realizados en los lentivirus de primates HIV-1 y SIV.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las proteínas estructurales del virión son derivadas de tres precursores poliproteicos: Gag, Gag-Pol y Env. Cada precursor poliproteico tiene las características necesarias para mediar pasos específicos de la morfogénesis viral y cada uno sufre cambios a lo largo de este proceso que le permiten adquirir características funcionales nuevas y necesarias para la infección y replicación virales. Durante el proceso de brotación se liberan al medio extracelular partículas virales inmaduras, las cuales no son infecciosas. Pero el procesamiento proteolítico posterior, mediado por la proteasa viral PR, no sólo permite la maduración del virión, convirtiéndolo en infeccioso, sino que además permite que el virión tenga la capacidad de desarmarse en los distintos componentes virales luego de infectar una nueva célula blanco (Freed, 1998).

El precursor Gag tiene la capacidad de autoensamblarse en una estructura ordenada y de brotar al medio extracelular como partícula pseudoviral inmadura. En efecto, se ha demostrado que la expresión de Gag de HIV-1 y SIV utilizando tanto el sistema de expresión del virus vaccinia recombinante como el de baculovirus resulta en el ensamblado y brotación de partículas que son morfológicamente indistinguibles de las partículas inmaduras que se producen durante la infección con HIV-1 y SIV (Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Karacostas *et al.*, 1989). Por otro lado, estudios de mutagénesis dirigida realizados con el gen *gag* de HIV-1 apoyan el concepto que la poliproteína Gag posee la información necesaria para dirigir el proceso de ensamblado viral (Hong & Boulanger, 1993; von Poblitzki *et al.*, 1993; Wang & Barklis, 1993).

4.1. La proteína MA

La proteína MA constituye el dominio amino terminal del precursor Gag de todos los retrovirus. En el virión maduro, la MA se encuentra inmediatamente por debajo de la bicapa lipídica de la envoltura del virión. Durante el proceso de ensamblado, el dominio MA interviene en el transporte e interacción del precursor Gag con la membrana plasmática. La señal de miristilación ubicada en el extremo amino terminal de la proteína MA, Met-Gly-X-X-X-Ser, determina la adición del ácido mirístico en la glicina en posición 2 luego de la eliminación de la metionina iniciadora. Esta modificación es cotraduccional y esencial para la asociación estable de la poliproteína Gag con la membrana. En este sentido, se ha demostrado que tanto en HIV-1 como en SIV la miristilación del precursor Gag es necesaria para el ensamblado eficiente de las partículas virales (Delchambre *et al.*, 1989; Göttlinger *et al.*, 1989). Además de la modificación por miristilación, en el extremo amino de la MA de HIV-1 y SIV existe una región rica en aminoácidos básicos (residuos 26-32) que contribuye al transporte y a la interacción de Gag con la membrana plasmática (González *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Esta región establecería interacciones electroestáticas con fosfolípidos ácidos de la cara interna de la membrana plasmática reforzando la asociación del precursor Gag con la membrana (Zhou *et al.*, 1994). Nuestro laboratorio ha demostrado que la asociación estable de la poliproteína Gag de SIV con la membrana plasmática requiere de la acción conjunta de los siguientes dominios de la MA: el ácido mirístico, la región polibásica y dos residuos altamente conservados, la valina en posición 7 y la leucina en posición 8 (González & Affranchino, 1998). La valina 7 y leucina 8 contribuirían, mediante interacciones hidrofóbicas adicionales, a la estabilidad de unión del precursor Gag con la membrana. Otra alternativa es que estos residuos contribuyan a mantener la conformación del extremo amino del dominio MA, de manera que el ácido mirístico se exponga adecuadamente y pueda insertarse en la membrana (González & Affranchino, 1998). La importancia de la leucina 8 en la interacción de Gag con la membrana fue posteriormente demostrada también para HIV-1 (Ono & Freed, 1999). Se ha determinado la estructura cristalina de las proteínas MA de HIV-1 y SIV encontrándose que ambas proteínas, en el cristal, se ensamblan en trímeros (Hill *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995). En el caso de HIV-1, cada monómero de la proteína MA se halla compuesto por 5 α -hélices, mientras que en el caso de SIV, la MA exhibe 7 α -hélices. De acuerdo con la estructura cristalina de ambas proteínas, la

región polibásica y los residuos valina 7 y leucina 8 se hallan en una zona expuesta que puede cooperar con el ácido mirístico en la asociación de la proteína MA con la membrana plasmática (Hill *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995). Hay evidencias que indican que las proteínas MA de HIV-1 y SIV juegan también un rol importante en el ensamblado viral y en la incorporación de la glicoproteína Env a viriones. Respecto del ensamblado viral, la proteína MA de SIV es capaz de autoensamblarse en partículas con morfología lentiviral inmadura cuando es expresada en ausencia del resto de las proteínas virales (González *et al.*, 1993). Además, sustituciones aminoacídicas y deleciones en la región central de la proteína MA de HIV-1 y SIV bloquean la producción de viriones (Chazal *et al.*, 1995; Freed *et al.*, 1994; González & Affranchino, 1995; González *et al.*, 1996). Respecto de la asociación de Env a viriones, las proteínas MA de HIV-1 y SIV presentan una región que se extiende desde la hélice 1 hasta el comienzo de la hélice 2 (residuos 10-35), la cual alberga los aminoácidos que son esenciales para la incorporación de la glicoproteína Env a las partículas virales (Freed & Martin, 1996; Manrique *et al.*, 2003; Murakami & Freed, 2000).

4.2. La proteína CA

En el virión maduro, la proteína CA forma una cubierta proteica que rodea al complejo ribonucleoproteico formado por la proteína NC y el ARN genómico viral. A este conjunto se lo conoce como "core" viral. La proteína CA de HIV-1 está compuesta por dos dominios: una región amino terminal (residuos 1-145) que interviene en la maduración del virión y en la incorporación de la proteína celular ciclofilina A, y una región carboxilo terminal (residuos 151-231) que interviene en las interacciones Gag-Gag necesarias para el ensamblado de partículas virales (Dorfman *et al.*, 1994). La integridad del dominio amino terminal de la proteína CA es necesaria para que el "core" adopte en la partícula madura la forma de cono, pero es innecesaria para el ensamblado de partículas inmaduras (Dorfman *et al.*, 1994). En HIV-1, el dominio amino terminal de la proteína CA interactúa con una peptidilprolil, *cis-trans* isomerasa celular, la ciclofilina A (Luban *et al.*, 1993). La incorporación de esta proteína celular en el virión de HIV-1 es necesaria para su infectividad. Los primeros estudios sugirieron que la unión de la ciclofilina A facilitaría, luego de la entrada del virus a la célula, el desarmado de la partícula viral (Gamble *et al.*, 1996). Sin embargo, se demostró luego que "cores" conteniendo distintos niveles de ciclofilina A no muestran *in vitro* diferencias en cuanto a su estabilidad cuando se los trata con detergentes (Wieggers *et al.*, 1999). Mas aún,

experimentos adicionales realizados *in vitro* indican que la ciclofilina A no desestabiliza el ensamblado de la proteína CA. Por ello, se ha propuesto que esta proteína celular tendría actividad de chaperona durante la maduración de las partículas de HIV-1 (Grattinger *et al.*, 1999). En solución, la proteína CA de HIV-1 exhibe la capacidad de formar dímeros y es el dominio carboxilo terminal de la CA el que media esta interacción (Gamble *et al.*, 1997). Este dominio carboxilo terminal tiene una estructura globular compuesta por 4 α -hélices y presenta una región de dimerización ubicada alrededor de la hélice 2. Mutaciones en esta región helicoidal impiden la dimerización de la proteína CA y la replicación viral (Gamble *et al.*, 1997). En el contexto del precursor Gag, la región de dimerización se extendería hasta el péptido espaciador p2 localizado entre los dominios CA y NC. La capacidad de esta región CA-p2 de adoptar una conformación helicoidal parece ser crucial durante el ensamblado, ya que mutaciones en esta región llevan a la formación de partículas con morfología aberrante (Morikawa *et al.*, 2000). Cabe destacar que en el dominio carboxilo terminal de la proteína CA se encuentra una región de 20 aminoácidos, altamente conservada entre las proteínas CA de los distintos retrovirus, llamada la "región principal de homología" o MHR (Ebbets-Reed *et al.*, 1996). Esta región es importante para la replicación viral y tendría un rol crítico en el ensamblado, pero no contribuiría a la dimerización de la proteína CA (Mammano *et al.*, 1994).

4.3. La proteína NC

La NC es una pequeña proteína básica de 60-90 aminoácidos que en el virión maduro se encuentra en el "core" interaccionando con el ARN genómico viral. Durante el ensamblado viral, esta proteína media la incorporación del ARN genómico viral a la partícula. Para ello, la mayoría de las proteínas NC retrovirales cuentan con al menos un motivo aminoacídico llamado motivo "Cisteína-Histidina" (Aldovini & Young, 1990). Estas estructuras están compuestas por $CX_2CX_4HX_4C$ (CCHC), en donde C denota al residuo cisteína, H al residuo histidina y X a cualquier aminoácido. Estos motivos CCHC pueden coordinar iones zinc y son similares a los "dedos de zinc" encontrados en las proteínas que interactúan con ácidos nucleicos. Los motivos CCHC establecen interacciones específicas con una región de empaquetamiento presente en el ARN viral denominada "psi o E", la cual se encuentra antes del comienzo del gen *gag* y es necesaria para la incorporación eficiente del ARN genómico a la partícula viral (Jewell

& Mansky, 2000). En HIV-1, mutaciones que alteran la naturaleza de los motivos CCHC impiden la producción de partículas, por lo cual se les ha asignado también un rol en el proceso de ensamblado viral (Dorfman *et al.*, 1993). En este sentido, ensayos de interacción de proteínas Gag *in vitro* sugieren que el dominio NC participa de las interacciones que conducen a la formación de viriones (Burniston *et al.*, 1999).

4.4. Otros dominios de Gag

El precursor Gag posee regiones específicas que intervienen en el proceso de brotación de la partícula viral durante la etapa final del proceso de ensamblado. Esta región conocida como dominio L o dominio de ensamblado tardío tiene un motivo altamente conservado, rico en prolina, el cual constituye un sitio de interacción con factores celulares. El primer dominio L fue identificado en HIV-1 y está ubicado en el dominio p6 de Gag, el cual es el péptido C-terminal de los precursores Gag de HIV-1 y SIV. El motivo P(T/S)AP presente en la porción amino terminal de p6 es crucial para la liberación de las partículas virales al medio extracelular (Göttlinger *et al.*, 1991). Si bien los lentivirus de animales no primates carecen del péptido p6, presentan un motivo P(T/S)AP en el extremo carboxilo terminal de Gag. La excepción es EIAV que presenta un motivo YXXL con función similar (Puffer *et al.*, 1997). Los dominios L identificados en distintos retrovirus pueden ser intercambiados funcionalmente, lo que indica que pueden ejercer su acción independientemente del resto del contexto de Gag (Yuan *et al.*, 2000). Se ha podido establecer que el mecanismo por el cual el dominio L interviene en la liberación de las partículas virales es la unión a proteínas celulares que facilitan la brotación viral. En efecto, se ha demostrado que en HIV-1 el motivo PSAP interactúa con la proteína celular Tsg 101 (Garrus *et al.*, 2001). La unión de Tsg 101 al precursor Gag le permite a la proteína viral reclutar a los componentes de la vía endocítica celular, los cuales funcionarían de manera inversa, promoviendo la liberación de los viriones (Carter, 2002).

5. Objetivos de la tesis

Como ya se ha mencionado, el virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) es un lentivirus que induce en gatos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA de humanos. Debido a esto, FIV constituye un modelo atractivo para el estudio de las infecciones producidas por HIV-1. Sin embargo, el conocimiento disponible respecto de una etapa fundamental del ciclo de vida de FIV, como es su morfogénesis, es muy limitado. En efecto, no se han identificado aún dominios de ensamblado en la poliproteína Gag de FIV, ni se ha estudiado el rol que cumple cada uno de sus dominios en el ciclo de replicación viral. La caracterización de los determinantes moleculares involucrados en el ensamblado de FIV y su comparación con los de HIV-1 y SIV proporcionará información relevante respecto de cómo han evolucionado estos procesos en los lentivirus. Por otro lado, al ser FIV un patógeno de felinos de importancia para la medicina veterinaria, su estudio podrá favorecer a sus hospedadores naturales.

En este trabajo de tesis se propuso entonces:

- Reproducir el ensamblado de FIV a través de la expresión del precursor Gag utilizando el sistema de expresión recombinante del virus vaccinia.
- Estudiar el rol que desempeña el dominio MA de FIV en el ensamblado viral a través de la mutagénesis dirigida de este dominio como primer paso en la caracterización de las regiones funcionales de la poliproteína Gag.
- Establecer las relaciones estructurales y funcionales entre las proteínas MA de lentivirus de primates y de lentivirus de animales no primates. Para ello, se generaron virus quiméricos derivados de SIV o FIV en los que se reemplazó parcial o totalmente el dominio MA de Gag de uno de estos virus por el dominio equivalente del otro. Se estudió entonces la habilidad de estos virus quiméricos de ensamblarse en partículas y su capacidad infectiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células y virus

Para los ensayos de infección con los virus vaccinia recombinantes se utilizaron células de riñón de mono verde africano CV-1 (American Type Culture Collection, ATCC, E.E.U.U.). Para la selección y purificación de los virus vaccinia recombinantes se utilizaron células de embrión de rata Rat-2 deficientes en timidina quinasa (TK⁻). Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 ng/ml de anfotericina B (antibiótico-antimicótico, GIBCO). El virus vaccinia parental utilizado para generar los virus recombinantes fue el de la cepa WR (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, NIH).

Para los ensayos de transfección con el ADN proviral de FIV se usaron células de riñón de gato Crandell (CrFK) crecidas en medio D-MEM suplementado con 10% SFB.

En los experimentos de transfección con el ADN proviral de SIV se emplearon células de riñón humano 293T (ATCC), mientras que para los ensayos de infectividad de ciclo único se emplearon las células MAGI-CCR5 (HeLa-CD4-CCR5/LTR-β-Gal) (Chackerian *et al.*, 1997). Estas últimas fueron obtenidas del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (E.E.U.U.). Las células MAGI-CCR5 fueron crecidas en medio D-MEM suplementado con 10% SFB conteniendo 0,2 mg/ml de G418 (geneticina); 0,1 mg/ml de higromicina B y 1 µg/ml de puromicina.

En los experimentos de cinética de replicación viral se utilizó la línea celular linfoidea felina MYA-1 (ATCC) propagada en medio RPMI-1640 (HyClone, Perbio Science Company) suplementado con 10% SFB, 100 U/ml de interleuquina-2 (Roche) y 50 µM de β-mercaptoetanol.

2. Construcción y obtención de los virus vaccinia recombinantes que expresan el gen gag o el dominio MA de FIV

2.1. Amplificación del gen gag y de la región codificante para el dominio MA de FIV

Tanto la amplificación del gen gag como la del dominio MA de FIV se realizaron utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Como molde en las reacciones de PCR se utilizó el ADN proviral del aislamiento 2489_7 de FIV (Sodora *et*

al., 1995), cedido gentilmente por el Dr. James I. Mullins (University of Washington, Seattle, E.E.U.U.).

El fragmento de ADN correspondiente al gen *gag* se extiende desde el nucleótido (nt) 634 al 1983 en el genoma del aislamiento 2489_7, mientras que el dominio MA comienza en el nt 634 y finaliza en el 1038. En las reacciones de amplificación se utilizaron oligonucleótidos iniciadores que llevan las secuencias de reconocimiento para las enzimas *SaI* y *Bam*HI de manera de facilitar el clonado de los fragmentos obtenidos en el vector de transferencia pMJ601 (Davison & Moss, 1990). En el caso de la amplificación del dominio MA de FIV, además del sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, el oligonucleótido iniciador 3' introduce un codón de terminación de la traducción.

Para la amplificación de estos fragmentos se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

Oligonucleótido sentido:

5' TCA GTC GAC ATG GGG AAT GGA C^{3'} nt 634-646
SaI

Oligonucleótido antisentido para la región MA:

5' CTG TTG GAT CCT AAT AAG CCT GTG G^{3'} nt 1038-1027
*Bam*HI

En **negrita** se indica el codón de terminación introducido.

Oligonucleótido antisentido para el gen *gag*:

5' TAT GGA TCC TTA TAA ATC TAA CAG TTT^{3'} nt 1983-1966
*Bam*HI

Tanto la reacción de amplificación del gen *gag* como la del dominio MA de FIV se realizaron según el siguiente esquema: 5 minutos a 94 °C para desnaturalizar el molde de ADN y luego 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 68 °C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un ciclador Mini Cycler (MJ Research, Inc.) utilizando 2,5 unidades de la enzima Elongasa (ELONGASE High Fidelity Mix, Invitrogen) en un volumen final de reacción de 100 µl conteniendo 60 mM Tris-SO₄ (pH 9,1 a 25 °C); 18 mM (NH₄)₂SO₄; 1,6 mM MgSO₄. Cabe mencionar que la enzima Elongasa posee capacidad correctora ("Proof-reading") que minimiza la

incorporación errónea de nucleótidos durante la amplificación. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE 1X (100 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA [pH 8,3]). Los fragmentos de ADN amplificados fueron tratados con proteinasa K (100 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C y luego incubados 10 minutos a 65 °C para inactivar la enzima. Posteriormente, los fragmentos fueron purificados utilizando el sistema comercial Wizard DNA Clean-up (Promega) y luego precipitados agregando 1/10 del volumen de 3 M acetato de sodio (pH 5,2) y dos volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se dejaron durante 16 horas a -20 °C. Los fragmentos de ADN fueron recuperados por centrifugación a 16.000xg durante 20 minutos. El ADN fue lavado con etanol 70%, secado al vacío y finalmente resuspendido en agua bidestilada. Posteriormente, los fragmentos de ADN fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *SaI*l y *Bam*HI. Luego de la digestión, los productos de la amplificación fueron purificados a partir de un gel de agarosa por el método de Tautz y Renz (1983) como se describe brevemente a continuación. Una vez realizada la electroforesis, la banda de ADN de interés fue cortada del gel e incubada en una solución de 0,3 M acetato de sodio (pH 7) durante 30 minutos en la oscuridad. Luego, se colocó la sección de agarosa en un tubo Eppendorf de 500 µl con un orificio en el fondo cubierto con lana de vidrio pretratada con silano. El tubo con la sección de agarosa fue congelado a -70 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se introdujo el tubo dentro de otro Eppendorf de 1,5 ml y este dispositivo se centrifugó durante 10 minutos a 16.000xg. La agarosa fue retenida en la lana de vidrio mientras que la solución de ADN se recogió en el tubo de 1,5 ml. El fragmento de ADN recuperado fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20 °C. Finalmente, los fragmentos de ADN se recuperaron por centrifugación a 16.000xg como se describió arriba.

2.2. Clonado del gen *gag* y del dominio MA de FIV en el vector de transferencia pMJ

601

Para clonar tanto el gen *gag* como el dominio MA de FIV se utilizó el vector de transferencia pMJ601 (Davison & Moss, 1990) (Figura 6) previamente digerido con las enzimas de restricción *SaI*l y *Bam*HI. Los fragmentos de ADN correspondientes al gen *gag* y al dominio MA de FIV fueron ligados en forma independiente al vector de transferencia pMJ601. De esta manera, el gen *gag* de FIV y el dominio MA quedan bajo

el control del promotor tardío sintético del virus vaccinia. Además, el plásmido contiene el gen que codifica para la β -galactosidasa (*lac Z*) bajo el control del promotor temprano (Figura 6).

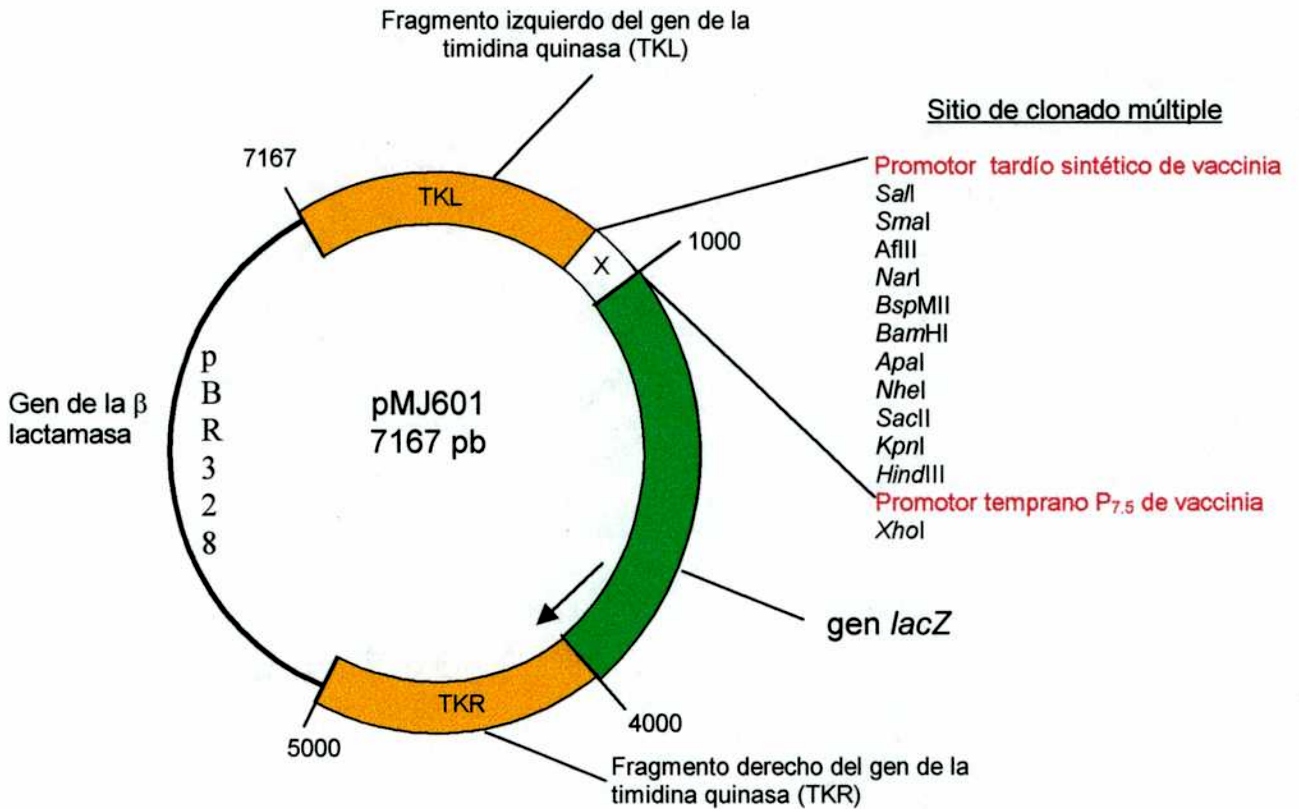


FIGURA 6. Esquema del vector de transferencia pMJ601

En las reacciones de ligación se utilizaron 0,5 unidades de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen) en un volumen final de 10 μ l de una mezcla de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,6); 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT, 1% PEG (polietilenglicol 8000). Las mezclas de ligación fueron incubadas durante toda la noche a 16 °C y luego utilizadas para transformar bacterias competentes.

2.3. Transformación de bacterias competentes

Para transformar con las mezclas de ligación las bacterias competentes *E. coli* cepa 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*) se siguió el protocolo de Hanahan (1983). Las bacterias competentes fueron descongeladas a temperatura ambiente y mantenidas en

hielo durante 10 minutos. Se agregaron 50 µl de las bacterias competentes a cada reacción de ligación y las muestras resultantes fueron incubadas 30 minutos en hielo. Posteriormente, cada mezcla fue incubada primero a 42 °C durante 90 segundos y luego en hielo durante 2 minutos. La recuperación de las bacterias transformadas con cada mezcla de ligación se llevó a cabo agregando 250 µl de medio LB (1% triptona; 0,5% extracto de levaduras; 1% NaCl) e incubando a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, las bacterias fueron sembradas en cajas de petri conteniendo medio LB-1,5% agar y 100 µg/ml de ampicilina con el fin de seleccionar las bacterias resistentes al antibiótico. Las cajas de petri fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

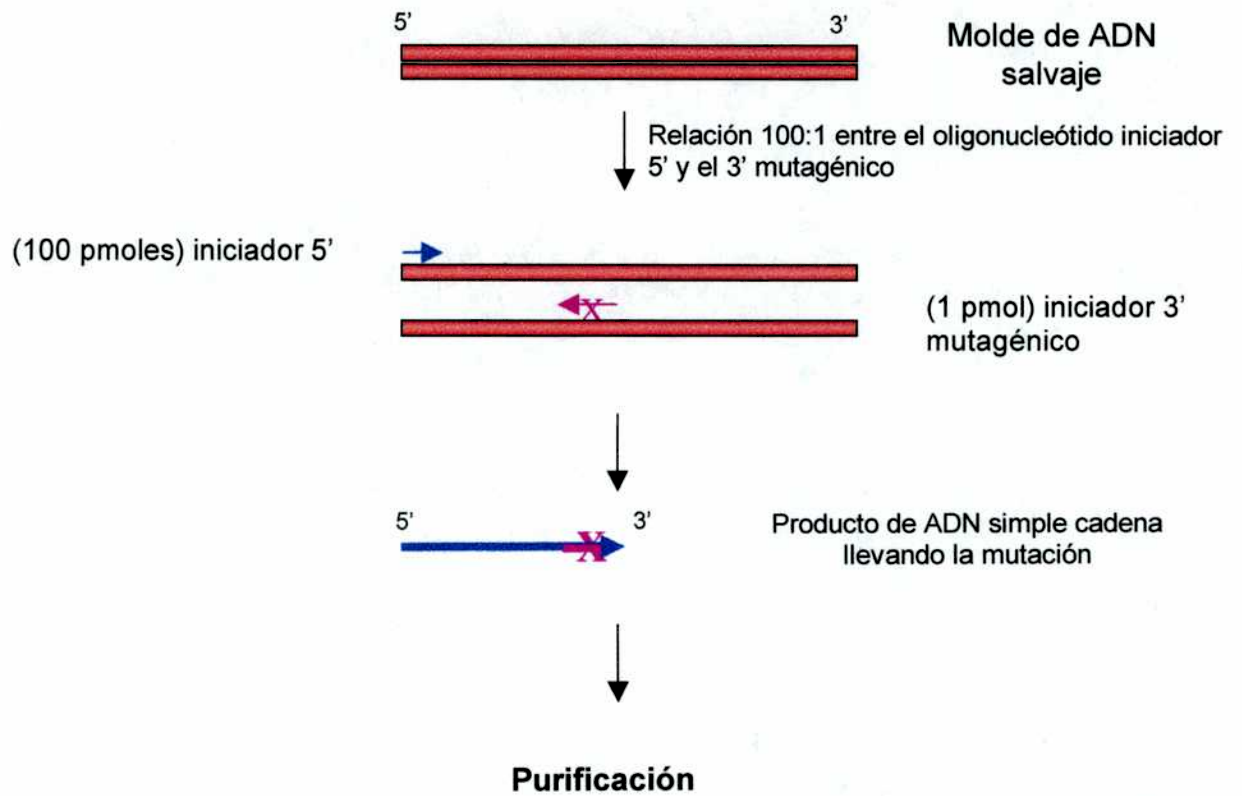
2.4. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de los clones provenientes de cada transformación fue purificado siguiendo el método de lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981) con algunas modificaciones. Las colonias fueron sembradas en medio líquido LB-ampicilina e incubadas durante toda la noche a 37 °C. Los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 16.000xg durante 2 minutos y el sedimento fue resuspendido en 100 µl de buffer TELT (50 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 62,5 mM EDTA; 0,4% Tritón X-100; 2,5 M LiCl; 100 µg/ml lisozima). Las suspensiones fueron incubadas 5 minutos a temperatura ambiente, hervidas durante 1 minuto y luego mantenidas en hielo durante 2 minutos. Para eliminar el ADN cromosomal, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 16.000xg durante 20 minutos. El ADN plasmídico presente en el sobrenadante fue precipitado agregando un volumen de isopropanol e incubando la muestra durante 20 minutos a temperatura ambiente. El ADN plasmídico se sedimentó por centrifugación a 16.000xg durante 20 minutos y se resuspendió en agua bidestilada. Una fracción del ADN purificado se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción *SaI* y *Bam*HI para identificar aquellos clones con el inserto de interés. Las digestiones fueron resueltas por electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron los fragmentos de ADN a la luz ultravioleta luego de teñir el gel con bromuro de etidio.

2.5. Mutagénesis dirigida del dominio MA de FIV

Las mutaciones fueron introducidas en la región codificante del dominio MA del gen *gag* de FIV utilizando la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica (González *et. al*, 1993; Perrin & Gilliland, 1990). En las reacciones de amplificación, se

Primera Etapa de Amplificación



Segunda Etapa de Amplificación

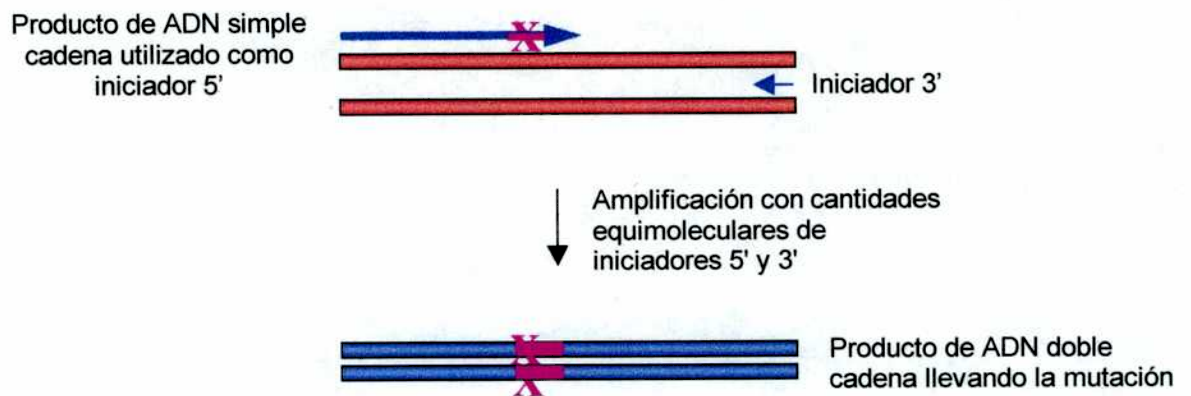


FIGURA 7. Esquema de la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica

Segundo paso de amplificación.

Oligonucleótido sentido:

Se utilizó el ADN simple cadena obtenido en el primer paso de la reacción.

Oligonucleótido antisentido:

5' TGG AGG TCC TTC TTC TTT TCC 3' nt 1029-1009
DraII

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción del mutante M1 fueron:

Oligonucleótido sentido:

5' TCA GTC GAC ATG GCG AAT GGA CAG 3' nt 634-648, sustitución aminoacídica G2A
SaI

En **negrita** y **subrayado** se indica el cambio nucleotídico introducido.

Oligonucleótido antisentido:

5' TGG AGG TCC TTC TTC TTT TCC 3' nt 1029-1009
DraII

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de los mutantes de delección fueron:

Primer paso de amplificación.

Oligonucleótido sentido:

5' TCA GTC GAC ATG GGG AAT GGA C 3' nt 634-646
SaI

Oligonucleótidos mutagénicos antisentido:

Aminoácidos
deleccionados
en la MA de FIV

5' GT AGT TAC ATT AGC ∇ TCT AAA GTT TCC TTC 3'	nt 770-727	WAIRM (37-41)
5' CT TAA CTG ATC TAA ∇ ACC AGG TTC TCG TCC 3'	nt 815-772	DIPET (52-56)
5' TC TCT TCT GTC TTG ∇ TCT TAA CTG ATC TAA 3'	nt 848-802	SIICDL (62-67)
5' CAT ATT TAG AAT TCC ∇ TTT TAA AGT GGT AAT 3'	nt 927-882	VFAVA (89-93)
5' CC CCC ACT TTC TTT TAT ∇ TAA TCC CAT CTG AG 3'	nt 1009-963	DTRPS (116-120)

Con el símbolo ∇ se señala la posición de las delecciones introducidas y a la derecha se indican los aminoácidos deleccionados y su posición en la MA de FIV.

Segundo paso de amplificación.

Oligonucleótido sentido:

Se utilizó el ADN simple cadena obtenido en el primer paso de la reacción.

Oligonucleótido antisentido:

5' TGG AGG TCC TTC TTC TTT TCC 3' nt 1029-1009
Drall

2.6. Construcción de los genes *gag* de FIV llevando las mutaciones en el dominio MA

Los fragmentos de PCR llevando las mutaciones deseadas fueron digeridos por *SaII/Drall* y utilizados para reemplazar el fragmento equivalente en el gen *gag* salvaje de FIV clonado en el vector de transferencia pMJ601. Para ello, el plásmido pMJ601 conteniendo el gen *gag* se digirió por *SaII/Drall* para liberar el fragmento *SaII/Drall* del gen *gag* y purificar el fragmento de ADN que contiene el resto del gen y la totalidad del plásmido. A este último fragmento se ligaron los productos de PCR llevando las mutaciones en el dominio MA. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α con las distintas mezclas de ligación. Los clones recombinantes se identificaron purificando el ADN plasmídico y digiriéndolos con enzimas de restricción. Esta estrategia de reemplazar el fragmento de restricción *SaII/Drall* del gen *gag* salvaje por cada uno de los fragmentos mutagenizados evita la amplificación de la totalidad del gen *gag* en cada reacción de mutagénesis.

2.7. Secuenciación por el método de Sanger

Para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas y la ausencia de mutaciones no deseadas se utilizó la técnica de secuenciación de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

2.7.1. Preparación del molde de ADN.

El ADN plasmídico utilizado como molde fue purificado utilizando el sistema comercial Wizard Plus SV Minipreps KIT (Promega). 2 μ g de ADN plasmídico fueron desnaturalizados llevando la solución a una concentración final de 0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA. Luego de incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 1/10 del volumen de 3 M acetato de sodio (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para precipitar el ADN se incubó la muestra a -70 °C durante 10 minutos.

Finalmente, el ADN plasmídico fue centrifugado durante 10 minutos a 16.000xg y resuspendido en 10 μ l de agua destilada.

2.7.2. Reacción de hibridación.

Al ADN desnaturalizado se le agregaron 2 μ l de buffer de hibridación (300 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 100 mM MgCl₂; 160 mM DTT) y 2 μ l de una solución 3 μ M del oligonucleótido iniciador de secuencia. Las mezclas fueron incubadas durante 5 minutos a 65 °C, 10 minutos a 37 °C y finalmente 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 2 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, NEN) y 3 μ l de una mezcla 1,5 μ M de dGTP, dCTP y dTTP. La reacción fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2.7.3. Elongación y terminación de la cadena.

Se prepararon cuatro tubos de 1,5 ml (rotulados G, A, T y C) conteniendo cada uno 2,5 μ l de una solución de nucleótido terminador (80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dTTP, 80 μ M dCTP y 8 μ M de ddGTP o ddTTP o ddATP o ddCTP, según corresponda). A cada tubo G, A, T y C se le agregaron 4,5 μ l de la mezcla de la etapa anterior. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 5 minutos y finalmente la reacción se detuvo agregando 5 μ l de una solución 95% formamida; 20 mM EDTA; 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilen-cianol FF. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas por electroforesis en gel de 5% poliacrilamida conteniendo una concentración de 8 M urea en buffer TBE 1X y posterior autorradiografía con película X-OMAT AR-5 (Eastman KODAK).

2.8. Infección-transfección de células CV-1

Para la generación de los virus vaccinia recombinantes, las células CV-1 fueron sembradas en botellas de 25 cm² de superficie e incubadas durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂. Las células fueron infectadas con el virus vaccinia salvaje cepa WR a una multiplicidad de infección (moi) de 0,05. Luego de dos horas, el inóculo viral fue retirado y la monocapa de células fue transfectada con 3 μ g de ADN plasmídico de los clones en pMJ601 del gen *gag* salvaje de FIV, o de la región codificante de la MA o de los genes *gag* mutados. Para la transfección se utilizaron 18 μ l de liposomas catiónicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen) en 600 μ l de medio D-MEM siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células fueron incubadas con

las mezclas de transfección durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, se descartó el medio de cada botella y se agregó D-MEM conteniendo 6% SFB. Los virus vaccinia recombinantes se generan al insertarse el gen de interés en el genoma de vaccinia por recombinación homóloga entre el vector de transferencia pMJ601 y el genoma del virus a través de las regiones del gen TK que flanquean al gen de interés (Figura 6). La recombinación ocurre al transfectar con el vector de transferencia las células que han sido previamente infectadas con el virus vaccinia salvaje. A las 48 horas postinfección, se prepararon los stocks de virus por congelamiento/descongelamiento (3 ciclos) de las células y de los sobrenadantes de cultivo, los cuales fueron utilizados para seleccionar los virus recombinantes (ver la sección siguiente).

2.9. Selección de los virus vaccinia recombinantes

Los virus vaccinia recombinantes fueron seleccionados por su fenotipo TK⁻ y su capacidad de expresar la enzima β-galactosidasa. Para ello, la progenie viral resultante de cada infección-transfección fue utilizada para infectar células Rat-2 (TK⁻) en presencia de 5-bromo-desoxiuridina (BrdU), la cual bloquea la replicación del virus vaccinia salvaje TK⁺, y de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranósido) como sustrato cromogénico para la enzima β-galactosidasa. Se infectaron células Rat-2 (crecidas en placas de 60 mm de diámetro) con diluciones de los stocks virales. Una hora postinfección, los inóculos fueron descartados y se agregó una capa de 1% agarosa de bajo punto de fusión en medio D-MEM conteniendo 2% SFB y 25 µg/ml BrdU. Luego de 48 horas de incubación a 37 °C, se agregó una segunda capa de 1% agarosa conteniendo 300 µg/ml X-Gal. A las 16 horas, los virus recombinantes fueron identificados por su capacidad de formar placas de lisis azules, las cuales fueron recogidas en medio D-MEM y sometidas a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. Los virus recombinantes así obtenidos fueron amplificados infectando células Rat-2 (en placas de 24 pocillos) en presencia de BrdU. Los virus vaccinia resultantes en cada caso fueron sometidos a dos ciclos adicionales de selección en células Rat-2 como se describió arriba.

3. Caracterización de los virus vaccinia recombinantes

3.1. Expresión de las proteínas recombinantes y marcación metabólica

Monocapas de células CV-1 (crecidas en cajas de 35 mm de diámetro) fueron infectadas a una moi de 3-5 unidades formadoras de placas (UFP) por célula con cada uno de los virus vaccinia recombinantes obtenidos y purificados como se detalló en la sección anterior. Luego de 1 hora, se retiraron los inóculos y las células infectadas fueron incubadas en medio D-MEM/6% SFB a 37 °C y en una atmósfera de 5% CO₂. A las 14 horas postinfección, las monocapas infectadas fueron sometidas a 1 hora de ayuno en medio D-MEM deficiente en los aminoácidos metionina y cisteína (ICN Biomedicals, Inc), suplementado con 3% SFB. Posteriormente, se agregó una mezcla conteniendo 150 µCi/ml de [³⁵S]metionina/cisteína (1000 Ci/mmol, Easy Tag Express Protein Labeling Mix, NEN). Así, las células fueron incubadas en presencia del precursor radioactivo durante 5 horas a 37 °C. En los experimentos de marcación y seguimiento ("pulse-chase"), las células fueron marcadas durante 20 minutos en medio deficiente en metionina y cisteína conteniendo 250 µCi/ml de [³⁵S]metionina/cisteína. Luego de reemplazar el medio de marcación por D-MEM/6% SFB, las células fueron incubadas a 37 °C durante distintos períodos de tiempo. Las células metabólicamente marcadas fueron lavadas con solución salina de fosfato (PBS) fría, recogidas por centrifugación a baja velocidad y finalmente lisadas durante 15 minutos a 4 °C en 100 µl de buffer de lisis TNN (50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40 [NP-40]; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF]; 10 µg/ml de aprotinina). Los lisados celulares fueron centrifugados a 16.000xg durante 2 minutos para eliminar la fracción nuclear y los restos celulares. Los sobrenadantes fueron posteriormente sometidos a inmunoprecipitación con suero de gatos infectados con FIV (cedido gentilmente por el Dr. E. Hoover, E.E.U.U.). Para purificar las partículas pseudovirales, el medio de cultivo de las células metabólicamente marcadas fue clarificado dos veces por centrifugación a 800xg durante 10 minutos y luego sometido a ultracentrifugación en colchón 20% (p/v) sacarosa en PBS a 100.000xg durante 90 minutos en un rotor SW 50.1 a 4 °C. El sedimento obtenido, correspondiente al material particulado, se resuspendió en buffer TNN.

En los ensayos de inmunoprecipitación, alícuotas de los lisados celulares fueron incubadas durante 1 hora en un volumen final de 100 µl de buffer conteniendo 100 mM

Tris-HCl (pH 8,0); 0,25 M NaCl; 1% NP-40; 1% seroalbúmina bovina (BSA); 1 mM PMSF; 10 µg/ml de aprotinina y 1 µl de suero de gatos infectados con FIV. Luego de incubar 1 hora a 4 °C, se agregó una solución de proteína A-Sepharosa CL-4B (Amersham Biosciences) y las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 4 °C con agitación continua cabeza-cola. Posteriormente, los inmunocomplejos fueron lavados 3 veces con solución de lavado (100 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 500 mM LiCl; 1,5% NP-40; 0,1% BSA; 1 mM PMSF; 10 µg/ml de aprotinina). Finalmente, los inmunocomplejos fueron resuspendidos en 70 µl de buffer Laemmli 1X (Laemmli, 1970). Las partículas pseudovirales fueron inmunoprecipitadas como se describe arriba. Los inmunocomplejos fueron resueltos en geles 10 o 12% poliacrilamida-0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS) y la detección se llevó a cabo secando el gel al vacío y exponiéndolo durante 16 horas a una placa radiográfica Biomax MS-LE (KODAK) junto con una pantalla intensificadora Trans Screen Low Energy (Eastman KODAK). La cuantificación de las proteínas marcadas se realizó por densitometría de las bandas detectadas en las autorradiografías.

3.2. Ensayos de Western blot

Células CV-1 expresando el gen *gag* de FIV fueron lisadas en buffer TNN y los lisados resultantes sometidos a electroforesis en gel 10% poliacrilamida-0,1% SDS. Los geles se electrotransfirieron posteriormente 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 25 mM Tris base; 192 mM glicina; 20% metanol a un voltaje constante de 15 volts durante 90 minutos. Para la detección de las proteínas virales por quimioluminiscencia se empleó el sistema *ECL Western blotting Analysis System* (Amersham Biosciences). Las membranas fueron incubadas en una solución de 5% BSA en PBS-0,1% Tween 20 (PBST) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar las membranas con PBST, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en 3% BSA-PBST durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido también en solución 3% BSA-PBST. Luego de lavar las membranas con PBST, éstas se incubaron con los reactivos de detección provistos por el fabricante (Amersham Biosciences). La reacción de quimioluminiscencia se detectó por exposición de las membranas a películas

Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) durante diferentes períodos de tiempo. La detección de la poliproteína Gag de FIV se llevó a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal (MAb) dirigido contra la proteína CA de FIV en una dilución 1:500 (PAK3-2C1, AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, E.E.U.U.). Como anticuerpo secundario se utilizó una inmunoglobulina de oveja anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa (Amersham Biosciences)

3.3. Microscopía electrónica

Células CV-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes fueron fijadas a las 22 horas postinfección con 2,5% glutaraldehído en buffer cacodilato (0,1 M cacodilato de sodio [pH 7,2]; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂). Luego de 24 horas de fijación, las células fueron tratadas primero con buffer cacodilato conteniendo 1% tetróxido de osmio y luego con 0,5% de acetato de uranilo (González & Affranchino, 1998; González *et al.*, 1996). Se examinaron secciones de las muestras con un microscopio Phillips 210C operando a 80 KV. Las muestras fueron analizadas por el Dr. David Hockley del The National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Londres, Reino Unido.

4. Construcción del virus vaccinia recombinante que expresa la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})

En el contexto de la construcción pMJGag-PR de SIV generada por nuestro laboratorio (González *et al.*, 1993) se reemplazó la mayor parte del dominio MA del gen gag de SIV (aminoácidos 1 a 130) por la región equivalente de FIV. Se preservaron en la construcción los últimos 5 aminoácidos de la MA de SIV para asegurar que la PR viral clive en el sitio de procesamiento entre la MA y la CA.

Para la construcción de la quimera, se ligaron 2 fragmentos de PCR obtenidos en forma independiente. Por un lado, se amplificó a partir del genoma de FIV la región que codifica para los aminoácidos 1-130 de la MA (nt 634-1023). En esta reacción, se utilizó un oligonucleótido 5' iniciador llevando el sitio de reconocimiento para la enzima *SaI*. Por otro lado, a partir del clon molecular SIV_{srm}PBj 1.9 (Dewhurst *et al.*, 1990), se amplificó la región que codifica para los 5 aminoácidos carboxilo terminales de la MA de SIV y los 41 aminoácidos amino terminales de la CA de SIV (nt 1219-1362). Este fragmento incluye en su extremo 3' el sitio de restricción para la enzima *AfeI* presente en el genoma de SIV. Los dos productos de PCR fueron ligados y el fragmento

5. Caracterización del virus vaccinia recombinante que expresa la poliproteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})

5.1. Análisis de la expresión y del ensamblado de la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})

Para estudiar la síntesis y el procesamiento proteolítico de la quimera Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}), se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR. En paralelo, se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante Gag_{SIV}-PR que expresa la poliproteína Gag salvaje y el dominio PR del gen *pol* de SIV (González *et al.*, 1993). A las 14 horas postinfección, las células fueron sometidas a 1 hora de ayuno en medio D-MEM deficiente en metionina y cisteína. Posteriormente, las células fueron incubadas en presencia de 150 µCi/ml de [³⁵S]metionina/cisteína (1000 Ci/mmol, Easy Tag Express Protein Labeling Mix, NEN) durante 4 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron a 4 °C con 100 µl de buffer de lisis TNN. Los lisados celulares obtenidos fueron sometidos a inmunoprecipitación con suero de monos infectados con SIV, con suero de gatos infectados con FIV o con una mezcla de ambos. Las partículas pseudovirales fueron purificadas a partir del medio extracelular por ultracentrifugación en colchón de sacarosa como se describe en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. La fracción particulada resultante fue resuspendida en buffer TNN e inmunoprecipitada en forma similar a la descrita para los lisados celulares. Los inmunoprecipitados fueron analizados por electroforesis en geles 12% poliacrilamida-0,1% SDS. La visualización de las proteínas virales se llevó a cabo por autorradiografía de los geles como se describe en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. El suero de monos infectados con SIV fue cedido por la Dra. Patricia Fultz (University of Alabama at Birmingham, E.E.U.U.).

5.2. Marcación metabólica con [³H]ácido mirístico

Células CV-1 (en cajas de petri de 60 mm de diámetro) fueron infectadas a una moi de 5 con el virus vaccinia recombinante Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR y en paralelo con el virus vaccinia recombinante Gag_{SIV}-PR (González *et al.*, 1993) como control. A las 14 horas postinfección, las células fueron incubadas con 250 µCi/ml de [9,10-³H(N)]ácido mirístico (60 Ci/mmol, NEN) durante 7 horas a 37 °C. Las células se lisaron en buffer TNN y los lisados fueron sometidos a inmunoprecipitación utilizando una mezcla de sueros de infección anti-SIV y anti-FIV. Los inmunocomplejos fueron resueltos por

electroferesis en gel 12% poliacrilamida-0,1% SDS, el cual fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa. La detección de las proteínas virales se realizó por autorradiografía de la membrana utilizando películas KODAK Biomax MS-1 y pantalla intensificadora Trans-Screen LE (Eastman KODAK).

5.3. Fraccionamiento subcelular

Células CV-1 fueron infectadas en paralelo con los virus vaccinia recombinantes Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR y Gag_{SIV}-PR como se describe en la sección anterior. Además, como controles se infectaron células CV-1 con los virus vaccinia que expresan la poliproteína Gag salvaje de FIV (sección 2.2. de Materiales y Métodos) y Gag_{SIV} Mir⁻-PR. Este último dirige la síntesis de una poliproteína Gag de SIV con la sustitución aminoacídica G2A en el sitio de reconocimiento para la adición del ácido mirístico (González *et al.*, 1993). A las 14 horas postinfección, las células fueron marcadas metabólicamente con 100 µCi/ml de [³⁵S]metionina/cisteína durante 3 horas. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en buffer hipotónico (20 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 10 µg/ml aprotinina; 1 mM PMSF). Luego de 20 minutos de incubación, las células se rompieron mecánicamente pasando la suspensión 25 veces a través de una aguja 0,4x13 mm. Se descartaron los restos celulares y núcleos centrifugando dos veces a 1000xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se llevó a una concentración final de 0,15 M NaCl y se incubó primero en hielo durante 10 minutos para luego ser centrifugado durante 30 minutos a 120.000xg a 4 °C. Los sedimentos obtenidos (fracción de membranas) fueron resuspendidos en 100 µl de buffer TNN mientras que los sobrenadantes fueron concentrados por ultrafiltración en microconcentradores CENTRICON-10 (Amicon Inc). Las muestras concentradas fueron ajustadas a una concentración final de buffer 1X TNN. Alícuotas equivalentes de las fracciones solubles y de membrana fueron sometidas a inmunoprecipitación con suero de monos infectados con SIV o de gatos infectados con FIV. Las muestras fueron analizadas en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS y posterior autorradiografía. Las proteínas virales marcadas con ³⁵S fueron cuantificadas por densitometría.

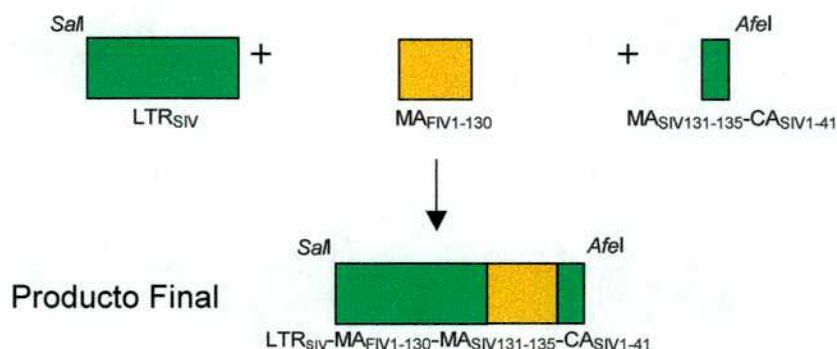
6. Construcción de los provirus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) y SIV(MA_{FIV1-130})

Para la construcción de los ADN provirales derivados de SIV en los que se reemplazó total o parcialmente el dominio MA del gen *gag* de SIV por el de FIV, se utilizó una estrategia basada en la amplificación por PCR. En estas construcciones se preservaron los últimos 5 aminoácidos del dominio MA de SIV de manera de asegurar el procesamiento correcto por la PR viral del sitio MA-CA. Como moldes para las reacciones de PCR, se utilizaron los ADN provirales de FIV 2489_7 y de SIV_{smm}PBj1.9, ambos clonados por nuestro laboratorio en los sitios *Sall*/*NotI* del vector pSV.SPORT1 (Invitrogen).

6.1. Quimera SIV (MA_{FIV1-130})

Se construyó un provirus quimérico derivado de SIV que lleva el dominio MA de FIV en lugar del de SIV. Para ello, se amplificó la región LTR de SIV (nt 1-828) utilizando un oligonucleótido 5' que hibrida en la región 5' previa al sitio *Sall* en la zona de clonado múltiple del vector pSV.SPORT1 donde se encuentra clonado el ADN proviral de SIV. De esta manera, el fragmento de ADN obtenido lleva en su extremo 5' el sitio el reconocimiento para la enzima de restricción *Sall*. Luego, se amplificó el fragmento de ADN que codifica para los 130 aminoácidos amino terminales del dominio MA de FIV (nt 634-1023 del genoma de FIV). Finalmente, se amplificó la región del genoma de SIV (nt 1219-1362) que comprende desde el codón para el aminoácido en posición 131 del dominio MA de SIV hasta el sitio de restricción *Afel* en el dominio CA del gen *gag* de SIV.

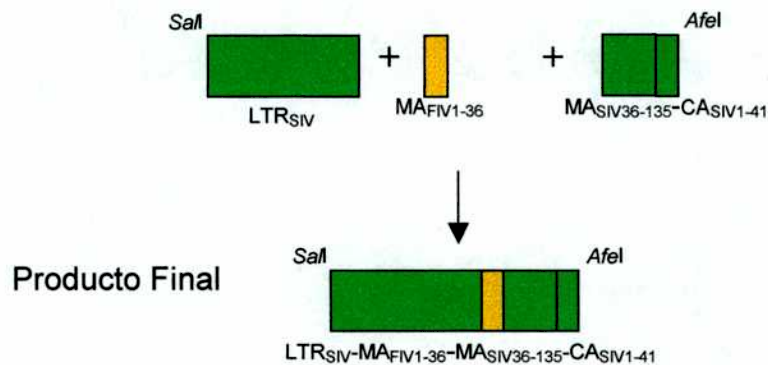
Los fragmentos amplificados fueron ligados como se detalla en el siguiente esquema:



6.2. Quimera SIV(MA_{FIV1-36})

Para la construcción quimérica que en el contexto del ADN proviral de SIV lleva la región que codifica para los primeros 36 aminoácidos del dominio MA de FIV, se amplificó en primer lugar la región LTR de SIV (nt 1-828). Luego, se amplificó por PCR la región que comprende los primeros 36 codones del dominio MA de FIV (nt 634-741 del genoma de FIV). Finalmente, se amplificó un fragmento de ADN que comprende desde el codón para el residuo en posición 36 del dominio MA de SIV hasta el sitio *Afel* presente en el dominio CA del gen *gag* de SIV (nt 936-1362).

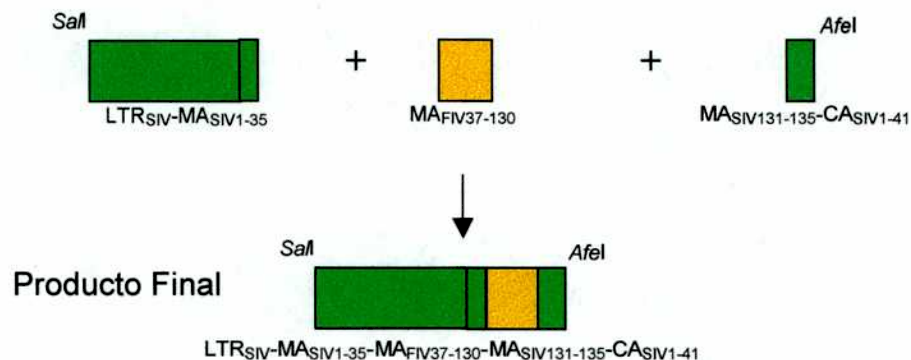
Los fragmentos amplificados fueron luego ligados como se detalla en el siguiente esquema:



6.3. Quimera SIV (MA_{FIV37-130})

Para la construcción de la quimera que posee en el contexto del genoma de SIV la región que codifica para los aminoácidos 37-130 del dominio MA de FIV, se amplificó en primer lugar un fragmento de ADN del genoma de SIV que comprende la región LTR y los primeros 35 codones del dominio MA (nt 1-933). Por otro lado, se amplificó un fragmento de ADN del genoma de FIV que corresponde a la región codificante para los aminoácidos 37-130 del dominio MA (nt 742-1023). Finalmente, se amplificó un fragmento de ADN del genoma de SIV que comprende desde el codón para el aminoácido 131 del dominio MA de SIV hasta el sitio de restricción *Afel* en el dominio CA del gen *gag* de SIV (nt 1219-1362).

Los fragmentos amplificados fueron ligados como se detalla en el siguiente esquema:



En las tres construcciones quiméricas, los productos de ligación obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción *SalI* y *AfeI* y se utilizaron para reemplazar el fragmento *SalI/AfeI* salvaje del ADN proviral de SIV clonado en el vector pSV.SPORT1 (Figura 8). Para ello, el plásmido pSV.SPORT1-SIV fue previamente digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *AfeI* y el fragmento pSV.SPORT1-SIV *SalI/AfeI* purificado a partir de un gel de agarosa. Posteriormente, se ligaron los fragmentos quiméricos al plásmido pSV.SPORT1-SIV *SalI/AfeI* y las mezclas de ligación fueron utilizadas para transformar bacterias competentes *E. coli* Stbl 2 (F- *mcrA* Δ [*mcrBC-hsdRMS-mrr*] *recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1* λ-Δ[*lac-proAB*]) (Invitrogen). Esta cepa ha sido especialmente desarrollada para clonar fragmentos de ADN con secuencias inestables (Trinh *et al.*, 1994). La transformación de estas bacterias con las mezclas de ligación se llevó a cabo utilizando la misma metodología que la descrita para las bacterias competentes DH5α (sección 2.3), pero las incubaciones se realizaron a 30 °C en lugar de 37 °C.

Las construcciones se verificaron por mapeo con enzimas de restricción y por secuenciación.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación de cada fragmento de ADN fueron:

LTR de SIV (nt 1-828)

Oligonucleótido sentido:

5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GTA CG^{3'}

nt 346-370 de pSV.SPORT1

Oligonucleótido antisentido:

5' CTC CCA CTC TCC TAC TCT TTT CTC^{3'}

nt 828-805 de SIV

Fragmento MA_{FIV1-130}

Oligonucleótido sentido:

5'P ATG GGG AAT GGA CAG GGG^{3'}

nt 634-651 de FIV

Oligonucleótido antisentido:

5' TCC TTC TTC TTT TCC CCC ACT^{3'}

nt 1023-1003 de FIV

Fragmento de SIV que se extiende desde el codón 131 de la MA hasta el 41 de la CA

Oligonucleótido sentido:

5'P AAA GGA GGA AAT TAC CCA GTG CAG^{3'}

nt 1219-1242 de SIV

Oligonucleótido antisentido:

5' GAT AGC GCT TGA AAT CCT^{3'}
Afel

nt 1362-1345

Fragmento MA_{FIV1-36}

Oligonucleótido sentido:

5'P ATG GGG AAT GGA CAG GGG^{3'}

nt 634-651 de FIV

Oligonucleótido antisentido:

5' TCT AAA GTT TCC TTC TCC AAA TTT^{3'}

nt 741-718 de FIV

Fragmento de SIV que se extiende desde el codón 36 de la MA hasta el 41 de la CA

Oligonucleótido sentido:

5'P TGG GCA GCA AAT GAA TTG GAC^{3'}

nt 934-954 de SIV

Oligonucleótido antisentido:

5' GAT AGC GCT TGA AAT CCT 3' nt 1362-1345
AfeI

Fragmento LTR_{SIV}-MA_{SIV1-35}

Oligonucleótido sentido

5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GTA CG 3' nt 346-370 de pSV.SPORT1

Oligonucleótido antisentido:

5' TAC TAT ATG CTT CAG CTT GTA CCT 3' nt 933-910 en SIV

Fragmento MA_{FIV37-130}

Oligonucleótido sentido:

5' **P** TGG GCC ATA AGG ATG GCT AAT 3' nt 742-762 de FIV

Oligonucleótido antisentido:

5' TCC TTC TTC TTT TCC CCC ACT 3' nt 1023-1003 de FIV

P indica que el oligonucleótido se halla fosforilado

7. Construcción del provirus quimérico SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K

Utilizando la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica descrita en la sección 2.5 se sustituyeron los codones de las glicinas en las posiciones 31 y 33 por codones de lisina en la quimera SIV(MA_{FIV1-130}). Para generar el mutante SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K se utilizó como molde el ADN proviral de SIV(MA_{FIV1-130}) clonado en el vector pSV.SPORT1 y los siguientes oligonucleótidos:

Primera etapa de la reacción de mutagénesis

Oligonucleótido sentido:

5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GTA CG 3' nt 346-370 de pSV.SPORT1

Oligonucleótido mutagénico antisentido:

5' CT AAA GTT TTT TTC TTT AAA TTT TTT AC 3' nt 740-713 del dominio MA de FIV

Los cambios nucleotídicos introducidos a través del oligonucleótido mutagénico se muestran en negritas y subrayados.

Segunda etapa de la reacción de mutagénesis

Oligonucleótido iniciador 5':

Se utilizó el producto simple cadena obtenido en la primera etapa.

Oligonucleótido antisentido:

5' GAT AGC GCT TGA AAT CCT 3' nt 1362-1345 del genoma de SIV
AfeI

El oligonucleótido iniciador 5' utilizado en la primera etapa del PCR asimétrico hibrida en la región 5' previa al sitio de clonado múltiple del vector pSV.SPORT1 y permite la amplificación de un fragmento de ADN que lleva el sitio de restricción para la enzima *SaI*. El producto final obtenido luego de las dos etapas de reacción de mutagénesis fue un fragmento de ADN que se extiende desde el nucleótido 1 hasta el 1362 de la construcción SIV(MA_{FIV1-130}) y que lleva la doble mutación G31K/G33K. Este fragmento fue digerido con las enzimas *SaI* y *AfeI* y utilizado para reemplazar el fragmento *SaI/AfeI* presente en el plásmido pSV.SPORT1-SIV(MA_{FIV1-130}). La presencia de las mutaciones deseadas fue confirmada por secuenciación.

8. Construcción del provirus quimérico FIV(MA_{SIV1-130})

Se construyó un provirus quimérico derivado de FIV en el que se reemplazó el dominio MA de Gag por el de SIV. Para ello, se amplificó la región LTR de FIV (nt 1-633). El oligonucleótido 5' amplifica parte de la región de clonado múltiple del vector pSV.SPORT1 donde se encuentra clonado el ADN proviral de FIV. De esta manera, el fragmento de ADN obtenido lleva en su extremo 5' el sitio el reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI*. Luego, se amplificó el fragmento de ADN que codifica para los aminoácidos 1-130 del dominio MA de SIV (nt 829-1218).

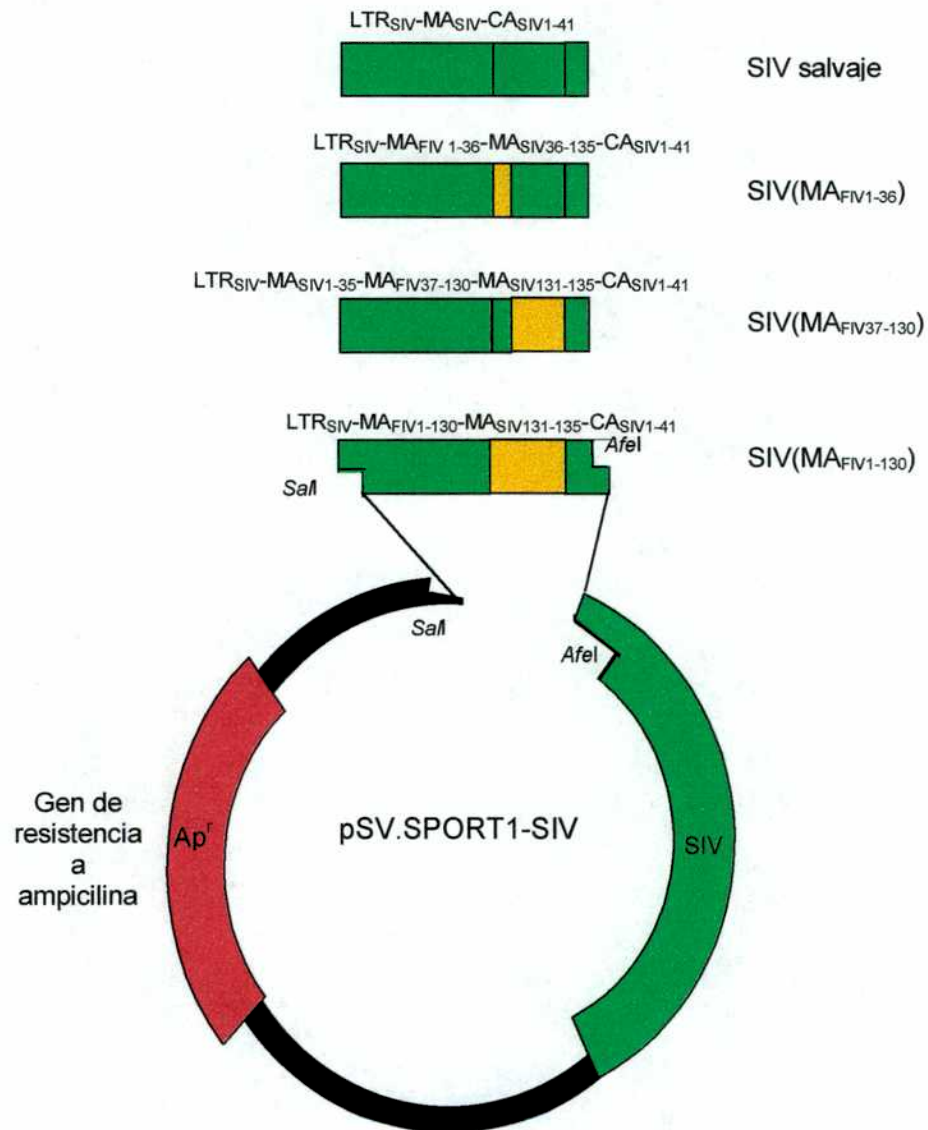


FIGURA 8. Esquema de la estrategia de clonado utilizada en las construcciones quiméricas SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) y SIV(MA_{FIV1-130}). El ADN proviral de SIV (señalado en verde) se halla clonado en los sitios *SalI*-*NotI* del plásmido pSV.SPORT1. Se reemplazó el fragmento salvaje de SIV *SalI*-*AfeI* por el correspondiente a las construcciones quiméricas. Las secuencias derivadas de FIV se indican en el esquema con color naranja.

Por último, se amplificó la región del genoma de FIV que comprende desde el codón para el aminoácido 131 del dominio MA de FIV hasta el sitio de restricción *EcoRI* presente en el dominio NC del gen *gag* de FIV (nt 1024-1880).

El fragmento de ADN que corresponde al LTR de FIV fue ligado al producto de amplificación $MA_{SIV1-130}$. Luego, el producto de ligación obtenido, $LTR_{FIV}-MA_{SIV1-130}$, fue ligado al fragmento de ADN de FIV que se extiende desde el codón 131 de la MA hasta el sitio de restricción para la enzima *EcoRI* en el dominio NC de FIV. El producto final de ligación fue digerido con la enzima *EcoRI*. Finalmente, se sustituyó el fragmento *EcoRI* salvaje en el ADN proviral de FIV clonado en el vector pSV.SPORT1 por el fragmento quimérico *EcoRI*. Las mezclas de ligación del fragmento quimérico al pSV.SPORT1-FIV *EcoRI* fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* Stbl 2. Las construcciones se verificaron por mapeo de restricción y por secuenciación.

Para la amplificación de los distintos fragmentos de ADN se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

LTR de FIV

Oligonucleótido sentido:

5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GTA CG 3' nt 346-370 de pSV.SPORT1

Oligonucleótido antisentido:

5' GTT GCT GTA GAA TCT CTC CTA CCT 3' nt 633-610 del genoma de FIV

Fragmento $MA_{SIV1-130}$

Oligonucleótido sentido:

5' P ATG GGC GCG AGA AAC TCC GTC 3' nt 829-849 del genoma de SIV

Oligonucleótido antisentido:

5' GCC ACT AGG TGG CGC TGT TGG TCT 3' nt 1218-1195 del genoma de SIV

Fragmento del genoma de FIV desde el codón 131 de la MA hasta el sitio *EcoRI*

Oligonucleótido sentido:

5' P CCT CCA CAG GCT TAT CCT ATT CAA 3' nt 1024-1047 del genoma de FIV

Oligonucleótido antisentido:

5' CCC GAA TTC TTT CTA TTT CCT TGC CAA CAT 3' nt 1880-1851 del genoma de FIV
EcoRI

9. Transfección y análisis de la expresión de los ADN provirales por Western blot

Los ADN provirales derivados de SIV fueron utilizados para transfectar células 293T, mientras que las transfecciones de los ADN provirales derivados de FIV fueron realizadas en células CrFK. En todos los casos, se transfectaron células crecidas en placas de 35 mm de diámetro con 4 µg de ADN proviral utilizando liposomas catiónicos (Lipofectamine 2000, Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En el caso de la coexpresión de los virus SIV salvaje y mutante SIV(MA_{FIV1-130}), se cotransfectaron células 293T con 2 µg de cada uno de los ADN provirales. A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados a través de membranas de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro para eliminar las células. Los sobrenadantes clarificados fueron sometidos a ultracentrifugación en colchón 20% (p/v) sacarosa en PBS (100.000xg; 90 minutos a 4 °C) para recuperar los viriones producidos por transfección. La fracción particulada fue resuspendida en buffer Laemmli. Asimismo, se prepararon lisados de las células transfectadas. Para ello, las monocapas de células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y recogidas por centrifugación a 800xg durante 20 minutos. Las células recuperadas fueron lisadas en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,1% SDS; 0,1% desoxicolato de sodio [DOC]; 1 mM PMSF; 10 µg/ml de aprotinina) durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, los lisados celulares fueron sometidos a centrifugación a baja velocidad durante 5 minutos para eliminar la fracción nuclear. Muestras de los lisados celulares y de los viriones purificados fueron resueltas en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS. Las proteínas virales fueron luego electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas por quimioluminiscencia como se describe en la sección 3.2. de Materiales y Métodos.

Como anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes MAbs: anti-CA de SIV (KK60); anti-MA de SIV (KK59); anti-TM de SIV (KK41). Estos MAbs fueron obtenidos del AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, E.E.U.U. Como anticuerpo secundario se empleó suero de oveja dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón

conjugado a peroxidasa (Amersham Biosciences). En los experimentos en los que se utilizó suero de gatos infectados con FIV como anticuerpo primario se realizó posteriormente una incubación con proteína A conjugada a peroxidasa (Amersham Biosciences).

10. Ensayo de la actividad de transcriptasa reversa (TR)

Los ensayos de TR fueron realizados con el sistema comercial *Reverse Transcriptase Assay* (Roche Applied Science) que permite determinar la actividad de TR retrovirales. La actividad de TR es utilizada como medida del título viral. Para la reacción se tomaron 500 µl de los sobrenadantes de cultivo de células transfectadas o infectadas y se concentraron los viriones agregando 250 µl de 30% polietilenglicol (PEG 6000-8000) en 1,2 M NaCl. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C y las partículas virales se recuperaron por centrifugación a 16.000xg durante 10 minutos a 4 °C. Los viriones fueron resuspendidos en 40 µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl [pH 7,8]; 80 mM KCl; 2,5 mM DTT; 0,75 mM EDTA; 0,5% Tritón X-100). Luego de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se realizaron diluciones convenientes de cada muestra. A cada muestra se le agregaron 20 µl de una mezcla que contiene el molde poliA-oligo(dT)₁₅ y nucleótidos conjugados a digoxigenina y a biotina. La reacción de TR se incubó durante 2 horas a 37 °C. De esta manera, el ADN resultante de la actividad de TR viral se halla marcado con biotina y digoxigenina. Las mezclas fueron transferidas a pocillos cuyas superficies se hallan recubiertas con estreptavidina, lo que permite la captura del producto de la reacción de TR por la interacción biotina-estreptavidina. Se incubaron las muestras durante 1 hora a 37 °C. Luego, se lavaron los pocillos exhaustivamente y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 200 µl de una solución conteniendo un anticuerpo policlonal dirigido contra digoxigenina conjugado con peroxidasa (200 mU/ml). Posteriormente, se realizaron lavados y se agregaron 200 µl 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 cuya intensidad fue cuantificada por medición de la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories). Para determinar la masa de TR presente en cada muestra se realizó en paralelo una curva de calibración con cantidades conocidas de TR recombinante de

HIV-1 provista con los reactivos comerciales. Los datos obtenidos para la 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 en cada muestra incógnita se determinó utilizando la curva de calibración obtenida con la TR de HIV-1.

11. Ensayo MAGI de infectividad viral

Se prepararon stocks virales transfectando células 293T con los ADN provirales de SIV salvaje o quiméricos y se recogieron los sobrenadantes de cultivo a las 48 horas posttransfección según se describe en detalle en la sección 9. Estos stocks fueron utilizados en los ensayos de infectividad MAGI ("multinuclear activation of galactosidase indicator assay") (Kimpton & Emerman, 1992). Los sobrenadantes normalizados por actividad de TR fueron utilizados para infectar por duplicado 4×10^4 células MAGI-CCR5 (HeLa-CD4-CCR5/LTR- β -Gal) sembradas en cajas de 24 pocillos. A las 48 horas postinfección, las células fueron fijadas en buffer PBS conteniendo 1% formaldehído y 0,2% glutaraldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fijadas se incubaron con el colorante cromogénico X-Gal. Esta línea celular indicadora permite cuantificar la infectividad de SIV. Las células HeLa expresan establemente el receptor CD4 y el correceptor CCR5 necesarios para la entrada de SIV. Además, poseen el gen que codifica para la β -galactosidasa bajo el control del promotor LTR de HIV-1. De esta manera, si las células son infectadas con SIV, la expresión de la proteína viral transactivadora Tat activará la expresión de la β -galactosidasa. Si las células se incuban con el sustrato cromogénico X-Gal, se podrá visualizar al microscopio las células infectadas teñidas de azul. De esta forma, la capacidad infectiva del virus se puede cuantificar contando el número de células azules. La infectividad viral fue cuantificada contando al microscopio el número de células azules en 20 campos independientes. El número promedio de células azules por campo fue multiplicado por el número total de campos en cada pocillo y el resultado fue referido al número de células azules obtenidas al infectar con el virus SIV salvaje.

12. Curva de replicación viral en células MYA-1

Para la obtención de los datos de cinética de replicación de los virus FIV salvaje y FIV(MA_{SIV1-130}) en las células felinas MYA-1, se prepararon stocks virales transfectando células CrFK con los ADN provirales de FIV salvaje y FIV(MA_{SIV1-130}) como se describe en la sección 9 de Materiales y Métodos. Se infectaron 2×10^5 células MYA-1 con volúmenes de los stocks virales normalizados por actividad de TR. A las 4 horas postinfección, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con medio de cultivo fresco. Cada 4 días, se filtró la mitad del cultivo celular a través de membranas de 0,45 μm de diámetro de poro y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para luego determinar la actividad de TR al final de experimento. El resto del cultivo se diluyó 1:2 en medio de cultivo para continuar con su propagación.

13.1. Electroforesis en gel de agarosa

Buffer TBE (1X)

100 mM Tris-Borato
2 mM EDTA (pH 8,3)

Buffer de la muestra

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM EDTA (pH 8)
0,4% Naranja O
0,03% Azul de bromofenol
0,03% Xilén-cianol FF
15% Ficoll 400

13.2. Medios de crecimiento para bacterias

Medio LB

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

Medio LB-agar

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

13.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico

TELT

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
62,5 mM EDTA
0,4% Tritón X-100 (v/v)
2,5 M LiCl
100 µg/ml Lisozima

13.4. Secuenciación

Solución de desnaturalización (10X)

2 M NaOH
2 mM EDTA

Buffer de hibridación

300 mM Tris-HCl (pH 7,5)
100 mM MgCl₂
160 mM DTT

Soluciones terminadoras ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP

80 μ M dGTP

80 μ M dATP

80 μ M dTTP

80 μ M dCTP

8 μ M ddGTP ó ddATP ó ddTTP ó ddCTP, según corresponda

Solución de marcación (5X)

7,5 μ M dGTP

7,5 μ M dCTP

7,5 μ M dTTP

Solución de terminación

95% formamida

20 mM EDTA

0,05% Xilén-cianol FF

0,05 Azul de bromofenol

Gel de secuenciación

TBE 1X

8 M urea

5% acrilamida (19:1, acrilamida:bisacrilamida)

13.5. Inmunoprecipitación y electroforesis de proteínas

Buffer PBS

0,2 g/l KCl

0,2 g/l KH_2PO_4

8 g/l NaCl

1,4 g/l Na_2HPO_4

Buffer TNN

50 mM Tris-HCl (pH 8)

150 mM NaCl

1% NP-40

1 mM PMSF

10 μ g/ml aprotinina

Buffer de inmunoprecipitación

100 mM Tris-HCl (pH 8)

250 mM NaCl

1% NP-40

1% BSA

1 mM PMSF

10 μ g/ml aprotinina

Buffer de lavado de inmunocomplejos

100 mM Tris-HCl (pH 8)

500 mM LiCl

1,5% NP-40

0,1% BSA

1 mM PMSF

10 μ g/ml aprotinina

Buffer RIPA

50 mM Tris-HCl (pH 8)

150 mM NaCl

1% NP-40

0,1% SDS

0,5% DOC

Buffer de electroforesis

25 mM Tris base

250 mM Glicina

0,1% SDS

Buffer Laemmli

62 mM Tris- HCl (pH 6,8)

2% SDS

50 mM DTT

10% Glicerol

0,01% Azul de bromofenol

Gel de poliacrilamida separador

10 o 12% stock acrilamida

0,1% SDS

375 mM Tris-HCl (pH 8,8)

Stock de acrilamida para electroforesis

de proteínas

29,2% acrilamida

0,8% bisacrilamida

Gel de poliacrilamida concentrador

3,9% stock de acrilamida

0,1% SDS

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

13.6. Ensayos de Western blot

Buffer de transferencia

25 mM Tris base

192 mM glicina

20% metanol (v/v)

Solución de bloqueo

PBS

0,1 % Tween 20

5% BSA

Solución de lavado

PBS

0,1% Tween 20

Buffer hipotónico

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM KCl

1 mM EDTA

10 µg/ml aprotinina

1 mM PMSF

RESULTADOS I

I. Identificación de dominios de ensamblado en la proteína MA de FIV

I.1. Expresión de las proteínas Gag y MA de FIV

El gen *gag* de FIV posee 1350 pb y codifica para un precursor poliproteico de 450 aminoácidos (Elder *et al.*, 1993). Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión del precursor Gag de SIV utilizando el sistema del virus vaccinia recombinante resulta en el ensamblado de partículas pseudovirales cuya morfología es indistinguible de las partículas que se producen durante la infección de células con SIV (González *et al.*, 1993). Este sistema ha permitido al laboratorio identificar y caracterizar dominios funcionales de la proteína MA de SIV (González *et al.*, 1993; 1996; González & Affranchino, 1995; 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se utilizó el sistema del virus vaccinia para expresar el gen *gag* salvaje de FIV, el dominio MA y versiones mutadas del gen *gag* de FIV.

En primer lugar, se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que dirige la expresión del gen *gag* de FIV y los lisados de las células infectadas fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio CA de FIV. Como se muestra en la Figura I.1 A (calle 1), las células infectadas con el virus vaccinia recombinante expresaron un polipéptido de aproximadamente 51 kDa, cuya movilidad electroforética coincide con la del precursor Gag que se expresa en células CrFK transfectadas con el ADN proviral de FIV (Figura I.1 A, calle 2).

Para evaluar la capacidad del precursor Gag de FIV de autoensamblarse en partículas pseudovirales, células CV-1 infectadas con el virus vaccinia recombinante que lleva el gen *gag* de FIV fueron marcadas metabólicamente con una mezcla de [³⁵S]metionina/cisteína. Se prepararon lisados celulares y la fracción particulada fue purificada a partir del sobrenadante de cultivo de las células infectadas por ultracentrifugación en colchón de sacarosa. Tanto los lisados celulares como las partículas fueron inmunoprecipitadas con suero de gatos infectados con FIV y las proteínas virales fueron luego resueltas en geles 12% poliacrilamida-0,1% SDS. Como se muestra en la Figura I.1 B (calle 3), las células expresando el precursor Gag de FIV fueron capaces de liberar esta proteína al medio extracelular como partículas, lo que indica que el sistema de expresión del virus vaccinia recombinante puede ser utilizado para reproducir el ensamblado de FIV. Se realizaron además estudios de microscopía electrónica para analizar la morfología de las partículas pseudovirales que se forman

como consecuencia de la expresión de la proteína Gag de FIV (ver sección 1.4 en Resultados I).

Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión de la proteína MA de SIV, en ausencia del resto de las proteínas virales, resulta en el ensamblado de partículas pseudovirales (González *et al.*, 1993). En cambio, la proteína MA de HIV-1 es incapaz de formar estas estructuras extracelulares (Giddings *et al.*, 1998). Por lo tanto, resultó relevante investigar si la proteína MA de un lentivirus de animal no primate, como la de FIV, posee la capacidad de autoensamblarse en partículas. Para ello, se construyó un virus vaccinia que lleva en su genoma la región que codifica para la MA de FIV. El análisis por inmunoprecipitación de células infectadas con este virus vaccinia reveló la presencia de un polipéptido de 15 kDa (Figura I.1 B, calle 2), cuya movilidad se halla de acuerdo con la masa molecular descrita para la proteína MA de FIV (Elder *et al.*, 1993). Sin embargo, no se detectó la proteína MA de FIV en la fracción particulada purificada a partir del sobrenadante de cultivo de las células infectadas (Figura I.1 B, calle 4), lo que indica que la MA de FIV, al igual que la de HIV-1, es incapaz de ensamblarse en partículas.

I.2. Mutagénesis dirigida del dominio MA del gen gag de FIV

Para identificar regiones en la poliproteína Gag de FIV que se hallan involucradas en el ensamblado y la liberación de partículas virales, se realizó la mutagénesis dirigida del dominio MA de FIV.

La proteína MA de FIV es una proteína de 135 aminoácidos que resulta del clivaje proteolítico del dominio amino terminal del precursor Gag (Elder *et al.*, 1993). Al alinear su estructura primaria con la de otras MA lentivirales se observa que la MA de FIV presenta: 16% de homología (aminoácidos idénticos) con la MA de HIV-1, 14% de homología con la MA de HIV-2/SIV y 23% de homología con el dominio MA de BIV (virus de inmunodeficiencia de bovinos) (Figura I.2 A). A modo de comparación, las proteínas MA de HIV-1 y SIV presentan un 51% de homología (identidad a nivel de aminoácidos). Cuando se realiza la comparación teniendo en cuenta sustituciones aminoacídicas conservativas, el dominio MA de FIV muestra un mayor grado de homología, presentando 36% de similitud con la MA de HIV-1, 34% de similitud con la de HIV-2/SIV y 47% de homología con la MA de BIV (Figura I.2 A).

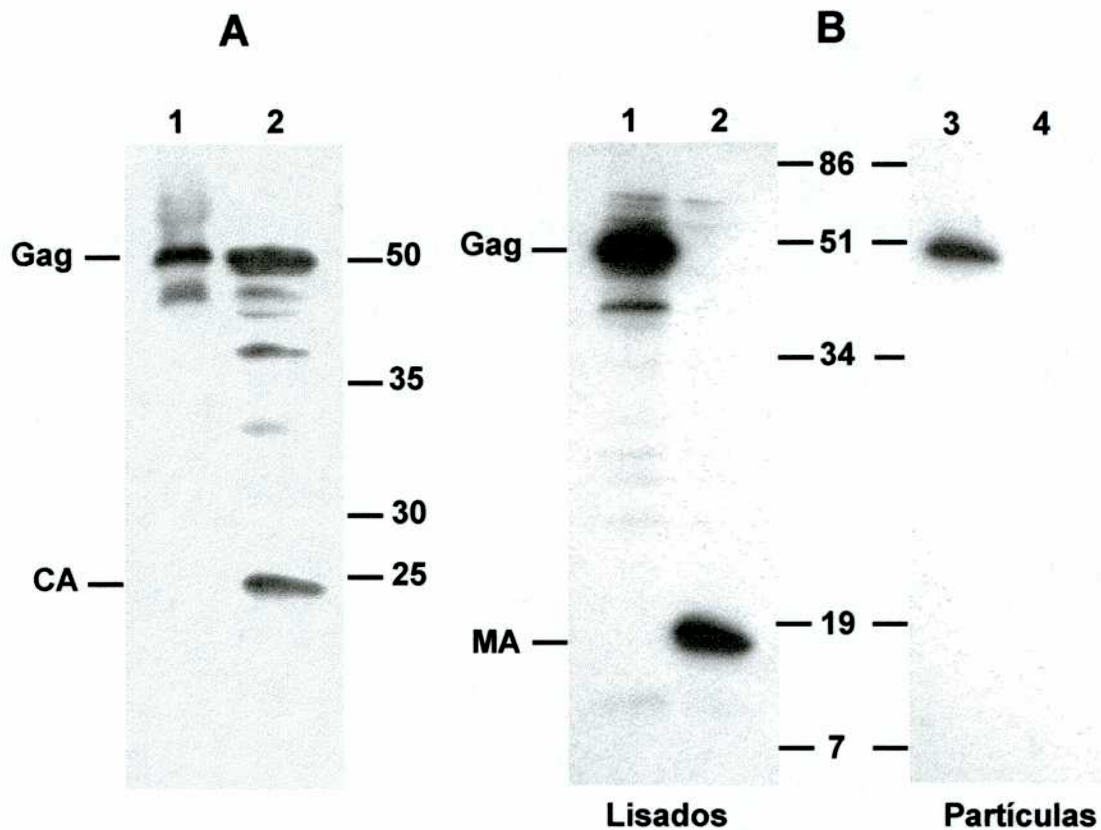


FIGURA I.1. Expresión de las proteínas Gag y MA de FIV.

(A) Análisis por Western blot de los lisados celulares de células CV-1 infectadas con el virus vaccinia recombinante que dirige la síntesis de la poliproteína Gag de FIV (calle 1) y de los lisados celulares de células CrFK transfectadas con el ADN proviral de FIV (calle 2). Los polipéptidos fueron detectados con un MAb dirigido contra la proteína CA de FIV. Se indican las movilidades de las proteínas CA y Gag, así como la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

(B) Células CV-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la síntesis de la poliproteína Gag (calles 1 y 3) y de la proteína MA de FIV (calles 2 y 4) fueron marcadas metabólicamente con una mezcla de [35 S]metionina/cisteína y luego, las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares (calles 1 y 2) y de la fracción particulada de los sobrenadantes de cultivo (calles 3 y 4). Se indica la movilidad de las proteínas Gag y MA de FIV, así como la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

En la Figura I.2 B se muestran las regiones del dominio MA de la poliproteína Gag de FIV sometidas a mutagénesis dirigida. Se introdujeron dos tipos de mutaciones: sustituciones aminoacídicas afectando 1-3 residuos (mutaciones M1-M5), o deleciones internas conservando el marco de lectura de la proteína (deleciones D1-D5). Estas mutaciones fueron diseñadas para estudiar elementos estructurales de la proteína MA de FIV que podrían ser funcionalmente importantes. Estos motivos incluyen: la señal de N-miristilación (mutación M1); tres dominios hidrofóbicos, ubicados en el extremo amino terminal (mutaciones M2 y M3) y en la región carboxilo de la proteína (mutación D4); una región básica que comprende los residuos de lisina de las posiciones 26, 28 y 29 (mutaciones M4 y M5) y un dominio hidrofílico ubicado en el extremo carboxilo de la molécula (delección D5). Cabe mencionar que las deleciones D1, D2 y D3 afectan regiones de la proteína MA de FIV que se encuentran parcialmente conservadas en las proteínas MA de HIV-1 y SIV (Figura I.2 A). Todas estas mutaciones fueron introducidas en la región codificante para la MA del gen *gag* de FIV. Se generaron los virus vaccinia recombinantes que expresan las distintas versiones mutadas de la poliproteína Gag de FIV de manera de poder caracterizar el fenotipo de ensamblado de cada mutante.

I.3. Expresión y caracterización fenotípica de las poliproteínas Gag mutantes

Con el objeto de analizar el perfil de expresión de las poliproteínas Gag mutantes, células CV-1 fueron infectadas en paralelo con los virus vaccinia que dirigen la expresión de la proteína Gag salvaje de FIV o de las versiones mutadas de la misma. Luego de marcar metabólicamente las células con una mezcla de [³⁵S]metionina/cisteína, las poliproteínas Gag fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares con suero de gatos infectados con FIV. Como se observa en la Figura I.3 A, todos los virus vaccinia llevando los genes *gag* con las mutaciones en el dominio MA dirigieron la síntesis de un polipéptido de 51 kDa, que corresponde al precursor Gag de FIV. Además del precursor Gag, se observaron bandas de menor intensidad de 44-45 kDa que podrían corresponder a productos derivados del clivaje proteolítico del polipéptido Gag por proteasas celulares (Figura I.3 A). En este sentido, se han descrito productos similares al expresar las proteínas Gag de SIV y HIV-1 con los sistemas del virus vaccinia y de baculovirus (Delchambre *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1990).

A

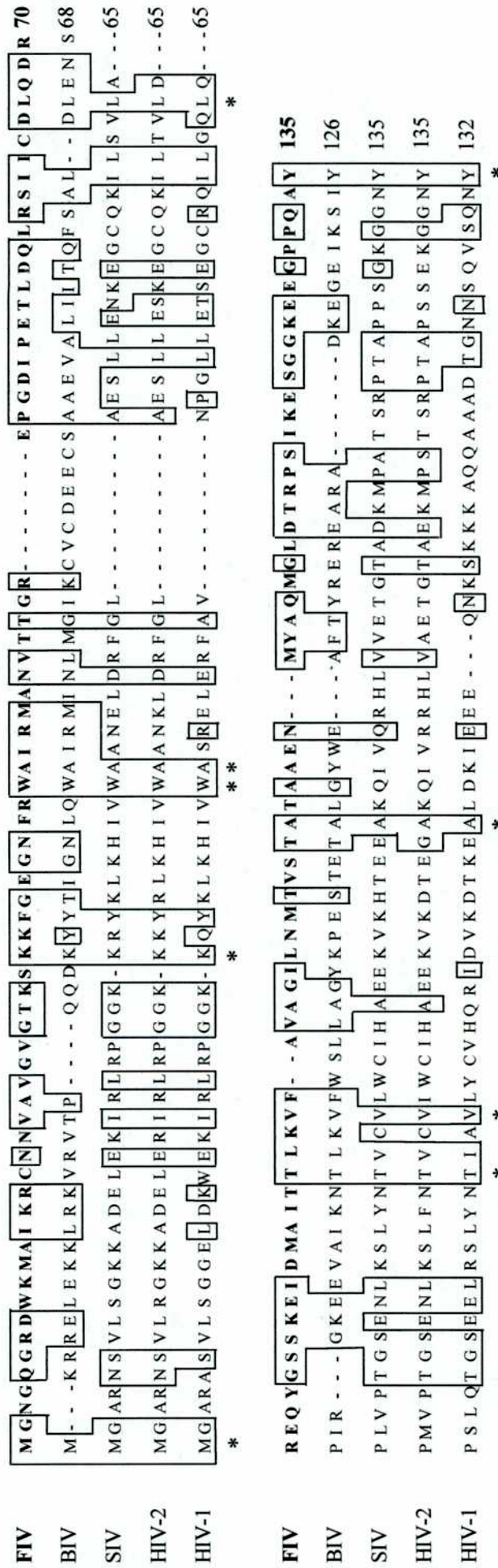


FIGURA I.2. (A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas MA de FIV (clon molecular 2489_7), BIV (clon molecular 127), SIV (PBj1.9), HIV-2 (ROD) y HIV-1 (HXB2). Los aminoácidos idénticos y similares se muestran recuadrados, mientras que con un asterisco, se indican los aminoácidos idénticos presentes en todas las proteínas MA lentivirales comparadas.

B

M1
A M G N G Q G R D W K M A I K R C N N V A V G V G T M3 M4 D1
Q M2 N G Q N E E K S K K F G E G N F R W A I R M A 42
N V T T G R E P G D I P E T L D Q L R S I I C D L Q D R R E E Q Y G S S K E I D M A I 84
D2 D3
T T L K V F A V A G I L N M T V S T A T A A E N M Y A Q M G L D T R P S I K E S G G 126
D4 D5
K E E G P P Q A Y 135

FIGURA I.2. (B) Mutagénesis del dominio MA de FIV. Con líneas se indican las sustituciones aminoacídicas (M1-M5) y las deleciones (D1-D5) introducidas en la proteína MA de FIV.

La Figura I.3 A muestra que la mayoría de las proteínas Gag mutadas de FIV se expresaron en niveles similares a los de la proteína Gag salvaje. Las excepciones fueron los mutantes M5, D2 y D3, los cuales dirigieron la síntesis del precursor Gag en niveles menores a los de la proteína Gag salvaje. En el caso del mutante D3, se acumuló la banda de 44-45 kDa descrita arriba y se detectaron incluso bandas de menor peso molecular (Figura I.3 A, calle 9). Este patrón de bandas electroforéticas sugiere que la mutación D3 podría promover la inestabilidad del precursor Gag.

Para analizar en mayor detalle el fenotipo del mutante D3, se realizó un ensayo de pulso y seguimiento ("pulse-chase"). Células CV-1 expresando la poliproteína Gag salvaje de FIV o el mutante D3 fueron marcadas metabólicamente con una mezcla de [³⁵S]metionina/cisteína durante 20 minutos (pulso) o sometidas al pulso y luego incubadas en medio de cultivo libre de precursor radioactivo durante 1 o 3 horas (seguimiento) (Figura I.4). Las proteínas Gag fueron inmunoprecipitadas de los lisados celulares y analizadas en un gel 10% poliacrilamida-0,1% SDS. En el caso de las células infectadas con el virus vaccinia que dirige la síntesis de la proteína Gag salvaje, se detectó a los 20 minutos de marcación una banda de 51 kDa que corresponde al precursor Gag (Figura I.4 A, calle P). Luego de 3 horas de seguimiento, los niveles de proteína Gag marcada disminuyeron aproximadamente un 50% (Figura I.4 A, calle 2). En cambio, el mutante D3 presentó un comportamiento distinto. Luego de 20 minutos de marcación (pulso), se observaron dos polipéptidos: uno de 51 kDa que corresponde a la poliproteína Gag y otro de 45 kDa (Figura I.4 B, calle P). Después de 1 hora de seguimiento, ya no se observó el precursor Gag de 51 kDa y se detectó un aumento en los niveles del polipéptido de 45 kDa (Figura I.4 B, calle 1), sugiriendo que el precursor Gag fue procesado para dar el polipéptido de 45 kDa. A las 3 horas de seguimiento, los niveles del polipéptido de 45 kDa disminuyeron significativamente (Figura I.4 B, calle 2). Estos resultados indican que la delección D3 favorece el procesamiento del precursor Gag de FIV por proteasas celulares para generar un producto de menor peso molecular.

Para analizar el efecto sobre el ensamblado viral de las mutaciones en el dominio MA del precursor Gag de FIV, se purificó el material particulado del medio de cultivo de las células infectadas con los virus vaccinia recombinantes que expresan cada poliproteína Gag mutante. La presencia del precursor Gag de FIV fue detectada en la fracción particulada por inmunoprecipitación con suero de gatos infectados con FIV (Figura I.3 B).

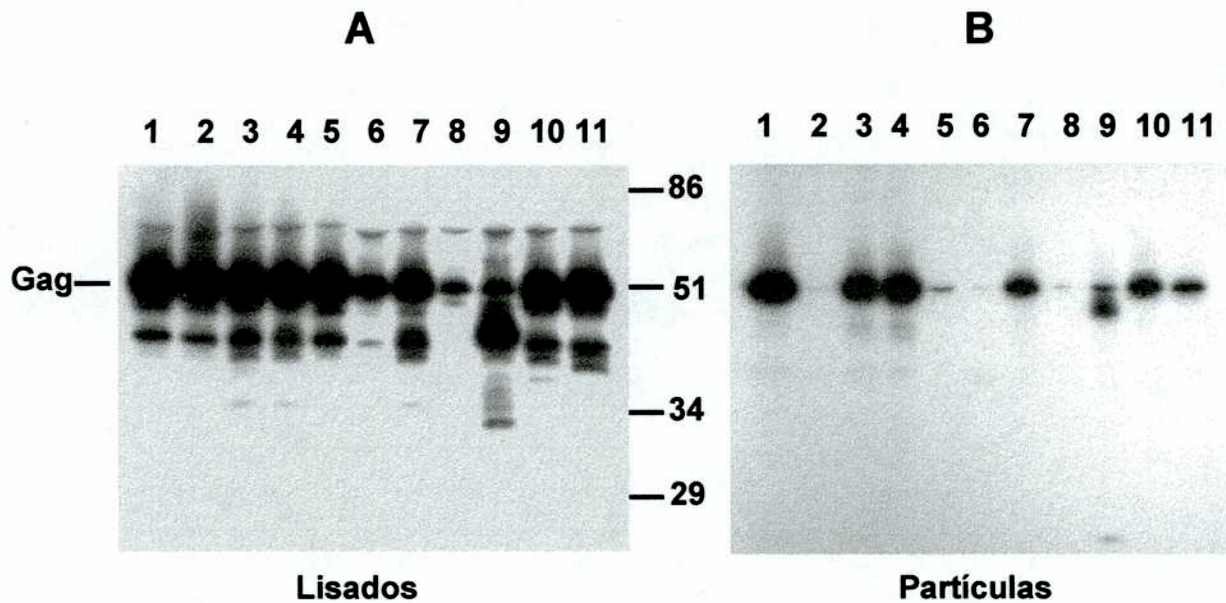


FIGURA I.3. Caracterización de las poliproteínas Gag mutantes de FIV.

Células CV-1 fueron infectadas en paralelo con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la síntesis del polipéptido Gag salvaje de FIV (calle 1), o de los mutantes M1 (calle 2), M2 (calle 3), M3 (calle 4), M4 (calle 5), M5 (calle 6), D1 (calle 7), D2 (calle 8), D3 (calle 9), D4 (calle 10) o D5 (calle 11). Las células fueron marcadas metabólicamente y las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares (A), o de la fracción de partículas pseudovirales purificada a partir del sobrenadante de cultivo (B). Los inmunocomplejos fueron resueltos en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS y visualizados por autorradiografía de los geles. Se indica la posición del precursor Gag y la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

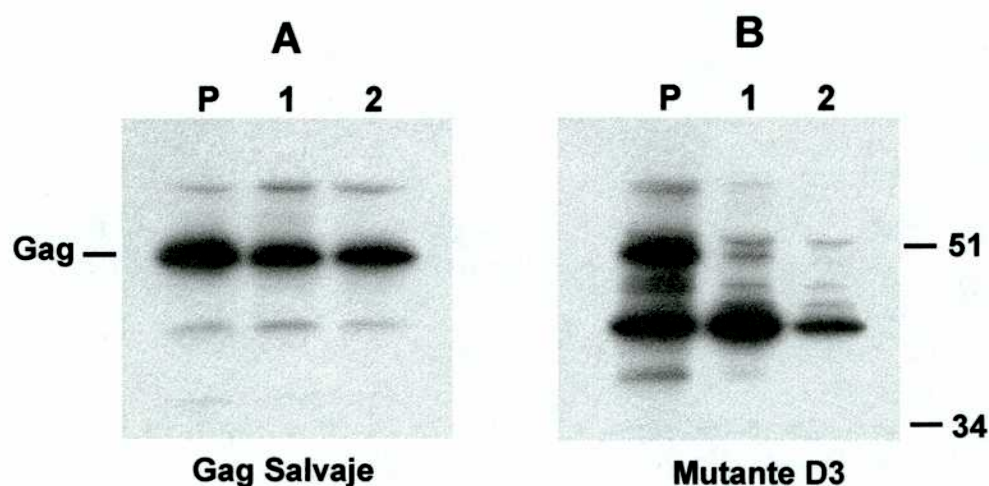


FIGURA I.4. Cinética de la síntesis de la poliproteína Gag mutante D3.

Células CV-1 expresando el precursor Gag de FIV salvaje (**A**) o el mutante D3 (**B**), fueron sometidas a un pulso de marcación metabólica de 20 minutos de duración (calle P) y luego incubadas en medio de cultivo (seguimiento) durante 1 hora (calle 1) o 3 horas (calle 2). En cada punto, las células fueron lisadas y las proteínas específicas de FIV inmunoprecipitadas con suero de gatos infectados con FIV. Posteriormente, las proteínas fueron analizadas en geles 10% poliacrilamida-0,1% SDS y visualizadas por autorradiografía. Se indica la posición de la proteína Gag y la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

Las mutaciones M2 y M3, que afectan los dominios hidrofóbicos presentes en el extremo amino de la proteína MA, tuvieron poco efecto sobre el ensamblado y liberación de partículas pseudovirales (Figura I.3 B, calles 3 y 4), mientras que las deleciones D1 y D4 provocaron una disminución moderada de la producción de partículas respecto de la proteína Gag salvaje (Figura I.3 B, calles 7 y 10). En cambio, las deleciones D3 y D5 inhibieron significativamente el ensamblado de Gag en partículas (Figura I.3 B, calles 9 y 11). Además, en el caso del mutante D3, la fracción particulada presentó un patrón de bandas difusas y de menor peso molecular que la proteína Gag salvaje (Figura I.3 B, calle 9), lo que sugiere que las partículas formadas por el mutante D3 son inestables. El efecto más drástico sobre el ensamblado fue causado por la mutación que afecta la señal de miristilación (M1), las mutaciones de los residuos básicos en las posiciones 26, 28 y 29 (M4 y M5) y la deleción D2. En estos casos, la proteína Gag fue prácticamente indetectable en la fracción particulada purificada a partir del medio de cultivo (Figura I.3 B, calles 2, 5, 6 y 8).

Para estimar la eficiencia de ensamblado de cada poliproteína Gag mutante de FIV, se cuantificó por densitometría de las autorradigrafías el nivel total de cada proteína Gag mutante tanto en lisados celulares como en la fracción particulada. Se determinó luego la relación Gag extracelular/Gag intracelular. El valor obtenido para cada Gag mutante fue referido al obtenido para la proteína Gag salvaje. La Figura I.5 muestra los resultados de este análisis cuantitativo. Los mutantes M2 y M3 produjeron niveles significativos de partículas pseudovirales (eficiencia de 60-70% con respecto a la proteína Gag salvaje). Las mutaciones D1 y D4 inhibieron moderadamente el ensamblado, ya que estos mutantes produjeron partículas con una eficiencia del 40% con respecto a la de la proteína Gag salvaje. En el caso de las proteínas Gag mutantes D3 y D5, la liberación de partículas se redujo en aproximadamente un 85% con respecto a los niveles producidos por Gag salvaje, mientras que los mutantes M1, M4, M5 y D2 fueron incompetentes para la formación y liberación de partículas. Solamente la proteína Gag del mutante M4 es detectada en el medio extracelular, pero en niveles que representan menos del 2% de los de la proteína Gag salvaje.

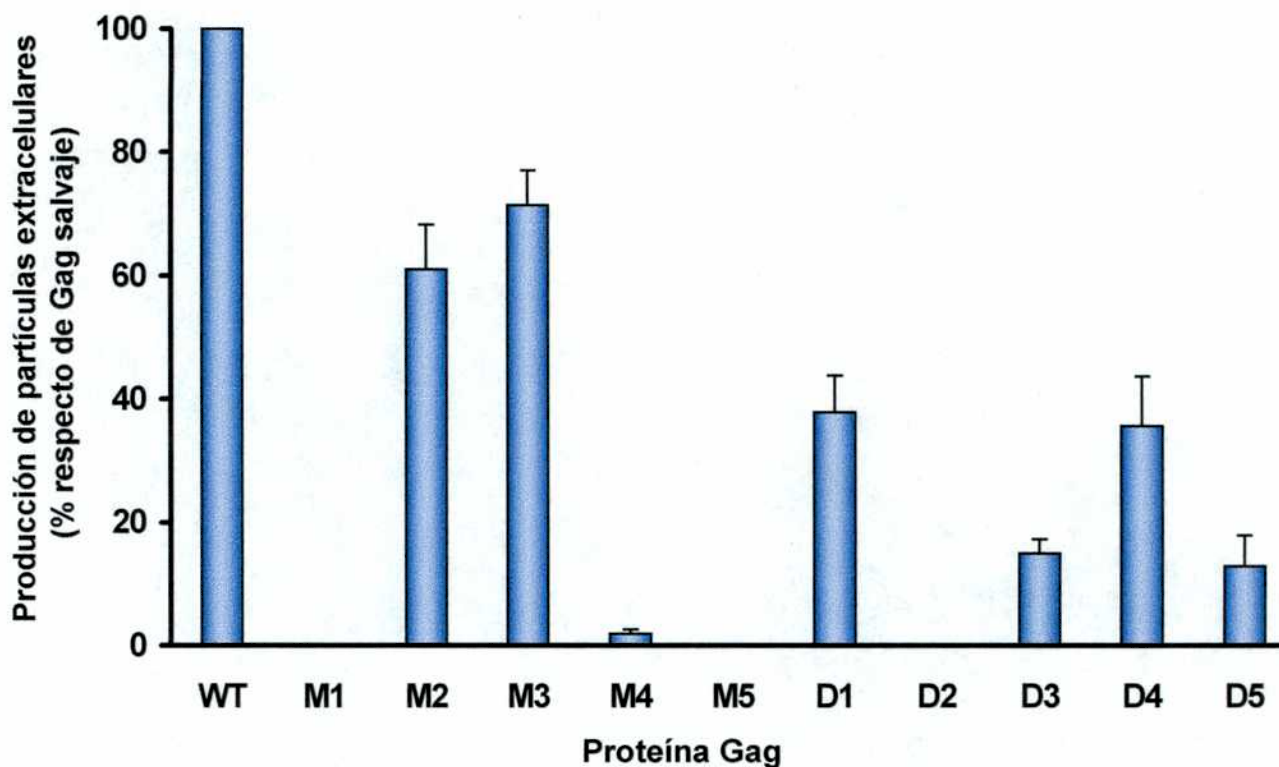


FIGURA I.5. Efecto de las mutaciones en el dominio MA de Gag de FIV sobre la formación de partículas pseudovirales.

Células CV-1 expresando el precursor Gag salvaje de FIV (WT) o cada una de las proteínas Gag mutantes fueron marcadas metabólicamente y tanto los lisados celulares como la fracción particulada fueron sometidos a inmunoprecipitación seguida de electroforesis en geles de poliacrilamida. En cada caso, la banda que corresponde a la proteína Gag fue cuantificada por densitometría de las autorradigrafías obtenidas. La eficiencia de producción de partículas de cada Gag mutante con respecto a la de Gag salvaje fue estimada mediante la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\text{Gag}_{\text{mutante}} (\text{partículas}) \times \text{Gag}_{\text{salvaje}} (\text{lisados})}{\text{Gag}_{\text{salvaje}} (\text{partículas}) \times \text{Gag}_{\text{mutante}} (\text{lisados})} \right] \times 100.$$

Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

I.4. Microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag salvaje de FIV y los mutantes del dominio MA de FIV

Los estudios bioquímicos descritos en las secciones anteriores indican que el precursor Gag salvaje de FIV, cuando se expresa utilizando el sistema del virus vaccinia, es capaz de ensamblarse en partículas que son liberadas al medio extracelular.

Con el objeto de analizar la morfología de estas partículas, se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que dirige la expresión del precursor Gag salvaje de FIV y a las 24 horas postinfección, las células fueron fijadas, y procesadas para ser analizadas en un microscopio electrónico. Las células que expresan la poliproteína Gag salvaje de FIV producen partículas extracelulares con un diámetro que varía entre 130-150 nm y su morfología es similar a la de las partículas lentivirales inmaduras (Figura I.6, panel A). Estas estructuras esféricas, que también se observan brotando de la membrana plasmática de las células infectadas, presentan un centro translúcido rodeado de un anillo electrodensito por debajo de la bicapa lipídica (Figura I.6, panel A). Además de estas partículas, se observan estructuras de 80 nm de diámetro que representan secciones transversales de filamentos tubulares, los cuales se visualizan brotando de la membrana plasmática o libres en el medio extracelular (Figura I.6, paneles A y B). Por otro lado, se analizaron por microscopía electrónica células expresando las proteínas Gag mutantes M1 y M4. Estos mutantes fueron elegidos como representativos del fenotipo incompetente en ensamblado (Figura I.3 B). En el caso de las células que expresan el mutante M1 (deficiente en miristilación) no se observa proteína Gag asociada a la membrana plasmática (Figura I.6, panel C). En cambio, se visualizan estructuras intracitoplasmáticas en forma de anillo. En algunas secciones, se visualizan ribosomas asociados a la cara convexa de estas estructuras. Las células infectadas con el virus vaccinia recombinante que dirige la síntesis de la proteína Gag mutante M4 exhiben una capa proteica electrodensa y discontinua inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, lo que sugiere que el mutante M4 se acumula por debajo de la bicapa lipídica curvando la membrana plasmática (Figura I.6, panel D). Ninguna de las estructuras arriba descritas fueron observadas en células infectadas con un virus vaccinia control que expresa la β -galactosidasa (dato no mostrado).

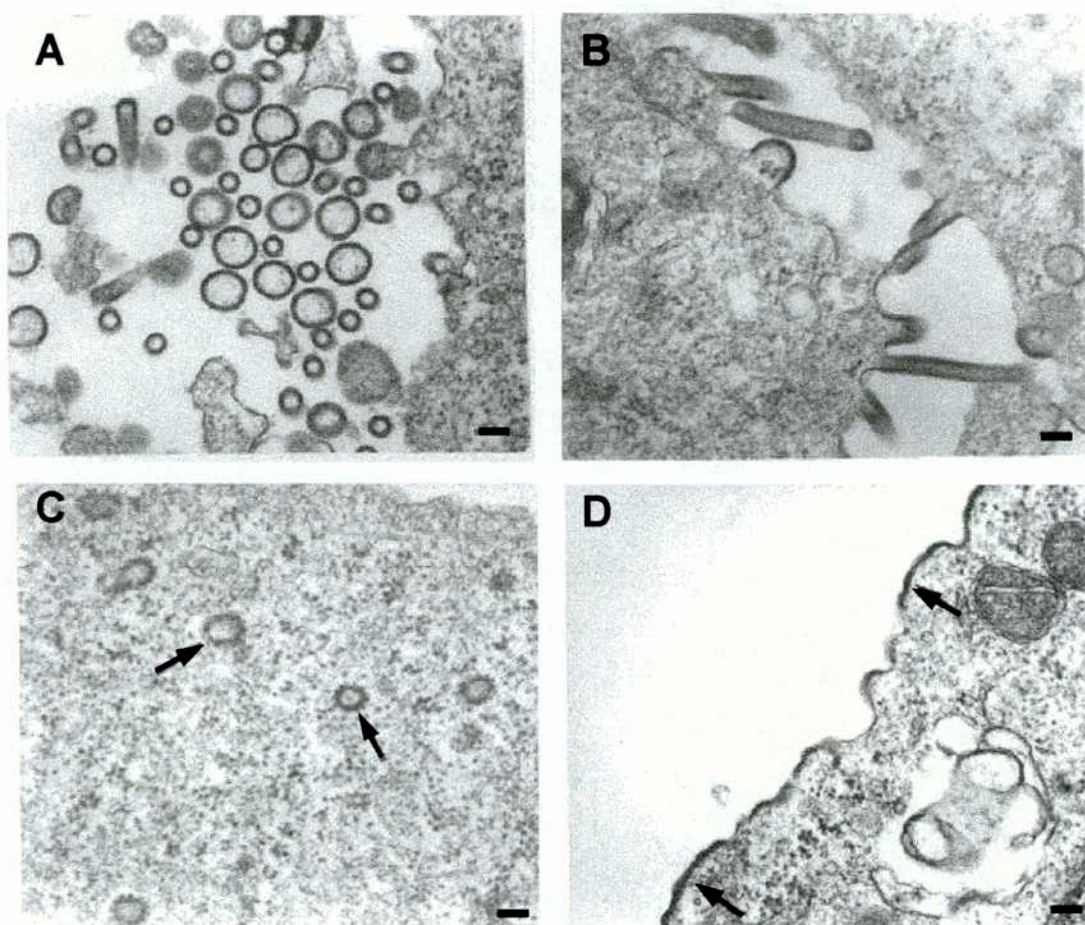


FIGURA I.6. Análisis por microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag salvaje de FIV y las proteínas Gag mutantes M1 y M4.

Secciones de células CV-1 expresando el precursor Gag salvaje de FIV (A y B), la poliproteína Gag mutante M1 (C) y la proteína Gag mutante M4 (D). Las flechas en C indican las estructuras intracelulares en forma de anillo. En D, las flechas indican la capa proteica electrodensa localizada por debajo de la membrana plasmática.

Barra: 100 nm

RESULTADOS II

II. Relación funcional entre las proteínas MA de FIV y de SIV

II.1. Expresión y ensamblado de la poliproteína Gag quimérica SIV(MA_{FIV1-130})

Los resultados descritos en la sección anterior indican que el dominio MA de la poliproteína Gag de FIV posee motivos aminoacídicos necesarios para el transporte de Gag a la membrana plasmática y para el ensamblado viral. En este sentido, la MA de FIV cumple un rol en la morfogénesis viral similar al descrito por nuestro laboratorio para el dominio MA de SIV (González & Affranchino, 1995; 1998; González *et al.*, 1993; 1996).

Con el objeto de estudiar la relación estructural y funcional que existe entre la proteína MA de FIV y la de un lentivirus de primates como SIV, se construyó un gen *gag* quimérico derivado de SIV, en el cual la región codificante para el dominio MA de SIV fue reemplazada por la correspondiente a FIV. El gen *gag* de SIV codifica para un precursor poliproteico de 57 kDa, el cual es clivado por la proteasa viral para dar las proteínas estructurales del virión maduro MA, CA, NC y p6, así como también dos péptidos pequeños p1 y p2 (Henderson *et al.*, 1992). En el contexto de la construcción Gag-PR de SIV previamente caracterizada por nuestro laboratorio (González *et al.*, 1993), se reemplazó la región que codifica para los residuos 1-130 del dominio MA de SIV por la región equivalente de FIV. Se mantuvieron, sin embargo, los 5 aminoácidos carboxilo terminales de la MA de SIV con el objeto de preservar el sitio de clivaje de la PR viral en la región MA-CA y asegurar así el correcto procesamiento proteolítico de esta región. Se generó entonces un virus vaccinia recombinante que dirige la expresión de la poliproteína quimérica Gag_{SIV(MA_{FIV1-130})} y el dominio PR del gen *pol*. Cabe destacar que la expresión de la PR viral requiere del mecanismo de corrimiento del marco de lectura en la región en la que los genes *gag* y *pol* se superponen, como hemos descrito para la construcción Gag-PR salvaje de SIV (González *et al.*, 1993). Por lo tanto, los niveles relativos de Gag y Gag-PR en las células infectadas con este virus recombinante son similares a los niveles relativos de Gag y Gag-Pol presentes en células infectadas con SIV.

Para estudiar la síntesis y procesamiento de la poliproteína quimérica Gag_{SIV(MA_{FIV1-130})}, se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante correspondiente. En paralelo, se infectaron células con el virus vaccinia Gag-PR salvaje de SIV. Luego de la marcación metabólica, se prepararon los lisados celulares y la fracción particulada fue

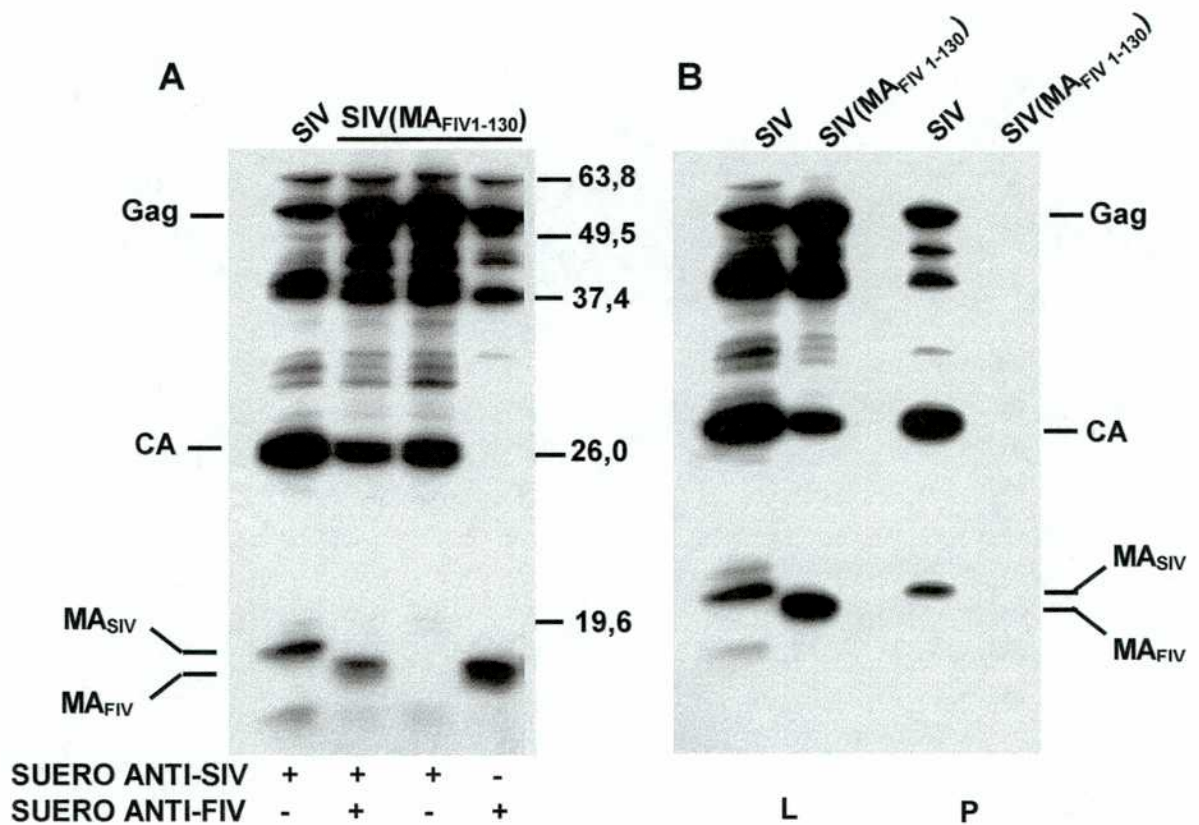


FIGURA II.1. Expresión y ensamblado de la poliproteína Gag quimérica SIV(MA_{FIV1-130}).

Células CV-1 fueron infectadas en paralelo con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la expresión del precursor Gag-PR salvaje de SIV o el precursor Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR.

(A) Análisis de las proteínas virales presentes en los lisados celulares por inmunoprecipitación con suero de monos infectados con SIV y/o con suero de gatos infectados con FIV.

(B) Análisis de la fracción particulada (**P**) purificada del medio de cultivo. Las proteínas virales fueron detectadas por inmunoprecipitación utilizando la mezcla de sueros de infección. También se incluyen los lisados celulares (**L**).

Se indica la posición de las proteínas Gag, CA, MA de SIV y MA de FIV, así como la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

purificada a partir del medio de cultivo por ultracentrifugación en colchón de sacarosa. La presencia de los precursores Gag salvaje y quimérico, así como la de sus productos de procesamiento, fue detectada por inmunoprecipitación con suero de monos infectados con SIV, o con suero de gatos infectados con FIV o con una mezcla de ambos, según correspondiera (Figura II.1).

Como se observa en la Figura II.1 A, las células infectadas con el virus vaccinia recombinante Gag-PR de SIV expresaron una proteína de 57 kDa correspondiente al precursor Gag. Además, se detectaron los productos derivados del procesamiento del precursor Gag: las proteínas MA (p17), CA (p27) y polipéptidos que se encuentran en un rango de peso molecular entre 39-45 kDa (Figura II.1 A), los cuales representan intermediarios del procesamiento del precursor Gag por la PR viral (González *et al.*, 1993; 1996).

Las células infectadas con el virus vaccinia recombinante Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR expresaron los polipéptidos correspondientes al precursor Gag quimérico y a los productos maduros CA (p27 de SIV) y MA (p15 de FIV). Estos polipéptidos fueron detectados con una mezcla de sueros anti-SIV y anti-FIV (Figura II.1 A). El precursor Gag quimérico fue reconocido tanto por el suero de infección de monos con SIV como por el suero de infección de gatos con FIV. En cambio, la proteína CA fue reconocida solamente por el suero anti-SIV, mientras que el polipéptido de 15 kDa, correspondiente a la MA de FIV, sólo fue reconocido por el suero anti-FIV (Figura II.1 A).

Al analizar la fracción particulada purificada del medio de cultivo de las células infectadas con el virus vaccinia Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-PR se observó que el precursor Gag quimérico era incapaz de producir partículas extracelulares, a pesar de haberse expresado y procesado en forma similar a la proteína Gag salvaje de SIV (Figura II.1 B). En efecto, en la fracción particulada no se detectaron el precursor Gag quimérico ni las proteínas maduras CA y MA. Estos resultados indican que el reemplazo del dominio MA de la poliproteína Gag de SIV por el de FIV interfiere con la formación de partículas.

II.2. Análisis por microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})

Los ensayos bioquímicos descritos en la sección anterior indican que la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) no se ensambla eficientemente en partículas extracelulares. Para

obtener información adicional sobre el fenotipo de esta proteína quimérica, se realizaron estudios comparativos de microscopía electrónica de células que expresan el precursor Gag salvaje de SIV y células expresando la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}). De acuerdo a lo observado previamente por nuestro laboratorio (González *et al.*, 1993; González & Affranchino, 1998), las células que expresan la proteína Gag salvaje de SIV exhiben numerosas partículas virales brotando de la membrana plasmática (Figura II.2, paneles A y B). En cambio, en las secciones de las células expresando la proteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) sólo ocasionalmente se observa alguna partícula adyacente a la membrana plasmática (Figura II.2, panel C). En algunas secciones se observan estructuras intracelulares con forma de anillo (Figura II.2, panel D).

II.3. Miristilación de la quimera Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})

Para investigar la etapa en la cual se halla afectado el ensamblado de la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}), se determinó en primer lugar si esta proteína es eficientemente miristilada. La adición de ácido mirístico a la glicina en posición 2 es necesaria para que el precursor Gag se ancle en la membrana plasmática (ver secciones I.3 y I.4 de Resultados de esta tesis). Se infectaron en paralelo células CV-1 con el virus vaccinia recombinante que expresa la poliproteína Gag salvaje de SIV y con el que expresa la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}). Luego de la marcación metabólica con [³⁵S]metionina/cisteína o con [³H]ácido mirístico, las proteínas virales presentes en los lisados celulares fueron inmunoprecipitadas con suero de monos infectados con SIV o con, en el caso de los lisados de las células expresando la quimera, una mezcla de los sueros de monos infectados con SIV y de gatos infectados con FIV. Como se observa en la Figura II.3, las células expresando la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) exhibieron polipéptidos miristilados que comigraban con el precursor Gag quimérico y con la proteína MA que se detectan en los lisados de las células marcadas con ³⁵S. Como cabía esperar, no se observó la proteína CA en las muestras de las células marcadas con ³H. Estos resultados indican que la incapacidad del precursor Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) de formar partículas pseudovirales no se debe a un defecto en la miristilación de esta proteína.

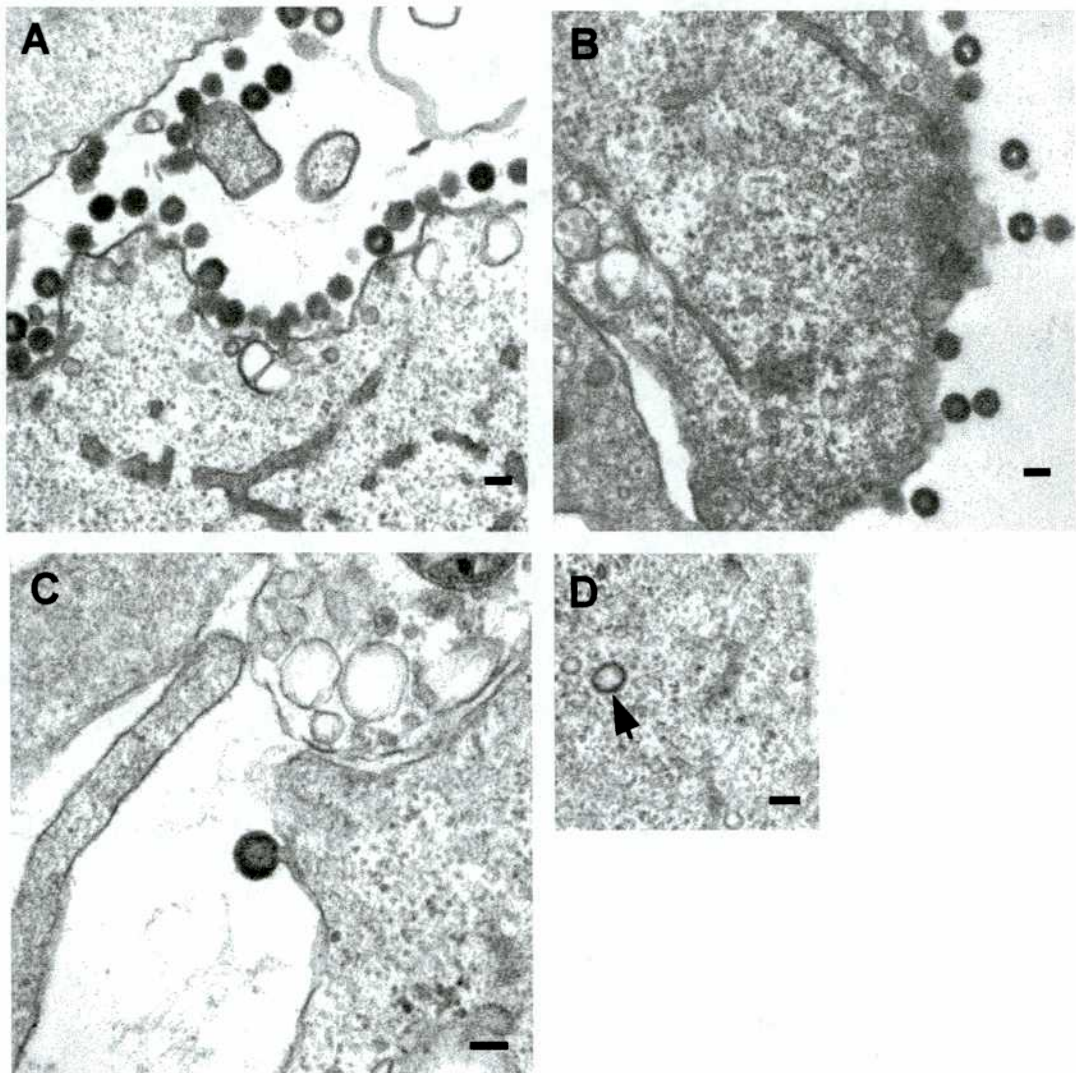


FIGURA II.2. Microscopía electrónica de células expresando la poliproteína Gag salvaje de SIV (A y B) o la quimera Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) (C y D). La flecha en D señala una partícula intracelular. Barra: 100 nm.

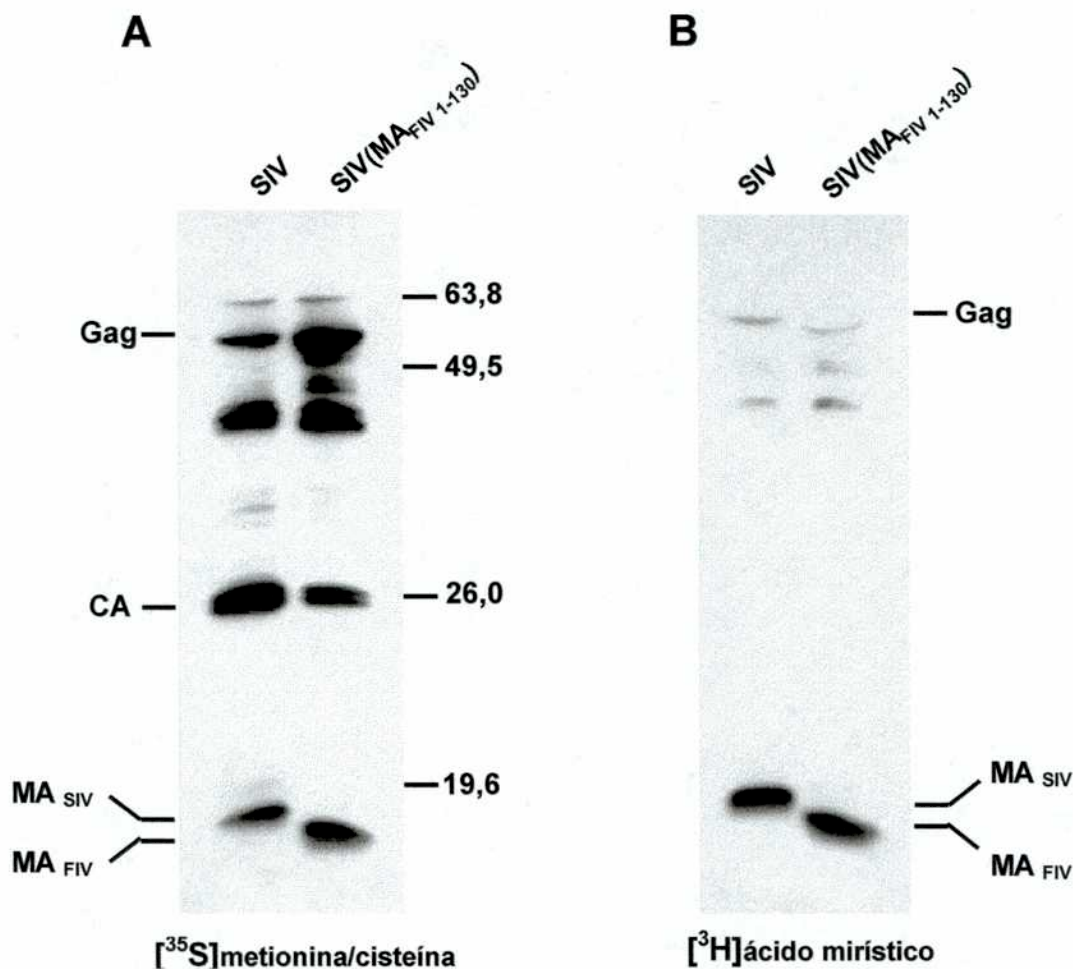


FIGURA II.3. Miristilación de la poliproteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}).

Células CV-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la expresión de la poliproteína Gag salvaje de SIV (SIV) o Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) fueron marcadas en paralelo con [³⁵S]metionina/cisteína (**A**) o con [³H]ácido mirístico (**B**).

Las células fueron lisadas y luego inmunoprecipitadas con suero de monos infectados con SIV (lisados SIV) o con una mezcla de suero de monos infectados con SIV y de gatos infectados con FIV (lisados SIV[MA_{FIV1-130}]). Las proteínas virales fueron resueltas en geles 12% poliacrilamida-0,1% SDS, electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y visualizadas por autorradiografía. Se indican las posiciones de las proteínas Gag, CA y MA, así como la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

II.4. Localización subcelular de la poliproteína Gag_{SV}(MA_{FIV1-130})

Para que ocurra el proceso de ensamblado viral, la poliproteína Gag de los lentivirus debe ser transportada a la superficie celular para luego asociarse a la membrana plasmática.

Con el objeto de investigar si la poliproteína Gag_{SV}(MA_{FIV1-130}) posee la capacidad de asociarse "in vivo" a membranas celulares, se realizaron ensayos de fraccionamiento celular. Además, se analizó en forma comparativa la distribución en las fracciones citoplasmáticas y de membranas de las proteínas Gag salvaje de SIV y de FIV, así como la del precursor Gag de SIV no miristilado (Gag mirístico⁻) descrito anteriormente por nuestro laboratorio (González *et al.*, 1993). Estudios similares han sido realizados para determinar la asociación a membranas celulares de los precursores Gag de HIV-1 y de SIV (Bryant & Ratner, 1990; González & Affranchino, 1998; Park & Morrow, 1992; Yuan *et al.*, 1993; Zhou & Resh, 1996).

Células infectadas con los virus vaccinia recombinantes que dirigen la expresión de los precursores Gag salvaje de SIV, Gag mirístico⁻, Gag salvaje de FIV y Gag_{SV}(MA_{FIV1-130}) fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S]metionina/cisteína durante 3 horas. Luego de la marcación metabólica, las células fueron incubadas en buffer hipotónico, lisadas mecánicamente y fraccionadas en las fracciones soluble y de membranas. Cada fracción fue sometida a inmunoprecipitación con el suero de monos infectados con SIV, o con el suero de gatos infectados con FIV, o con una mezcla de ambos sueros según correspondiera. Las proteínas virales inmunoprecipitadas fueron resueltas en un gel 10% poliacrilamida-0,1% SDS y visualizadas por autorradiografía. La Figura II.4 A ilustra un experimento representativo de los ensayos de fraccionamiento celular. Los precursores Gag salvaje de SIV y de FIV se encontraron mayoritariamente asociados a la fracción de membranas (Figura II.4 A, fracción P). En cambio, el precursor Gag_{SV}(MA_{FIV1-130}) se distribuyó principalmente en la fracción soluble, exhibiendo una distribución similar a la de la proteína Gag de SIV no miristilada (Figura II.4 A, fracción S). Asimismo, se realizó un análisis cuantitativo (tres experimentos independientes) de la distribución de los precursores Gag salvaje de SIV, Gag mirístico⁻ y Gag_{SV}(MA_{FIV1-130}) en las fracciones citoplasmática y de membranas (Figura II.4 B). El precursor Gag salvaje de SIV se localiza casi por completo en la fracción de membranas; sólo el 9,5% se detecta en la fracción citosólica. En cambio, el 75% del precursor Gag mirístico⁻ se acumula en la fracción soluble.

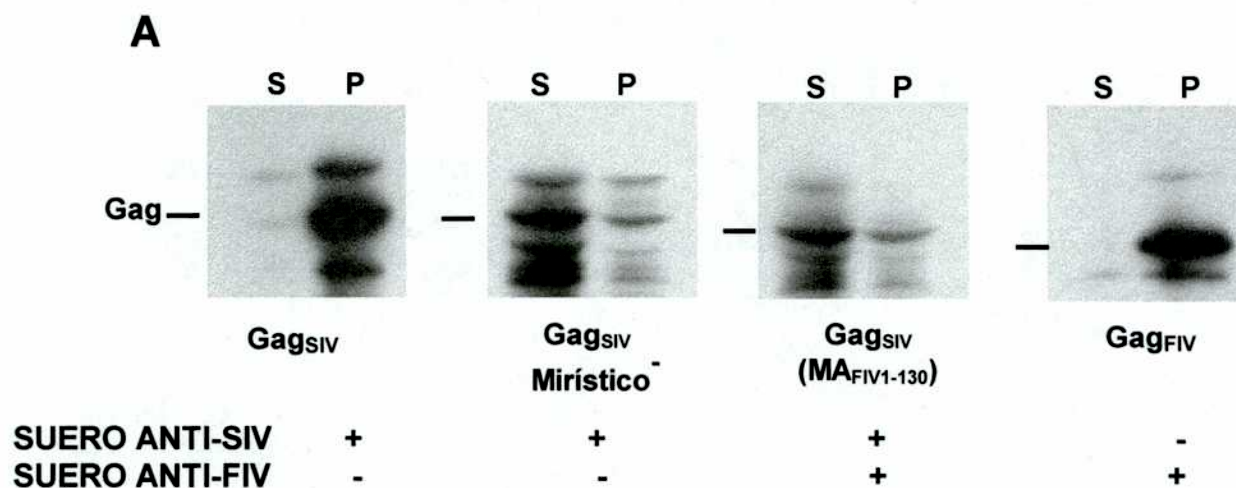


FIGURA II.4.A. Localización subcelular de la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}).

Células CV-1 infectadas en paralelo con los virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas Gag salvaje de SIV (Gag_{SIV}), Gag de SIV no miristilado (Gag_{SIV} Mirístico⁻), Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) o Gag salvaje de FIV (Gag_{FIV}) fueron marcadas metabólicamente con una mezcla de [³⁵S]metionina/cisteína durante 3 horas. Las células infectadas fueron incubadas en buffer hipotónico, lisadas mecánicamente y sometidas a ultracentrifugación para obtener la fracción citosólica (**S**) y la fracción de membranas (**P**). Las proteínas virales fueron detectadas en cada fracción por inmunoprecipitación con suero de monos infectados con SIV y/o con suero de gatos infectados con FIV. Las proteínas virales fueron luego resueltas en un gel 10% poliacrilamida-0,1% SDS y visualizadas por autorradiografía del gel. La figura muestra las autorradiografías obtenidas en un experimento típico.

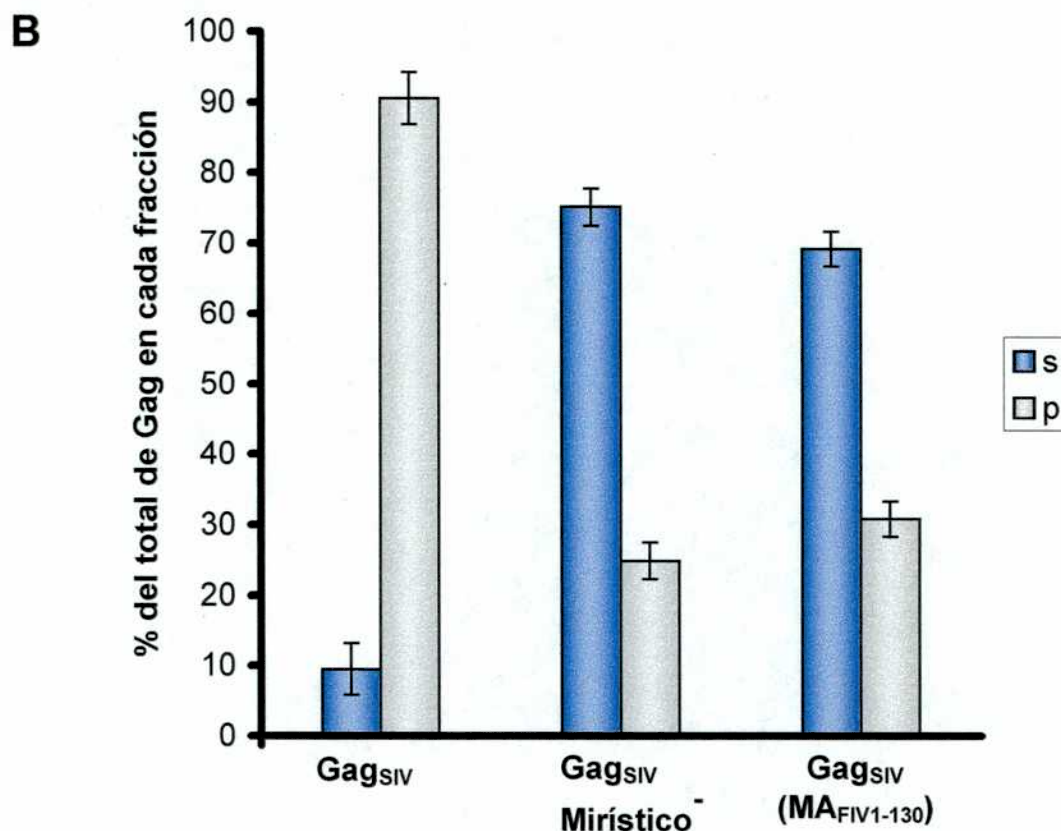


FIGURA II.4 B. Localización subcelular de la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}).

Representación gráfica de las cantidades relativas del precursor Gag en las fracciones citosólica (**S**) y de membranas (**P**) purificadas a partir de células expresando las proteínas Gag salvaje de SIV (Gag_{SIV}), Gag no miristilado (Gag_{SIV} Mirístico⁻) o Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}). La cuantificación se llevó a cabo por densitometría de la banda correspondiente a la poliproteína Gag presente en cada una de las fracciones **S** y **P**. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error indican la desviación estándar de la media.

En el caso de la proteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}), su distribución subcelular es similar a la del precursor Gag no miristilado, exhibiendo una asociación a la fracción citosólica que representa el 69% del total de la proteína Gag quimérica. En conjunto, estos resultados indican que el reemplazo del dominio MA del precursor Gag de SIV por el de FIV reduce la capacidad de Gag de asociarse a membranas.

II.5. Construcción de los ADN provirales quiméricos derivados de SIV

Los resultados obtenidos hasta este punto indicaban que el reemplazo del dominio MA de la proteína Gag de SIV por su equivalente de FIV reduce drásticamente la producción de partículas extracelulares. Resultó entonces relevante estudiar el efecto de introducir este gen *gag* quimérico en el contexto del ADN proviral de SIV. Se construyeron y caracterizaron además otros dos virus quiméricos en los que se reemplazó parcialmente el dominio MA de SIV por la región equivalente de FIV. La Figura II.5 muestra las representaciones esquemáticas de las construcciones quiméricas realizadas. El virus quimérico SIV(MA_{FIV1-36}) contiene la región que codifica para los 36 residuos amino terminales de la proteína MA de FIV en el contexto del genoma de SIV. En el virus SIV(MA_{FIV37-130}) se mantuvo la región amino terminal de la proteína MA de SIV comprendida entre los residuos 1 a 36, pero se reemplazó el resto de la MA por la secuencia equivalente de FIV. En cambio, en la construcción quimérica SIV(MA_{FIV1-130}) se reemplazó la región codificante para la proteína MA de SIV por la de FIV. En todas estas construcciones se preservaron los 5 aminoácidos carboxilo terminales de la proteína MA de SIV para permitir el correcto clivaje por la PR de SIV del sitio de procesamiento entre los dominios MA y CA (Figura II.5).

II.6. Expresión y ensamblado de los virus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) y SIV(MA_{FIV1-130})

En primer lugar, se examinó la expresión y el ensamblado dirigido por las construcciones quiméricas derivadas de SIV. Para ello, se transfectaron en paralelo células 293T con los ADN provirales de SIV salvaje, SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) o SIV(MA_{FIV1-130}). A las 48 horas postransfección, se prepararon los lisados celulares y los viriones extracelulares se purificaron por ultracentrifugación en colchón de sacarosa

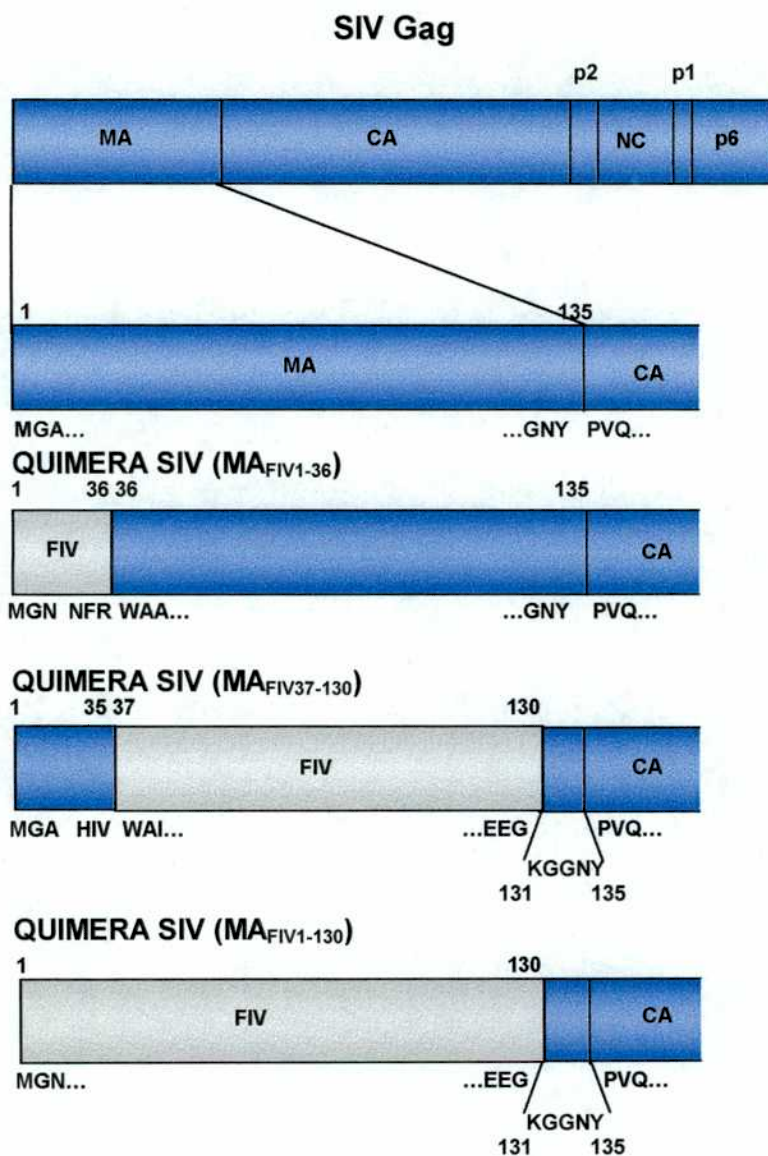


FIGURA II.5. Construcciones quiméricas realizadas en el contexto del ADN proviral de SIV. En gris se indican las secuencias de FIV, mientras que en azul se indican las regiones de SIV. Los números en la parte superior de cada construcción indican la extensión de la región MA (en posición aminoacídica) correspondiente a cada virus, señalándose la posición del primer y del último residuo de cada fragmento. En la parte inferior de cada construcción, se indican los primeros y los últimos aminoácidos (en código de una letra) de cada región MA intercambiada.

a partir de los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas. Tanto los lisados celulares como los viriones liberados al medio extracelular fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína CA de SIV. Como se observa en la Figura II.6 A, en las células transfectadas con los ADN provirales quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) o SIV(MA_{FIV1-130}) los precursores Gag se expresaron y procesaron en forma similar a la proteína Gag salvaje de SIV. Cuando se analizó la fracción particulada, se observó que tanto la quimera SIV(MA_{FIV1-36}) como la SIV(MA_{FIV37-130}) producían viriones en niveles similares a los producidos por SIV salvaje (Figura II.6 B). En cambio, la quimera SIV(MA_{FIV1-130}), y de acuerdo con los resultados obtenidos con el sistema del virus vaccinia (Figura II.1), exhibió niveles muy bajos de formación de viriones respecto de los del virus SIV salvaje (Figura II.6 B). Estos resultados indican que las proteínas Gag quiméricas de SIV conteniendo las regiones amino terminales (SIV[MA_{FIV1-36}]) o central y carboxilo (SIV[MA_{FIV37-130}]) de la MA de FIV se ensamblan en viriones en forma similar al precursor Gag salvaje de SIV. En cambio, el reemplazo total de la MA de SIV por su equivalente de FIV inhibe el ensamblado de Gag en viriones.

II.7. Incorporación de la glicoproteína viral Env de SIV a los viriones quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130})

De los tres virus quiméricos derivados de SIV, los virus SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) producen viriones con la misma eficiencia que el virus salvaje (Figura II.6). Se decidió entonces estudiar la capacidad de los mismos de incorporar la glicoproteína Env de SIV, ya que este proceso confiere infectividad a los viriones. Para ello, se analizó en los viriones quiméricos la presencia de la subunidad TM de la proteína Env de SIV mediante un ensayo de Western blot utilizando un MAb dirigido contra esta proteína. Un ensayo similar ha sido utilizado por nuestro laboratorio para estudiar el efecto de mutaciones en el gen *env* o en el dominio MA de SIV sobre el proceso de incorporación de Env a viriones (Celma *et al.*, 2001; Manrique *et al.*, 2001; 2003). Como muestra la Figura II.7, los lisados de células 293T transfectadas con los ADN provirales SIV(MA_{FIV1-36}) o SIV(MA_{FIV37-130}) mostraron niveles de las proteínas CA y TM similares a los del virus salvaje de SIV. Sin embargo, al analizar los niveles de proteína TM asociados a los viriones quiméricos, se observó que éstos eran significativamente menores a los detectados en los viriones salvajes (Figura II.7, Viriones).

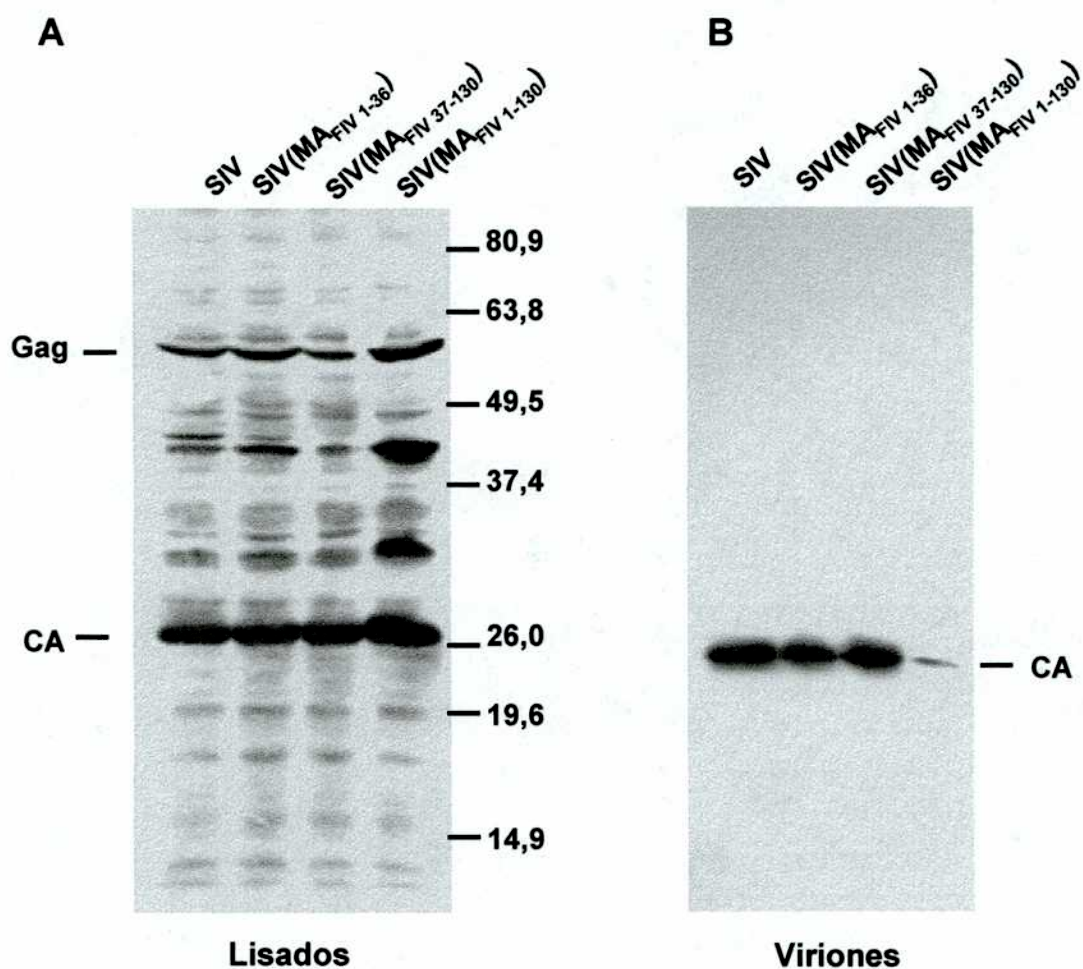


FIGURA II.6 Expresión y ensamblado de los virus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) y SIV(MA_{FIV1-130}).

Se transfectaron células 293T en paralelo con los ADN provirales de SIVPBj 1.9 (SIV), SIV(MA_{FIV1-36}), SIV(MA_{FIV37-130}) o SIV(MA_{FIV1-130}). Se prepararon los lisados celulares y se purificaron los viriones extracelulares. Las proteínas virales presentes en los lisados celulares (A) y en los viriones (B) fueron detectadas con un MAb dirigido contra la proteína CA de SIV. Se indica la movilidad de la proteína Gag y de la proteína CA, así como la de los marcadores de peso molecular (en kDa).

Estos resultados indican que los virus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) son incapaces de incorporar eficientemente la glicoproteína Env. Por otro lado, se examinó la infectividad de los virus quiméricos mediante un ensayo MAGI. Para ello, los sobrenadantes de cultivo de células 293T transfectadas con los ADN provirales de SIV salvaje, SIV(MA_{FIV1-36}) o SIV(MA_{FIV37-130}) fueron normalizados por su actividad de TR y luego utilizados para infectar células MAGI-CCR5 (Hela-CD4-CCR5/LTR-β-Gal). Los virus quiméricos resultaron significativamente menos infecciosos que el virus SIV salvaje; en efecto, exhibieron una infectividad en el ensayo MAGI menor al 1% respecto de la infectividad del virus salvaje (datos no mostrados). Esto indica que el defecto en la incorporación de Env exhibido por los viriones quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) es acompañado por una drástica reducción en la capacidad infectiva de los virus.

II.8. Efecto de la sustitución aminoacídica G31K/G33K sobre el ensamblado del virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130})

Los resultados obtenidos durante la caracterización fenotípica de la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) indicaban que su incapacidad para ensamblarse se debía a un defecto en el transporte y/o asociación de Gag con la membrana plasmática (sección II.4, Resultados) En el caso de la proteína Gag salvaje de SIV, su transporte y asociación a la membrana requieren de la adición del ácido mirístico en el extremo amino terminal del dominio MA así como de una región polibásica localizada entre las posiciones 26-32 de la proteína MA (González *et al.*, 1993). Estos residuos básicos establecerían interacciones electroestáticas con fosfolípidos ácidos del lado interno de la membrana plasmática aportando energía adicional de unión a la membrana respecto de la provista por el grupo mirístico (Zhou *et al.*, 1994). Al alinear las secuencias aminoacídicas del extremo amino de las proteínas MA de FIV y SIV, puede observarse que la MA de FIV conserva en posiciones equivalentes tres de los cinco aminoácidos básicos presentes en la región polibásica de la MA de SIV (Figura II.8 A). Decidimos entonces investigar si el fenotipo defectivo en el ensamblado de la quimera SIV(MA_{FIV1-130}) podía ser revertido sustituyendo los residuos de glicina en las posiciones 31 y 33 de la MA de FIV por lisinas, aumentando de esta forma la carga positiva de esta región.

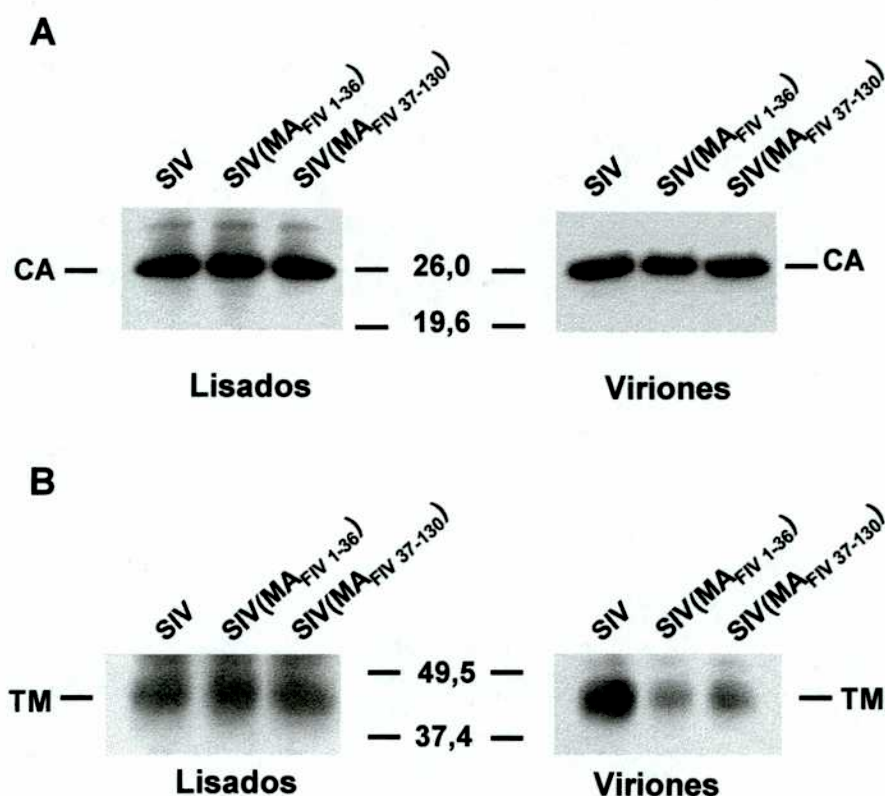


FIGURA II.7. Incorporación de la glicoproteína Env de SIV a los viriones quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}).

Células 293T fueron transfectadas con los ADN provirales de SIV salvaje (SIV), SIV(MA_{FIV1-36}) o SIV(MA_{FIV37-130}). A las 48 horas postransfección, las células fueron lisadas (**Lisados**) y los viriones purificados por ultracentrifugación a partir de los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas (**Viriones**). Las proteínas virales CA (**Panel A**) y TM (**Panel B**) presentes tanto en los lisados como en los viriones fueron detectadas por Western blot utilizando MAbs como se describe en Materiales y Métodos.

Se indica la movilidad de las proteínas TM y CA, así como la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

Las sustituciones aminoacídicas se introdujeron en el ADN proviral de SIV(MA_{FIV1-130}) utilizando la técnica de mutagénesis dirigida asistida por PCR asimétrica como se detalla en Materiales y Métodos. Se transfectaron luego células 293T con los ADN provirales de SIV salvaje, SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K o SIV(MA_{FIV1-130}). A las 48 horas postransfección, las células fueron lisadas y los sobrenadantes de cultivo fueron sometidos a ultracentrifugación en colchón de sacarosa para purificar los viriones producidos. Posteriormente, se detectó tanto en lisados celulares como en viriones la presencia de la proteína CA de SIV por medio de ensayos de Western blot. Tanto el virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130}) como el mutante derivado de éste, el virus SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K, se expresaron en las células transfectadas en niveles similares al virus salvaje (Figura II.8 B, Lisados). Al analizar la fracción de viriones, se encontró que la doble sustitución aminoacídica G31K/G33K introducida en el dominio MA del virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130}) incrementaba significativamente los niveles de viriones extracelulares respecto de los escasamente producidos por el virus quimérico original (Figura II.8 B, Viriones). Estos resultados indican que al recrear en la región amino de la MA de la quimera SIV(MA_{FIV1-130}) un motivo polibásico similar al de la MA de SIV se revierte sustancialmente el fenotipo defectivo en ensamblado del virus quimérico.

II.9. Coexpresión de la proteína Gag quimérica SIV(MA_{FIV1-130}) con la Gag salvaje de SIV

Durante el proceso de ensamblado de partículas virales, el precursor Gag debe establecer interacciones del tipo proteína-proteína con otras moléculas de Gag.

Teniendo en cuenta que el defecto en el ensamblado exhibido por el virus SIV(MA_{FIV1-130}) se encuentra a nivel del transporte y/o asociación de Gag con la membrana plasmática, se decidió estudiar la capacidad de la proteína quimérica Gag_{SIV(MA_{FIV1-130})} de interactuar con moléculas de Gag salvaje de SIV. Si ambos precursores fueran capaces de establecer interacciones entre sí, la proteína Gag quimérica podría ser transportada por el precursor salvaje hasta la membrana plasmática, siendo entonces incorporada a las partículas virales. Para investigar esta posibilidad, células 293T fueron cotransfectadas con cantidades equivalentes de los ADN provirales de la quimera SIV(MA_{FIV1-130}) y de SIV salvaje. Como controles, se incluyeron células transfectadas solamente con el ADN proviral de SIV salvaje o con el de SIV(MA_{FIV1-130}).

A

FIV M G N G Q G R D W K M A I K R C N N V A V G V G T **K S K K F G E G N F R W A 38**
 SIV M G A R N S V L S G K K A D E L E K I R L R P G G K - **K R Y K L K H I V W A 37**

K K
 ↑ ↑

B

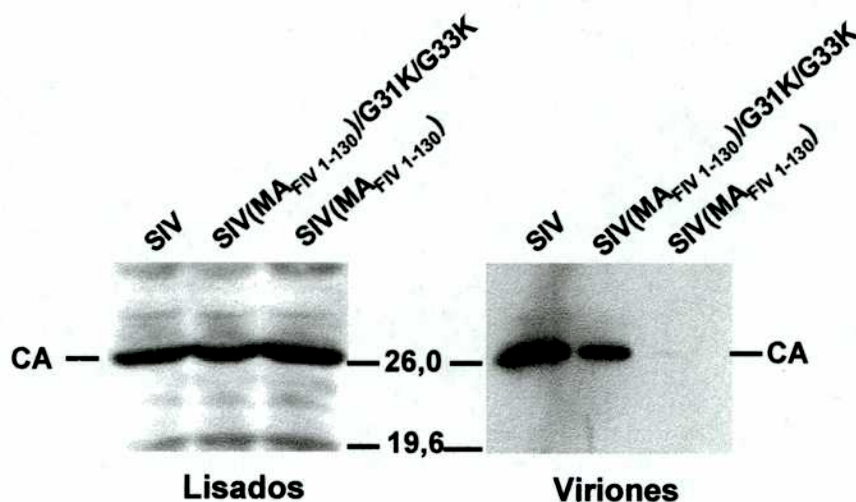


FIGURA II.8. Efecto de la mutación G31K/G33K en el dominio MA del virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130}) sobre el ensamblado y producción de viriones.

(A) Alineamiento de la región amino terminal de las proteínas MA de FIV y SIV. En negrita se indican los aminoácidos básicos que forman la región polibásica de la MA de SIV y aquellos que están conservados en la MA de FIV. En el virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K las glicinas en las posiciones 31 y 33 de la MA de FIV (en negrita y subrayadas) fueron sustituidas por lisinas (flechas).

(B) Células 293T fueron transfectadas con los ADN provirales de SIV salvaje (SIV), SIV(MA_{FIV1-130})/G31K/G33K o SIV(MA_{FIV1-130}). A las 48 horas postransfección, se prepararon lisados celulares y se purificaron los viriones extracelulares. Se analizó por Western blot la presencia en cada fracción de la proteína CA de SIV.

Se indica la movilidad de la proteína CA y la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

A las 48 horas postransfección, las células fueron lisadas y las partículas virales fueron purificadas del medio de cultivo por ultracentrifugación. Para poder discriminar entre las proteínas virales derivadas de SIV salvaje y las que resultan de la expresión del virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130}), las muestras fueron examinadas por Western blot utilizando un MAb dirigido contra la proteína MA de SIV o suero de gatos infectados con FIV. Como muestra la Figura II.9 (Lisados), las células cotransfectadas con los ADN provirales de SIV salvaje y SIV(MA_{FIV1-130}) expresaron eficientemente ambos precursores Gag, como se evidencia por la presencia de las proteínas MA de SIV y de FIV en los lisados celulares. En efecto, cuando se analizaron los lisados celulares del experimento de cotransfección con el MAb anti-MA de SIV, se detectaron el precursor Gag salvaje y la MA de SIV. Cuando estos mismos lisados se analizaron con el suero de gatos infectados con FIV, se visualizaron el precursor Gag quimérico y la MA de FIV. Al examinar con el MAb anti-MA de SIV los viriones purificados a partir del sobrenadante de cultivo de las células cotransfectadas con los ADN provirales SIV(MA_{FIV1-130}) y SIV salvaje, se detectó claramente la proteína MA de SIV, lo que resulta previsible dado que el precursor Gag salvaje se ensambla eficientemente en partículas (Figura II.9, Viriones). Lo que resulta destacable es que los viriones producidos por las células cotransfectadas presentaron niveles de proteína MA de FIV muy superiores a los escasamente detectados en la fracción particulada del medio de cultivo de las células que expresaban únicamente la proteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) (Figura II.9, Viriones). Estos resultados indican que el precursor Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) posee la capacidad de establecer interacciones con las moléculas de Gag salvaje, pudiendo ser así rescatado por esta última e incorporado a viriones.

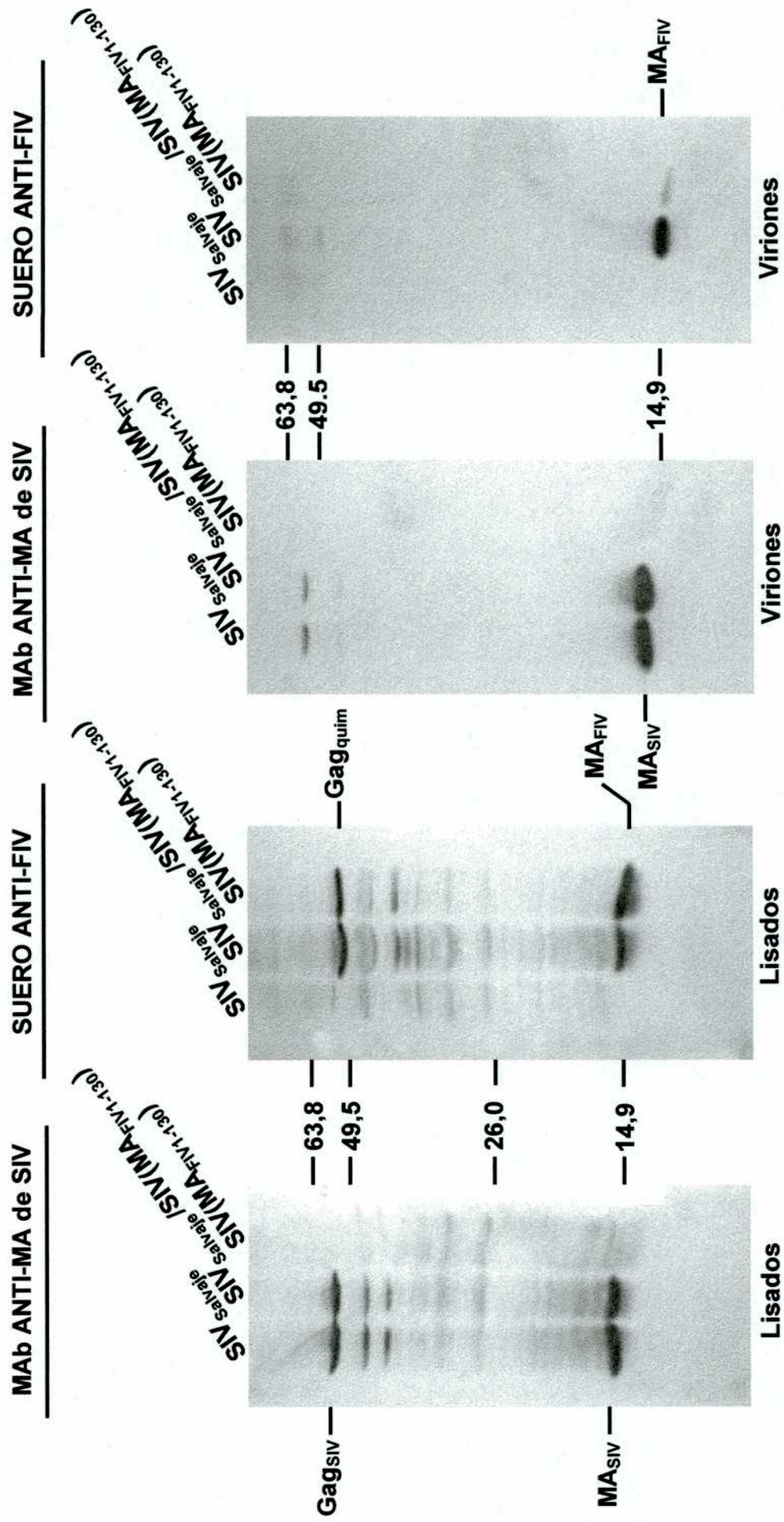


FIGURA II.9. Coexpresión de la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) con Gag salvaje de SIV.

FIGURA II.9. Coexpresión de la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) con Gag salvaje de SIV. Células 293T fueron cotransfectadas con cantidades equivalentes de los ADN provirales de SIV(MA_{FIV1-130}) y SIV salvaje. Como controles, se incluyeron células 293T transfectadas con el ADN proviral de SIV(MA_{FIV1-130}) o con el de SIV salvaje. A las 48 horas postransfección, las células fueron lisadas y los viriones purificados por ultracentrifugación a partir del medio de cultivo en colchón de sacarosa. Tanto los lisados celulares como los viriones purificados fueron sometidos a ensayos de Western blot. Para discriminar, en el caso de la cotransfección, entre el precursor Gag salvaje de SIV (Gag_{SIV}) y el precursor Gag quimérico (Gag_{quim}) así como entre la MA de SIV y la de FIV, se utilizó un MAb dirigido contra la MA de SIV (MAb ANTI-MA de SIV) o bien suero de gatos infectados con FIV (ANTI-FIV). Se indica la movilidad de las proteínas Gag y MA, así como la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

II.10. Expresión y ensamblado del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130})

Para completar el estudio de la relación estructural y funcional entre las proteínas MA de FIV y de SIV, se construyó en el contexto del genoma de FIV el virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}) en el cual se reemplazó el dominio MA de FIV por la región equivalente de SIV (Figura II.10). Se conservaron sin embargo los 5 aminoácidos carboxilo terminales de la MA de FIV para asegurar el procesamiento adecuado del precursor Gag de FIV en la región MA-CA (Figura II.10). Para analizar el fenotipo del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}), se transfectaron células felinas CrFK con los ADN provirales de FIV salvaje o del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}). A las 48 horas postransfección, se prepararon los lisados celulares y la fracción de viriones se purificó del sobrenadante de cultivo de las células transfectadas. Como era esperable, cuando los lisados celulares se analizaron por Western blot utilizando un MAb dirigido contra la MA de SIV, se detectaron las bandas correspondientes al precursor y a la MA únicamente en el caso de las muestras de células transfectadas con el ADN proviral quimérico (Figura II.11 A). Al analizar tanto los lisados celulares como los viriones por Western blot utilizando un MAb dirigido contra la proteína CA de FIV se observó que el precursor Gag quimérico FIV(MA_{FIV1-130}) se expresaba y procesaba en forma similar a la poliproteína Gag salvaje de FIV (Figura II.11 B, Lisados). Por otro lado, la proteína Gag quimérica se ensambló en viriones con una eficiencia similar a la de la proteína Gag salvaje de FIV (Figura II.11 B, Viriones). Estos resultados indican que la poliproteína Gag quimérica derivada de FIV llevando el dominio MA de SIV es competente para el ensamblado viral.

FIV Gag

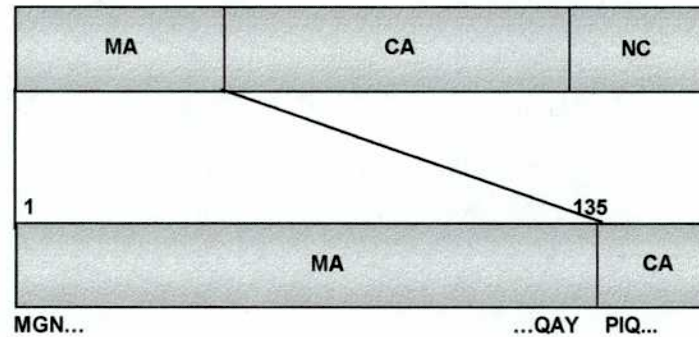
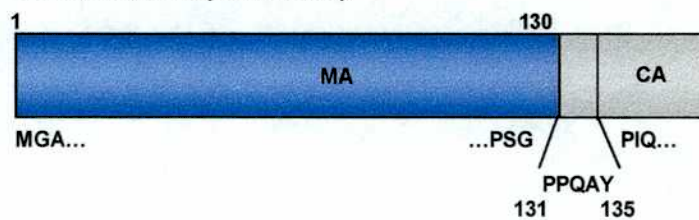
QUIMERA FIV(MA_{SIV1-130})

FIGURA II.10. Construcción quimérica realizada en el contexto del ADN proviral de FIV. En gris se indican las secuencias de FIV, mientras que en azul se indican las regiones de SIV. Los números en la parte superior de la construcción indican la extensión de la región MA (en posición aminoacídica) correspondiente a cada virus, señalándose la posición del primer y del último residuo de cada fragmento. En la parte inferior de la construcción, se indican los primeros y los últimos aminoácidos (en código de una letra) de la región MA intercambiada.

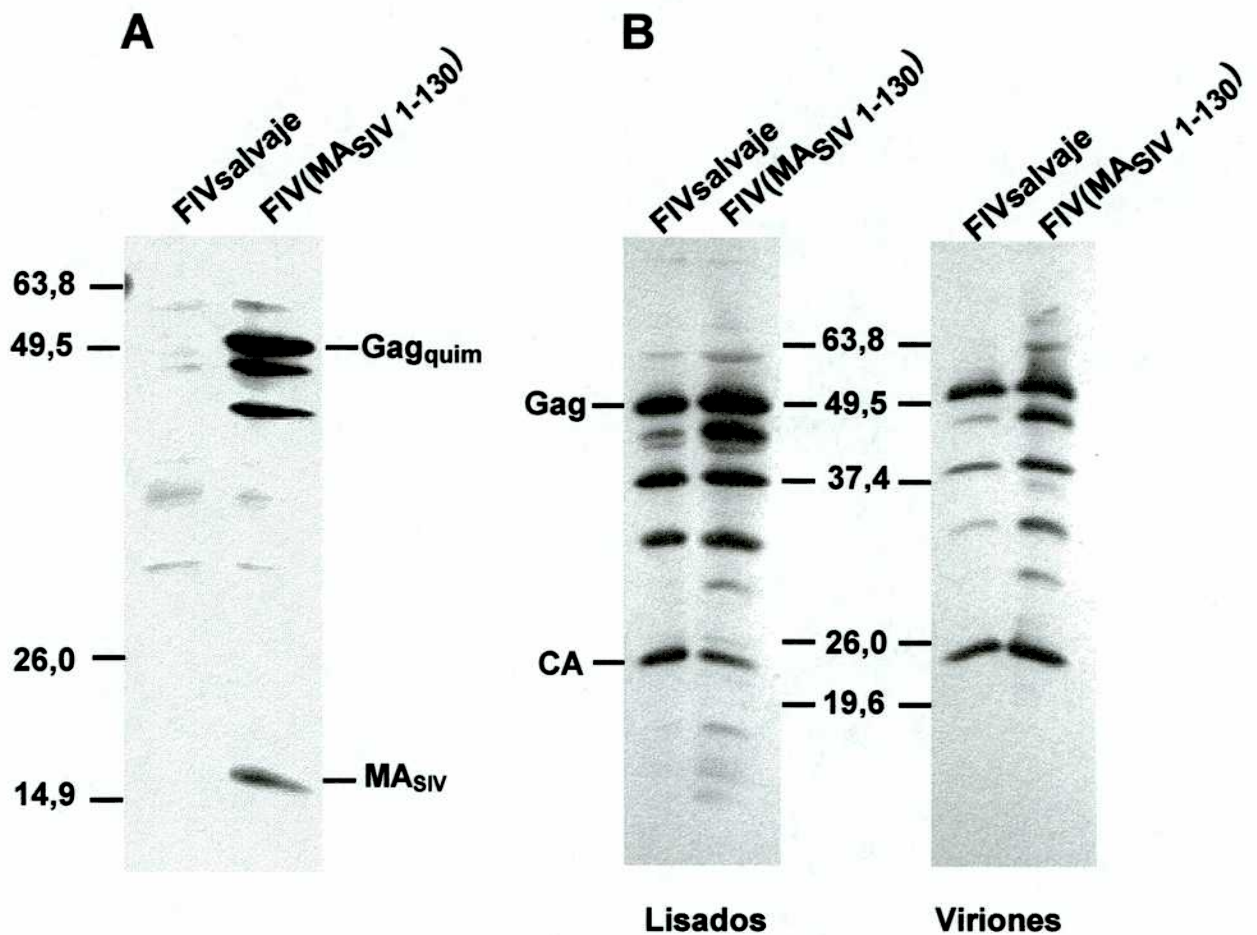


FIGURA II.11. Expresión y ensamblado del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}).

Células felinas CrFK fueron transfectadas con los ADN provirales de FIV salvaje o del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}). **(A)** Los lisados celulares fueron analizados por Western blot con un MAb anti-MA de SIV. Gag_{quim}, proteína Gag quimérica. **(B)** Las proteínas virales presentes en lisados (**Lisados**) y viriones (**Viriones**) fueron detectados por Western blot utilizando un MAb dirigido contra la proteína CA de FIV.

Se indica la movilidad de las proteínas Gag MA y CA, así como la posición de los marcadores de peso molecular (en kDa).

II.11. Cinética de replicación del virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130})

Finalmente, para completar la caracterización del virus quimérico derivado de FIV en el que se sustituyó el dominio MA de FIV por el de SIV, se analizó su capacidad de replicación en células T felinas. Para ello, los sobrenadantes de cultivo de células CrFK transfectadas con los ADN provirales de FIV salvaje o FIV(MA_{SIV1-130}) fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células felinas MYA-1. La replicación viral se analizó a través del tiempo midiendo los niveles de TR en alícuotas de los medios de cultivo de las infecciones. Como se observa en la Figura II.12, el virus quimérico FIV(MA_{SIV1-130}) presentó una cinética de replicación similar a la del virus FIV salvaje, indicando que el virus quimérico es capaz de replicarse en células T felinas.

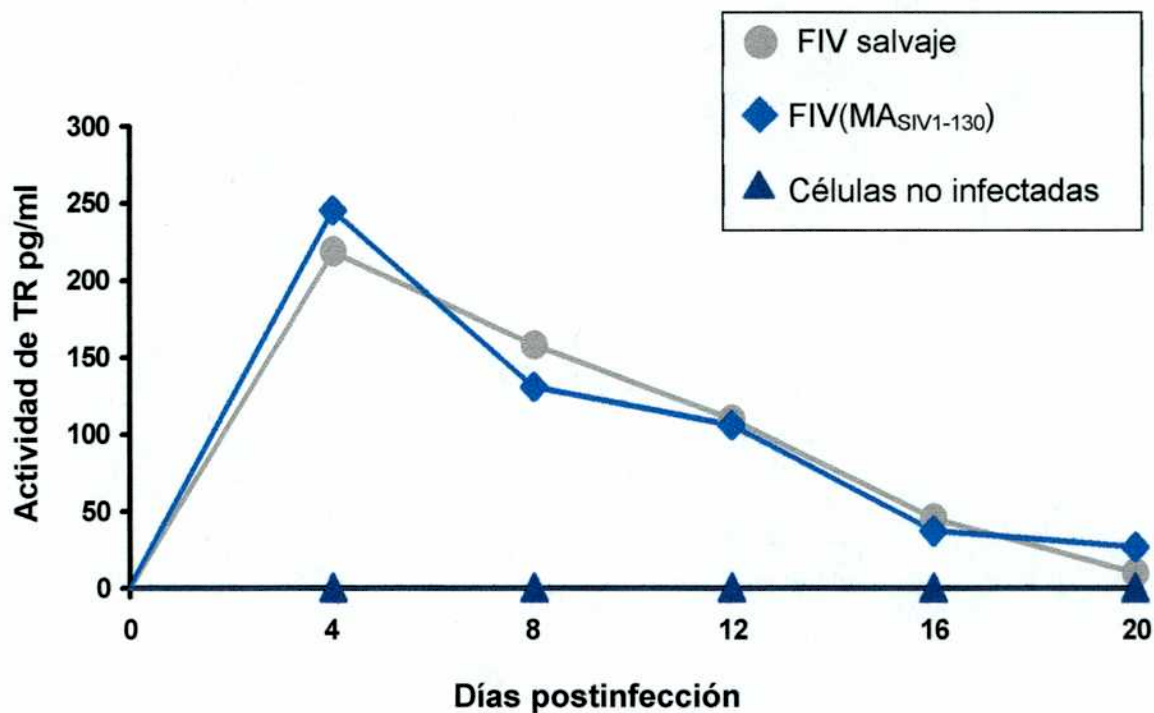


Figura II 12. Cinética de replicación del virus FIV(MA_{SIV1-130}) en células felinas MYA-1.

Sobrenadantes de células CrFK transfectadas con los ADN provirales de FIV salvaje o FIV(MA_{SIV1-130}) fueron normalizados por actividad de TR y utilizados para infectar células MYA-1. Se evaluó la replicación viral midiendo cada 4 días la actividad de TR en alícuotas del medio de cultivo de las infecciones según se describe en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

I. Identificación de dominios funcionales en la proteína MA de FIV

Hasta el momento de iniciar los estudios presentados en esta tesis, la información disponible respecto de la morfogénesis de FIV era muy escasa. Por esto, decidimos utilizar el sistema de expresión recombinante del virus vaccinia para estudiar el ensamblado de FIV.

Los ensayos bioquímicos y de microscopía electrónica presentados en esta tesis demuestran que la expresión del precursor Gag de FIV, utilizando el sistema del virus vaccinia, resulta en el ensamblado, brotación y liberación de partículas pseudovirales al medio extracelular. En este sentido, la expresión de las poliproteínas Gag de HIV-1 y SIV, por medio del sistema del virus vaccinia resulta también en el autoensamblado de Gag en partículas pseudovirales (González *et al.*, 1993; Karacostas *et al.*, 1989). Estos estudios, junto con los presentados sobre FIV en esta tesis, establecen claramente que las proteínas Gag de los lentivirus son capaces de dirigir los procesos de ensamblado y brotación de partículas.

Las partículas pseudovirales de FIV obtenidas con el sistema de vaccinia poseen la morfología de una partícula lentiviral inmadura y exhiben un tamaño heterogéneo cuyo diámetro varía entre 130-150 nm. Los virus con envoltura se caracterizan por la heterogeneidad del tamaño que presentan las partículas virales y, en este sentido, los retrovirus no son una excepción. La heterogeneidad en el tamaño de las partículas virales ha sido descrita en HIV-1, tanto para partículas recombinantes como para viriones auténticos. En efecto, estudios de microscopía electrónica han reportado que las partículas de HIV-1 varían entre 90-160 nm (Reicin *et al.*, 1996), 95-175 nm (Dorfman *et al.*, 1994) o 120-260 nm (Fuller *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la variación en el tamaño de los viriones se debe a que el proceso de ensamblado tolera la participación de un número variable de moléculas de Gag que se oligomerizan (Fuller *et al.*, 1997).

Además de la formación de partículas pseudovirales, la expresión de la poliproteína Gag de FIV mediante el sistema del virus vaccinia resulta en la formación de estructuras tubulares de 80 nm de diámetro que se observan al microscopio electrónico tanto brotando de la membrana plasmática como libres en el medio extracelular. Es interesante destacar que se han observado estructuras tubulares similares en la superficie de células de insecto que expresan la poliproteína Gag del virus de la

leucemia bovina (BLV) (Kakker *et al.*, 1999).

Nuestro laboratorio ha demostrado que la proteína MA de SIV es capaz de ensamblarse en partículas que presentan la típica morfología lentiviral (González *et al.*, 1993). En cambio, la proteína MA de HIV-1 es incapaz de formar este tipo de estructuras (Giddings *et al.*, 1998). Por lo tanto, resultó importante examinar si la proteína MA de un lentivirus de animal no primate era capaz de autoensamblarse en partículas. Los resultados presentados en esta tesis indican que la proteína MA de FIV no puede ser detectada en la fracción particulada que es purificada a partir del sobrenadante de células infectadas con el recombinante de vaccinia que expresa la región codificante para este dominio de Gag. Por lo tanto, la proteína MA de FIV, al igual que la de HIV-1, es incapaz de ensamblarse en partículas. Es interesante mencionar que la proteína Gag de SIV posee dos copias del motivo aminoacídico PTAP, uno en el dominio MA y otro en el dominio carboxilo terminal p6. En cambio, tanto HIV-1 como FIV poseen una única copia de este motivo en la región carboxilo terminal de Gag. El motivo PTAP presente en el péptido p6 de HIV-1 es necesario para que ocurra eficientemente el proceso de brotación de las partículas virales (Freed, 2002). La presencia en la MA de SIV de un dominio involucrado en la brotación de partículas podría entonces contribuir a explicar la capacidad distintiva de esta proteína de formar partículas pseudovirales extracelulares.

Para identificar dominios funcionales en la proteína MA de FIV, el dominio MA del gen *gag* fue sometido a mutagénesis dirigida y los genes *gag* mutantes resultantes fueron expresados en el sistema del virus vaccinia. De esta forma, se identificaron cuatro fenotipos diferentes de ensamblado de acuerdo a la capacidad de las proteínas Gag mutantes de ensamblarse en partículas pseudovirales:

El fenotipo I incluye a los mutantes M2 (M11Q/I13N) y M3 (V19G/V21Q/V23N), en los cuales se eliminó el carácter hidrofóbico presente en estas dos regiones amino terminales de la MA. Estos mutantes producen partículas con un eficiencia similar a la de la proteína Gag salvaje. Las mutaciones M2 y M3 fueron originalmente diseñadas para estudiar la contribución de estas regiones hidrofóbicas a la asociación de Gag con la membrana plasmática, teniendo en cuenta el antecedente que en la MA de SIV los residuos hidrofóbicos Val 7 y Leu 8 son necesarios para la interacción de Gag con la membrana, ya que estabilizan la asociación del ácido mirístico con la bicapa lipídica (González & Affranchino, 1998). El hecho de que los mutantes M2 y M3 sean

competentes para el ensamblado indica que los dominios hidrofóbicos amino terminales mutados en estas proteínas Gag no son indispensables para su transporte o para la formación de partículas virales.

El fenotipo II, caracterizado por una eficiencia de ensamblado del 40% respecto de la exhibida por el precursor Gag salvaje de FIV, incluye a los mutantes D1 y D4 en los que se delecionaron las regiones hidrofóbicas que comprenden los residuos 37-41 y 89-93, respectivamente.

Los mutantes que pertenecen al fenotipo de ensamblado III, D3 y D5, exhiben una capacidad muy reducida de formación de partículas. En efecto, estas mutaciones inhiben en un 85% el ensamblado de Gag respecto del de la proteína salvaje. En el caso del mutante D3, la mutación introducida también afecta la estabilidad del precursor Gag, presentando una vida media más corta que la de la proteína Gag salvaje. Las regiones de la MA de FIV cuya delección en los mutantes D3 y D5 inhibe el ensamblado podrían participar de interacciones intermoleculares del tipo Gag-Gag necesarias para el ensamblado, o bien de interacciones intramoleculares necesarias para que el precursor Gag adquiriera la conformación biológicamente funcional.

Por último, el fenotipo IV comprende a los mutantes M1 (G2A), M4 (K26E/K28E/K29E), M5 (K26N/K28N/K29N) y D2 (delección de residuos 52-56) los cuales son incompetentes en la formación de partículas virales. Respecto de este último grupo de mutantes, el análisis por microscopía electrónica de las células que expresan el mutante de Gag no miristilado, M1, revela la ausencia de partículas ensamblándose en la membrana plasmática o en el medio extracelular. En cambio, se observan estructuras derivadas de Gag con forma de anillo en el citoplasma celular. En este sentido, estructuras similares han sido halladas en el citoplasma de células expresando una versión no miristilada de la proteína Gag de HIV-1 (Gheysen *et al.*, 1989). Estos resultados indican que, al igual que en otros lentivirus como SIV y HIV, la modificación por N-miristilación del precursor Gag de FIV es crítica para el transporte y asociación de Gag con la membrana plasmática. En HIV-1 y SIV, la interacción de Gag con la membrana requiere, además del ácido mirístico, de una región polibásica en el extremo amino de la MA (González *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Las proteínas Gag mutantes M4 y M5, en las que las lisinas en las posiciones 26, 28 y 29 se sustituyeron simultáneamente por un aminoácido ácido (glutámico) o polar (asparagina), respectivamente, se acumulan formando una capa proteica electrodensa

localizada inmediatamente por debajo de la superficie celular. No se encontraron evidencias de estructuras brotando de la superficie celular ni de partículas extra o intracelulares. Estos datos sugieren que las mutaciones M4 y M5, en lugar de afectar el transporte o asociación de Gag con la membrana, interfieren con el ensamblado y/o con el proceso de brotación. En este sentido, se han descrito mutaciones que afectan los residuos básicos de la MA del virus de la leucemia T humana tipo I (HTLV-I) que impiden la liberación de partículas sin afectar el transporte ni la asociación de Gag con la membrana plasmática (Le Blanc *et al.*, 1999).

II. Relación funcional entre las proteínas MA de FIV y de SIV

Los estudios de mutagénesis dirigida del dominio MA del precursor Gag de FIV descritos en esta tesis indican que la proteína MA exhibe dominios que son necesarios para el transporte de Gag y para el ensamblado de Gag en partículas. Por lo tanto, a pesar de la escasa homología de secuencia que existe entre la proteína MA de FIV y las de HIV y SIV, estas proteínas poseen funciones similares durante la morfogénesis viral. En este sentido, las estructuras cristalinas de las proteínas MA de HIV-1 y SIV son muy similares presentando 4 α -hélices organizadas alrededor de una hélice central, lo que genera un dominio globular compacto (Hill *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995). Además, ambas proteínas MA tienen la capacidad de formar trímeros en el cristal (Hill *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1995). Incluso las estructuras determinadas por resonancia magnética nuclear de las proteínas MA de oncorretrovirus, tales como BLV, HTLV-II y M-PMV, exhiben una organización similar a las de HIV-1 y SIV, lo que sugiere que las MA retrovirales comparten la forma de participar en el transporte y ensamblado del precursor Gag (Conte & Matthews, 1998). Debido a que no se dispone aún de información estructural sobre la MA de FIV, decidimos investigar la relación estructural y funcional entre la proteína MA de FIV y la de los lentivirus de primates. Para ello, construimos virus quiméricos derivados de SIV o FIV en los cuales se reemplazó parcial o totalmente el dominio MA de un virus por el del otro.

En el contexto del genoma de SIV se construyeron tres quimeras: (a) la quimera SIV(MA_{FIV1-36}) conteniendo los 36 aminoácidos amino terminales de la MA de FIV; (b) la quimera SIV(MA_{FIV37-130}) conteniendo la porción central y carboxilo de la MA de FIV; y

(c) la quimera SIV(MA_{FIV1-130}) en la que se reemplazó la casi totalidad del dominio MA de Gag de SIV por la región equivalente de FIV.

Los virus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) exhiben una capacidad de ensamblado similar a la del virus SIV salvaje. En cambio, el virus SIV(MA_{FIV1-130}) resulta incapaz de formar partículas en forma eficiente. Al estudiar cuál era la causa de la inhibición del proceso de ensamblado de la quimera SIV(MA_{FIV1-130}), se determinó que el defecto se debe a una incapacidad de la poliproteína Gag quimérica de asociarse en forma eficiente con la membrana, a pesar de exhibir un grado de miristilación similar al de la poliproteína Gag salvaje. En efecto, los estudios de fraccionamiento subcelular indican que el precursor Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) se distribuye mayoritariamente en la fracción soluble, mientras que la proteína Gag salvaje de SIV lo hace en la fracción de membranas. La asociación a la membrana del precursor Gag de SIV requiere de la acción sinérgica del ácido mirístico y de la región polibásica de la MA que involucra 5 aminoácidos básicos entre las posiciones 26-32 (González *et al.*, 1993). La MA de FIV conserva tres de estos residuos básicos en posiciones equivalentes. Se decidió entonces investigar si al incrementar el número de residuos de esta región de la MA de FIV en la quimera SIV(MA_{FIV1-130}), se revertía su fenotipo defectivo de ensamblado. En efecto, la doble sustitución G31K/G33K en la quimera SIV(MA_{FIV1-130}), que transforma la región básica de la MA de FIV en una similar a la de SIV, restituye sustancialmente la capacidad de formación de viriones. Por otro lado, los experimentos de coexpresión de la proteína Gag salvaje de SIV y quimérica SIV(MA_{FIV1-130}) demostraron que la proteína Gag salvaje es capaz de reclutar en viriones a la poliproteína Gag quimérica. Esto indica que la proteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) mantiene la capacidad de interactuar y oligomerizar con la proteína Gag salvaje, y que esta última provee en *trans* el dominio necesario para una asociación eficiente con la membrana plasmática. En su conjunto, estos estudios indican que el reemplazo del dominio MA de Gag de SIV por la región equivalente de FIV interfiere con la asociación de Gag con la membrana, y en consecuencia con el ensamblado, pero este defecto puede ser revertido generando en la quimera SIV(MA_{FIV1-130}) un dominio de unión a membrana similar al de la MA de SIV o proveyendo este dominio en *trans* a través de la coexpresión de la proteína Gag de SIV. Es interesante mencionar que al sustituir el dominio MA del precursor Gag de MuLV por el de HIV-1, se produce una distribución celular anormal del precursor Gag quimérico, lo que resulta a su vez en una inhibición del proceso de ensamblado de

viriones (Deminie & Emerman, 1994).

La posibilidad de que el fenotipo deficiente en el ensamblado exhibido por el virus SIV(MA_{FIV1-130}) pueda deberse a que la proteína Gag quimérica adopta una conformación incompatible con las interacciones moleculares que conducen al ensamblado parece poco probable, ya que: (1) el precursor Gag quimérico es procesado eficientemente por la proteasa viral, lo que refleja una estructura de Gag en la que los sitios de procesamiento se encuentran adecuadamente expuestos y accesibles a la proteasa viral; (2) el precursor quimérico Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130})-Pol es capaz de generar una proteasa activa lo que indica que este precursor adopta la conformación necesaria para la activación de la PR; y (3) la proteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) establece interacciones intermoleculares con Gag salvaje, como lo demuestran los experimentos de coexpresión.

La incapacidad de formar partículas del virus quimérico SIV(MA_{FIV1-130}) contrasta con la eficiente producción de viriones por parte de los otros dos virus quiméricos generados, SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}). En el caso de la quimera SIV(MA_{FIV37-130}), ésta posee el dominio amino terminal de unión a membrana de la MA de SIV, mientras que el resto de la molécula corresponde a la MA de FIV. El hecho de que esta quimera sea competente en el ensamblado demuestra que las porciones central y carboxilo de la MA de FIV son funcionalmente compatibles con las interacciones que conducen a la morfogénesis viral. El fenotipo de ensamblado de la quimera SIV(MA_{FIV1-36}), que contiene en el contexto de Gag de SIV, solamente la región amino de la MA de FIV, es particularmente interesante. En efecto, el dominio básico de la MA de FIV sería aquí aparentemente suficiente para mediar la interacción del precursor Gag quimérico con la membrana. Cómo conciliar entonces la capacidad de formar partículas de la quimera SIV(MA_{FIV1-36}) con el defecto en el ensamblado exhibido por el virus SIV(MA_{FIV1-130})? Una explicación es que en el caso de la quimera SIV(MA_{FIV1-36}) se genera un dominio de unión a membrana entre los residuos de lisina aportados por la región de la MA de FIV presente en la quimera y otros aminoácidos básicos de la MA de SIV. En este sentido, la estructura cristalina de la MA de SIV muestra que la región polibásica amino terminal se halla próxima a residuos básicos de la región carboxilo (residuos 93, 95 y 96) y que ambas regiones se hallan expuestas en la superficie de los trímeros (Rao *et al.*, 1995). Se ha propuesto que esta región del extremo carboxilo podría contribuir a la asociación de la MA con la membrana (Hill *et al.*, 1996).

A pesar de que los provirus quiméricos SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) dirigen eficientemente el ensamblado de partículas, los viriones resultantes son pobremente infectivos. Esta falta de infectividad, se debe al menos en parte a que los viriones incorporan en forma muy ineficiente la glicoproteína viral Env. Nuestro laboratorio ha demostrado que en SIV la incorporación de la glicoproteína Env a viriones es mediada por interacciones entre el dominio MA de Gag y el dominio citoplasmático de la subunidad TM de Env (Celma *et al.*, 2001; Manrique *et al.*, 2001; 2003). Los dominios MA quiméricos de los viriones SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) no son entonces capaces de establecer las interacciones necesarias para la asociación de Env con los viriones. Se han presentado evidencias en HIV-1 sugiriendo que la proteína MA cumple también funciones durante las primeras etapas del ciclo de replicación viral (Bukrinsky *et al.*, 1992; 1993; Yu *et al.*, 1992). Si bien el rol que cumple la MA de SIV en etapas posteriores a la entrada viral no ha sido estudiado aún, cabría la posibilidad que las proteínas MA quiméricas derivadas de los virus SIV(MA_{FIV1-36}) y SIV(MA_{FIV37-130}) no puedan participar de los procesos tempranos del ciclo viral, lo que contribuiría también a explicar la escasa infectividad de estos virus quiméricos.

Para completar los estudios de la relación funcional entre las proteínas MA de FIV y SIV, se generó un provirus quimérico derivado de FIV conteniendo el dominio MA de SIV. En este caso, el provirus resultante dirigió en células felinas la producción de partículas virales en niveles similares a los de FIV salvaje. Además, este virus FIV quimérico es capaz de replicarse en células T felinas con una cinética de replicación similar a la exhibida por el virus salvaje. Estos resultados indican que la MA de SIV es funcionalmente activa en el contexto de la proteína Gag de FIV. Esto contrasta con la situación inversa (virus SIV[MA_{FIV1-130}]) descrita en esta tesis; esto es, el dominio MA de FIV no puede reemplazar funcionalmente al de SIV.

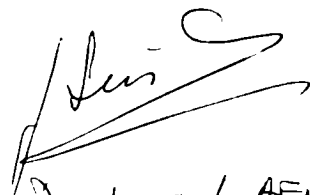
La identificación de dominios funcionales en la MA de FIV junto con la caracterización de virus quiméricos derivados de FIV y SIV presentadas en esta tesis contribuyen al conocimiento sobre la relación estructural y funcional entre las proteínas MA de lentivirus evolutivamente distantes. Esta información es particularmente relevante teniendo en cuenta que FIV es utilizado no sólo como modelo para las infecciones causadas por HIV-1 en humanos sino también en estudios de terapia génica en los que se emplean vectores derivados del genoma de FIV para transducir células humanas.

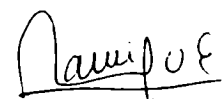
CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta tesis permiten concluir que:

- La expresión de la poliproteína Gag de FIV en células de mamíferos utilizando el sistema recombinante del virus vaccinia resulta en el ensamblado en la membrana plasmática de partículas con morfología lentiviral que son liberadas por brotación al medio extracelular. Por lo tanto, el sistema del virus vaccinia puede ser utilizado para recrear el ensamblado de FIV y estudiar la contribución de los diferentes dominios de Gag a la morfogénesis viral.
- La mutagénesis dirigida del dominio MA de la poliproteína Gag de FIV demuestra que la MA participa del transporte de Gag a la membrana plasmática y del ensamblado de Gag en partículas virales. En este sentido, a pesar que la MA de FIV exhibe escasa homología con las de los virus de primates HIV y SIV, ésta cumple un rol similar en la morfogénesis viral.
- El reemplazo del dominio MA de la poliproteína Gag de SIV por el de FIV (quimera SIV[MA_{FIV1-130}]) interfiere con el ensamblado de Gag en viriones. Este defecto se debe a la incapacidad de la proteína Gag quimérica de asociarse en forma eficiente y/o estable con la membrana plasmática. Este fenotipo defectivo de la poliproteína Gag quimérica es revertido al transformar la región básica del extremo amino de la MA de FIV en una región con mayor carga neta positiva similar a la de la MA de SIV. Por otro lado, la coexpresión de la poliproteína quimérica Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) con la proteína Gag salvaje de SIV resulta en el reclutamiento de la proteína Gag quimérica en viriones. Esto indica que la proteína Gag salvaje es capaz de proveer en *trans* la región de asociación con la membrana y que la poliproteína Gag_{SIV}(MA_{FIV1-130}) mantiene la capacidad de interaccionar y oligomerizarse con Gag salvaje.
- Reemplazos parciales de los dominios MA de Gag de SIV por regiones equivalentes de la MA de FIV resultan en proteínas Gag quiméricas que son capaces de ensamblarse en viriones. Sin embargo, estos viriones no son infectivos ya que no incorporan eficientemente la glicoproteína viral Env.
- El virus quimérico derivado de FIV conteniendo la MA de SIV es capaz de dirigir la formación de viriones que se replican eficientemente en una línea linfoidea felina. Esto demuestra que en el genoma de FIV el dominio MA puede ser reemplazado funcionalmente por su equivalente de SIV.

Los estudios aquí descritos contribuyen al conocimiento de los mecanismos de ensamblado de los lentivirus de animales no primates y permiten establecer la relación estructural y funcional existente entre los dominios MA de lentivirus evolutivamente distantes.


Dr. JOSE L. AFFRANCINO


LIC. MARIANA BRANQUIE

REFERENCIAS

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 the RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *Journal of Virology* 64, 1920-1926.

Baltimore D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.

Beebe A. M., Dua N., Faith T. G., Moore P. F., Pedersen N. C. & Dandekar S. 1994. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *Journal of Virology* 68, 3080-3091.

Bendinelli M., Pistello M., Lombardi S., Poli A., Garzelli C., Matteucci D., Ceccherini-Nelli L., Malvaldi G. & Tozzini F. 1995. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 87-112.

Bryant M. & Ratner L. 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 523-527.

Bukrinsky M. I., Haggerty S., Dempsey M. P., Sharova N., Adzhubei A., Spitz L., Goldfarb D., Emerman M. & Stevenson M. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669.

Bukrinsky M. I., Sharova N., Dempsey M. P., Stanwick T. L., Bukrinskaya A. G., Haggerty S. & Stevenson M. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 6580-6584.

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 the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *Journal of Virology* 73, 8527-8540.

Callanan J. J., Hosie M. J. & Jarrett O. 1991. Transmission of feline immunodeficiency virus from mother to kitten. *The Veterinary Record* 128, 332-333.

Carter C. A. 2002. Tsg 101: HIV- 1's ticket to ride. *Trends in Microbiology* 10, 203-205.

Celma C. C. P, Manrique J. M., Affranchino J. L., Hunter E. & González S. A. 2001. Domains in the simian immunodeficiency virus gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into particles. *Virology* 283, 253-261.

Chazal N., Gay B., Carrière C., Tournier J. & Boulanger P. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 MA deletion mutants expressed in baculovirus-infected cells: *cis* and *trans* effects on the Gag precursor assembly pathway. *Journal of Virology* 69, 365-375.

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

Clements J. E. & Wong-Staal F. 1992. Molecular biology of lentiviruses. *Seminars in Virology* 3, 137-146.

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* (ed. B.N. Fields *et al.*). Raven Press, New York, pp. 1767–1848.

-
- Collins K. L. & Baltimore D. 1999. HIV's evasion of the cellular immune response. *Immunology Reviews* 168, 65-74.
- Conte M. R. & Matthews S. 1998. Retroviral matrix proteins: a structural perspective. *Virology* 246, 191-198.
- Craigie R., Fujiwara T. & Bushman F. 1990. The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro. *Cell* 62, 829-837.
- Cullen B. R. & Greene W. C. 1990. Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 178, 1-5.
- Davis J. L. & Clements J. E. 1989. Characterization of cDNA clone encoding the visna transactivating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 414-418.
- Davison A. J. & Moss B. 1990. New vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. *Nucleic Acids Research* 18, 4285-4286.
- Delchambre M., Gheysen D., Thinès 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. *The EMBO Journal* 8, 2653-2660.
- Deminie C. A. & Emerman M. 1994. Functional exchange of an oncoretrovirus and lentivirus matrix protein. *Journal of Virology* 68, 4442-4449.
- de Parseval A. & Elder J. H. 1999. Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial Rev activity. *Journal of Virology* 73, 608-617.
- Desrosiers R. C. 1990. The simian immunodeficiency viruses. *Annual Review of Immunology* 8, 557-578.

- Dewhurst S., Embretson J. E., Anderson D. C., Mullins J. I. & Fultz P. N. 1990. Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIV_{smm} PBj14. *Nature* 345, 636-640.
- Doolittle R. F., Feng D. F., Johnson M. S. & Mc Clure M. A. 1989. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *The Quarterly Review of Biology* 64, 1-30.
- Dorfman T., Bukovsky A., Ohagen A., Höglund S. & Göttlinger H. G. 1994. Functional domain of the capsid protein of the human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 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. *Journal of Virology* 67, 6159-6169.
- Douglas N. M., Munro G. H. & Daniels R. S. I. 1997. HIV/SIV glycoproteins: structure-function relationships. *Journal of Molecular Biology* 273, 122-149.
- Ebbets-Reed D., Scarlata S. & Carter C. A. 1996. The major homology region of the HIV-1 Gag precursor influences membrane affinity. *Biochemistry* 35, 14268-14275.
- Elder J. H., Lerner D. A., Hasselkus-Light C. S., Fontenot D. J., Hunter E., Luciw P. A., Montelaro R. C. & Phillips T. R. 1992. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *Journal of Virology* 66, 1791-1794.
- Elder J. H., Schnölzer M., Hasselkus-Light C. S., Henson M., Lerner D. A., Phillips T. R., Wagaman P. C. & Kent S. B. 1993. Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyprotein of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 67, 1869-1876.
- Emerman M. & Malim M. H. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280, 1880-1884.

- Emerman M., Vazeux R. & Peden K. 1989. The *rev* gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* 57, 1155-1165.
- Engelman A., Mizuuchi K. & Craigie R. 1991. HIV-1 DNA integration: Mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67, 1211-1221.
- English R. V., Johnson C. M., Gebhard D. H. & Tompkins M. B. 1993. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 67, 5175-5186.
- 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
- Freed E. O. 1998. HIV-1 Gag protein: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1-15.
- Freed E. O. 2002. Viral late domains. *Journal of Virology* 76, 4679-4687.
- 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. *Journal of Virology* 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. *Journal of Virology* 68, 5311-5320.
- Frey S. C. S., Hoover E. A. & Mullins J. I. 2001. Feline immunodeficiency virus cell entry. *Journal of Virology* 75, 5433-5440.
- Fuchas A., Binzel L. & Lonsdorfer M. 1994. Epidemiology of FeLV and FIV infection in the Federal Republic of Germany. *Tieraerztliches Praxis* 22, 273-277.

Fuller S. D., Wilk T., Gower B. E., Kräusslich H. -G. & Vogt V. M. 1997. Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Current Biology* 7, 729-738.

Gabuzda D. H., Li H., Lawrence K., Vasir B. S., Crawford K. & Langhoff E. 1994. Essential role of vif in establishing productive HIV-1 infection in peripheral blood T lymphocytes and monocyte/macrophages. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 7, 908-915.

Gamble T. R., Vajdos F. F., Yoo S., Worthylake D. K., Houseweart M., Sundquist W. I. & Hill C. P. 1996. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* 87, 1285-1294.

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.

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-1: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5, 617-637.

Gheysen D., Jacobs E., Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thinès D. & De Wilde M. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55^{gag} virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59, 103-112.

Giddings A. M., Ritter G. D. Jr. & Mulligan M. J. 1998. The matrix protein of HIV-1 is not sufficient for assembly and release of virus-like particles. *Virology* 248, 108-116.

Gilboa E., Mitra S. W., Goff S. & Baltimore D. 1979. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* 18, 93-100.

- Goff S. P. 2001. The retroviridae and their replication. En: *Fields Virology* (ed. D. M. Knipe & P. M. Howley) Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia, E.E.U.U., 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., Gelderblom H. R. & Burny A. 1993. Assembly of 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. *Journal of Virology* 70, 6384-6389.
- Göttlinger H. G., Dorfman T., Sodroski J. G. & Haseltine W. A. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 3195-3199.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 5781-5785.
- Grattinger M., Hohenberg H., Thomas D., Wilk T., Muller B. & Kräusslich H. -G. 1999. In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* 257, 247-260.

Hammarskjöld M. L. 1997. Regulation of retroviral RNA export. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 8, 83-90.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

Heinzinger N. K., Bukrinsky 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 7311-7315.

Henderson L. E., Bowers M. A., Sowder R. C. 2nd, Serabyn S. A., Johnson D. G., Bess J. W. Jr., Arthur L. O., Bryant D. K. & Fenselau C. 1992. Gag protein of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *Journal of Virology* 66, 1856-1865.

Hess J. L., Small J. A. & Clements J. E. 1989. Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral *trans*-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and *trans*-activation. *Journal of Virology* 63, 3001-3015

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 3099-3104.

Hohdatsu T., Yamazaki A., Yamada M., Kusuvara H., Kaneshima T. & Koyama H. 2003. Ability of CD8(+) T cell anti-feline immunodeficiency virus activity correlated with peripheral CD4(+) T cell counts and plasma viremia. *Microbiology and Immunology* 47, 765-773.

Holmes D. S. & Quigley M. 1981. A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114, 193-197.

Hong S. S. & Boulanger P. 1993. Assembly-defective point mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor phenotypically expressed in recombinant baculovirus-infected cells. *Journal of Virology* 67, 2787-2798.

Hosie M. J., Robertson C. & Jarrett O. 1989. Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in United Kingdom. *The Veterinary Record* 125, 293-297.

Hu S. -L., Travis B. M., Garrigues J., Zarlring 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.

Hughes S. H., Toyoshima K., Bishop J. M. & Varmus H. E. 1981. Organization of the endogenous proviruses of chickens: implications of origin and expression. *Virology* 108, 189-207.

Hunter E. 1994. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Seminars in Virology* 5, 71-83.

Hunter E. & Swanstrom R. 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 157, 187-253.

Ishida T. & Tomoda I. 1990. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 52, 645-648.

Ishida T., Washizu T., Toriyabe K., Motoyoshi S., Tomoda I & Pedersen N. C. 1989. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *Journal of the American Veterinary Association* 194, 221-225.

Jewell N. A. & Mansky L. M. 2000. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *Journal of General Virology* 81, 1889-1899.

Jones K. A., Kadonaga J. T., Luciw P. A. & Tijan R. 1986. Activation of AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, SP1. *Science* 232, 755-759.

Jones K. A. & Peterlin B. M. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annual Review of Biochemistry* 63, 717-743

Kakker N. K., Mikhailov M. V., Nermut M. V., Burny A. & Roy P. 1999. Bovine leukemia virus Gag particle assembly in insect cells: formation of chimeric particles by domain-switched leukemia/lentivirus Gag polyprotein. *Virology* 265, 308-318.

Kalinski H., Mashiah P., Rotem D., Orzech Y., Sherman L., Miki T., Yaniv A., Gazit A. & Tronick S. R. 1994. Characterization of cDNA species encoding the Tat protein of caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 204, 828-834.

Karacostas V., Nagashima K., Gonda M. A. & Moss B. 1989. Human immunodeficiency virus-like particles produced by a vaccinia virus expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 8964-8967.

Katz R.A. & Skalka A. M. 1994. The retroviral enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 63, 133-173.

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 beta-galactosidase gene. *Journal of Virology* 66, 2232-2239.

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

Lafrado L. J., Podell M., Krakowka S., Hayes K. A., Hanlon M. A. & Mathes L. E. 1993. FIV: a model for retrovirus-induced pathogenesis. *AIDS Research Reviews* 3, 115-150.

Le Blanc I., Rosenberg A. R. & Dokh elar M.-C. 1999. Multiple functions for the basic amino acids of the human T-cell leukemia virus type 1 matrix protein in viral transmission. *Journal of Virology* 73, 1860-1867.

Le Grice S. F., Naas T., Wohlgensinger B. & Schatz O. 1991. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *The EMBO Journal* 10, 3905-3911.

Lewis P. F. & Emerman M. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 68, 510-516.

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 G.X., Sharmeen L. & Taylor J. 1990. Specificities involved in the initiation of retroviral plus-strand DNA. *Journal of Virology* 64, 592-597.

Majors J. E. & Varmus H. E. 1981. Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumour virus. *Nature* 289, 253-258.

Malim M. H., Hauber J., Le S. Y., Maizel J. V. & Cullen B. R. 1989. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.

Mammano F., Ohagen A., H oglund S. & G ottlinger H. G. 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *Journal of Virology* 68, 4927-4936.

Manrique J. M., Celma C. C. P., Affranchino J. L., Hunter E. & Gonz alez S. A. 2001. Small variations in the length of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein drastically affect envelope incorporation and virus entry. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 1615-1624.

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. *Journal of Virology* 77, 10881-10888.

Matteucci D., Baldinotti F., Mazzetti P., Pistello M., Bandecchi P., Ghilarducci R., Poli A., Tozzini F. & Bendinelli M. 1993. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 494-501.

Miller A. D. 1992. Retroviral vectors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 158, 1-24.

Moelling K., Bolognesi D. P., Bauer H., Busen W., Plassmann H. W. & Hausen P. 1971. Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids. *National News in Biology* 234, 240-243.

Morikawa S. & Bishop D. H. L. 1992. Identification and analysis of the *gag-pol* ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology* 186, 389-397.

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. *Journal of Virology* 74, 16-23.

Murakami T. & Freed E. O. 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *Journal of Virology* 74, 3548-3554.

Olmsted R. A., Barnes A. K., Yamamoto J. K., Hirsch V. M., Purcell R. H. & Johnson P. R. 1989. Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 2448-2452.

Ono A. & Freed E. O. 1999. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *Journal of Virology* 73, 4136-4144.

- Oroszlan S. & Luftig R. B. 1990. Retroviral proteinases. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 157, 153-185.
- Pancino G., Fossati I., Chappey C., Castelot S., Hurtrel B., Moraillon A., Klatzmann D. & Sonigo P. 1993. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 192, 659-662.
- Park J. & Morrow C. D. 1992. The nonmyristylated Pr160^{gag-pol} polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55^{gag} and is incorporated into viruslike particles. *Journal of Virology* 66, 6304-6313.
- Pedersen N. C., Ho E. W., Brown M. L. & Yamamoto J. K. 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235, 790-793.
- Pedersen N. C., Yamamoto J. K., Ishida T., Hansen H. 1989. Feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21, 111-129
- Perrin S. & Gilliland G. 1990. Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic Acids Research* 18, 7433-7438.
- Peters G. & Dahlberg J. E. 1979. RNA-directed DNA synthesis in Moloney murine leukemia virus: interaction between the primer tRNA and the genome RNA. *Journal of Virology* 31, 398-407.
- Phillips T. R., Talbott R. L., Lamont C., Muir S., Lovelace K. & Elder J. H. 1990. Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 64, 4605-4613.
- Poeschla E. M. & Looney D. J. 1998. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodents and feline cells. *Journal of Virology* 72, 6858-6866.

- Puffer B. A., Parent L. J., Wills J. W. & Montelaro R. C. 1997. Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *Journal of Virology* 71, 6541-6546.
- 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.
- Reicin A. S., Ohagen A., Yin L., Höglund S. & Goff S. P. 1996. The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle. *Journal of Virology* 70, 8645-8652.
- Roe T., Reynolds T. C., Yu G. & Brown P.O. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal* 12, 2099-2108
- Saltarelli M., Querat G., Konings D. A., Vigne R. & Clements J. E. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347-364.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5463-5467.
- Shacklett B. L. & Luciw P. A. 1994. Analysis of the *vif* gene of feline immunodeficiency virus. *Virology* 204, 860-867.
- 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.
- Shimajima M., Miyazawa T., Ikeda Y., McMonagle E. L., Haining H., Akashi H., Takeuchi Y., Hosie M. J. & Willett B. J. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303, 1192-1195.
- Sigurdsson B. & Palsson P. A. 1958. Visna of sheep, A slow, demyelinating infection. *British Journal of Experimental Pathology* 39, 519-528.

Simon J. H., Miller D. L., Fouchier R. A., Soares M. A., Peden K. W. & Malim M. H. 1998. The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission. *The EMBO Journal* 17, 1259-1267.

Simon J. H., Southerling T. E., Peterson J. C., Meyer B. E. & Malim M. H. 1995. Complementation of vif defective human immunodeficiency virus type 1 by primate, but not nonprimate, lentivirus vif gene. *Journal of Virology* 69, 4166-4172.

Sodora D. L., Courcille J., Brojatsch J., Berson A., Wang Y.-C., Dow S. W., Hoover E. & Mullins J. I. 1995. Analysis of a feline immunodeficiency provirus reveals patterns of gene sequence conservation distinct from human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses* 11, 531-533.

Sodora D. L., Shpaer E. G., Kitchell B. E., Dow S. W., Hoover E. A. & Mullins J. I. 1994. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) *env* gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *Journal of Virology* 68, 2230-2238.

Sonigo P., Alizon M., Staskus K., Klatzmann D., Cole S., Danos O., Retzel E., Tiollais P., Haase A. & Wain-Hobson S. 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42, 369-382.

Steinman R., Dombrowski J., O'Connor T., Montelaro R. C., Tonelli Q., Lawrence K., Seymour C., Goodness J., Pedersen N. C. & Andersen P. R. 1990. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology* 71, 701-706.

Swanstrom R., Varmus H. E. & Bishop J. M. 1981. The terminal redundancy of the retroviral genome facilitates chain elongation by reverse transcriptase. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 1115-1121.

- Swanstrom R. & Wills J. W. 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. En: *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, H. E. Varmus). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 263-334.
- 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.
- Talbott R. L., Sparger E. E., Lovelace K. M., Fitch W. M., Pedersen N. C., Luciw P. A. & Elder J. H. 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 5743-5747.
- Tautz D. & Renz M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry* 132, 14-19.
- Temin H. M. 1992. Origin and general nature of retroviruses. En: *The Retroviridae* (ed. J. A. Levy). Plenum Press, New York, pp 1-8.
- Temin H. M. & Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Tomonaga K., Miyazawa T., Sakuragi J. I., Mori T., Adachi A. & Mikami T. 1993. The feline immunodeficiency virus ORF-A gene facilitates efficient viral replication in established T-cell lines and peripheral blood lymphocytes. *Journal of Virology* 67, 5889-5895.
- Tomonaga, K., Norimine J., Shin Y. S., Fukasawa M., Miyazawa T., Adachi A., Toyosaki T., Kawaguchi T., Kai C. & Mikami T. 1992. Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *Journal of Virology* 66, 6181-6185.

- Tozzini F., Matteucci D., Bandecchi P., Baldinotti F., Siebelink K. H., Osterhaus A. & Bendinelli M. 1993. Neutralizing antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1626-1629.
- Trinh T., Jessee J. Bloom F. R. 1994. STBL2TM: an *Escherichia coli* strain for the stable propagation of retroviral clones and direct repeat sequences. *FOCUS* 16, 78-80.
- Ueland K. & Nesse L. L. 1992. No evidence of vertical transmission of naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33, 301-308.
- Varmus H. E., Heasley S., Kung H.-J., Oppermann H., Smith V. C., Bishop J. M. & Shank P. R. 1978. Kinetics of synthesis, structure and purification of avian sarcoma virus-specific DNA made in the cytoplasm of acutely infected cells. *Journal of Molecular Biology* 120, 55-82.
- Varmus H. E. 1988. Retroviruses. *Science* 240, 1427-1435.
- Verschoor E. J., Hulskotte E. G., Ederveen J., Koolen M. J. M., Horzinek M. C. & Rottier P. J. M. 1993. Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology* 193, 433-438.
- von Poblitzki A., Wagner R., Niedrig M., Wanner G., Wolf H. & Modrow S. 1993. Identification of a region in Pr55 gag polyprotein essential for HIV-1 particle formation. *Virology* 193, 981-985.
- Wang C. T. & Barklis E. 1993. Assembly, processing and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 Gag mutants. *Journal of Virology* 67, 4264-4273.
- Wieggers K., Rutter G., Schubert U., Grattinger M. & Kräusslich H. -G. 1999. Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* 257, 261-274.

Willey R. L., Maldarelli F., Martin M. A. & Strebel K. 1992a. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology* 66, 7193-7200.

Willey R. L., Maldarelli F., Martin M. A. & Strebel K. 1992b. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *Journal of Virology* 66, 226-34.

Wills J. W. & Craven R. C. 1991. Form, function and use of retroviral Gag proteins. *AIDS* 5, 639-654.

Yamamoto J. K., Hansen H., Ho E. W., Morishita T. Y., Okuda T., Sawa T. R., Nakamura R. M. & Pedersen N. C. 1989. Epidemiological and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of American Veterinary Medical Association* 194, 213-220.

Yu X., Yu Q. C., Lee T.-H. & Essex M. 1992. The C-terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in the early steps of the virus life cycle. *Journal of Virology* 66, 5667-5670.

Yuan B., Campbell S., Bacharach E., Rein A. & Goff S. P. 2000. Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *Journal of Virology* 74, 7250-7260.

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. *Journal of Virology* 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. *Journal of Virology* 68, 2556-2569.

Zhou W. & Resh M. 1996. Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *Journal of Virology* 70, 8540-8548.