

Tesis Doctoral

Caracterización funcional de virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) quiméricos expresando diferentes dominios de la proteína cápside del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)

Esteva, María Jimena

2016-12-12

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

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

Cita tipo APA:

Esteva, María Jimena. (2016-12-12). Caracterización funcional de virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) quiméricos expresando diferentes dominios de la proteína cápside del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Esteva, María Jimena. "Caracterización funcional de virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) quiméricos expresando diferentes dominios de la proteína cápside del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-12.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Caracterización funcional de virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) quiméricos expresando diferentes dominios de la proteína cápside del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)

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

Autor: Lic. María Jimena Esteva

Director de tesis: Dra. Silvia A. González

Consejero de estudios: Dra. Nélide Candurra

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano (UB)

Buenos Aires, 2016

Caracterización funcional de virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) quiméricos expresando diferentes dominios de la proteína cápside del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)

La formación de partículas lentivirales resulta de la multimerización de la poliproteína Gag, la cual contiene toda la información necesaria para autoensamblarse y brotar al medio extracelular a través de la membrana plasmática. Durante la maduración de los viriones, la proteína cápside (CA), que corresponde al dominio central de Gag, se condensa generando el *core* viral que preserva la integridad del complejo ribonucleoproteico requerido para iniciar un nuevo ciclo de replicación viral.

Los virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y de felinos (FIV) son dos lentivirus evolutivamente distantes cuyas proteínas CA no han sido aún estudiadas. Con el objeto de establecer la relación funcional entre los dominios CA de SIV y de FIV, construimos SIV quiméricos en los cuales la región codificante para la CA fue parcial o totalmente reemplazada por su equivalente de la CA de FIV. La caracterización fenotípica de las quimeras nos permitió agruparlas en tres categorías: un grupo formado por virus quiméricos capaces de ensamblarse en viriones, pero cuya maduración causa la inestabilidad de la CA de FIV; un segundo grupo representado únicamente por el SIV quimérico llevando el dominio N-terminal (NTD) de la CA de FIV y que exhibe un fenotipo de ensamblado defectivo; y un tercer grupo formado por los virus quiméricos que se ensamblan en viriones exhibiendo una CA de FIV madura estable, que incorporan la glicoproteína de envoltura, y que contienen niveles salvajes del ARN genómico viral y de la transcriptasa reversa. Sin embargo, este último grupo de SIV quiméricos resultó ser no infeccioso debido a defectos en alguna etapa posterior a la entrada viral. Por otra parte, demostramos que el dominio C-terminal (CTD) de la CA de FIV presenta la capacidad intrínseca de dimerizar *in vitro* y de formar oligómeros de alto peso molecular. Esto, junto con nuestros resultados que muestran que el CTD de la CA de FIV es suficiente para el ensamblado de la poliproteína quimérica Gag de SIV, provee evidencia de que el CTD de la CA

exhibe mayor plasticidad funcional que el NTD. En su conjunto, nuestros resultados aportan información relevante sobre la homología funcional entre los dominios CA de las poliproteínas Gag de los lentivirus de primates y de no primates y contribuyen a nuestro conocimiento sobre cómo han evolucionado los requerimientos para el ensamblado de viriones infecciosos en los retrovirus.

Palabras clave

Virus de la inmunodeficiencia de simios; Virus de la inmunodeficiencia de felinos; Ensamblado de lentivirus; Poliproteína Gag; Proteína cápside; Lentivirus quiméricos; Replicación de lentivirus.

Functional characterization of chimeric simian immunodeficiency viruses (SIV) expressing different domains of the feline immunodeficiency virus (FIV) capsid protein

The formation of lentiviral particles results from the multimerization of the Gag polyprotein, which contains all the information necessary for its self-assembly and budding into the extracellular medium. During virion maturation, the capsid (CA) protein, which corresponds to the central domain of Gag, generates the core structure that preserves the integrity of the ribonucleoprotein complex required to initiate a new round of viral replication.

The simian and feline immunodeficiency viruses (SIV and FIV, respectively) are two evolutionarily distant lentiviruses whose CA proteins have not as yet been studied. To gain insight into the functional relationship between the SIV and FIV CA domains, we constructed chimeric SIVs in which the CA-coding region was partially or totally replaced by the equivalent region of the FIV CA. The phenotypic characterization of the chimeras allowed us to group them into three categories: the chimeric viruses that, while being assembly-competent, exhibit a virion-associated unstable FIV CA; a second group represented only by the chimeric SIV carrying the N-terminal domain (NTD) of the FIV CA which proved to be assembly-defective; and a third group constituted by the chimeric viruses that produce virions exhibiting a mature and stable FIV CA protein, and which incorporate the envelope glycoprotein and contain wild-type levels of viral genome RNA and reverse transcriptase. However, further analysis of the latter group of chimeric SIVs demonstrated that they are non-infectious due to a post-entry impairment. Furthermore, we show that the carboxyl-terminus domain (CTD) of the FIV CA has an intrinsic ability to dimerize *in vitro* and form high-molecular-weight oligomers, which, together with our finding that the FIV CA-CTD is sufficient to confer assembly competence to the resulting chimeric SIV Gag polyprotein, indicates that the CA-CTD exhibits more functional plasticity than the CA-NTD. Taken together, our results provide relevant information on the functional homology between the CA domains of primate and nonprimate lentiviral Gag polyproteins and contribute

to our understanding of how the requirements for the assembly of infectious virions have evolved among retroviruses.

Keywords

Simian immunodeficiency virus; Feline immunodeficiency virus; Lentiviral assembly; Gag polyprotein; Capsid protein; Chimeric lentiviruses; Lentivirus replication.

A Silvia.

A Catalina.

A la Dra. Silvia A. González y al Dr. José Luis Affranchino, por haber confiado en mi capacidad de trabajo y haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de Tesis Doctoral en el laboratorio. Por su paciencia y predisposición para transmitirme sus vastos conocimientos y contribuir a mi formación profesional.

Al CONICET por otorgarme las Becas tipo I y tipo II que permitieron mi dedicación exclusiva al desarrollo de la tesis doctoral. A la Agencia de Ciencia y Tecnología junto al CONICET, quienes financiaron el desarrollo experimental de este trabajo a través de los subsidios otorgados.

A Juan, mi compañero de mesada y de la vida, por su amor e infinita paciencia. El mejor proyecto es siempre con vos, juntos a la par.

A mi familia, por alentarme a continuar mi desarrollo académico y profesional. Por estar siempre presente en cada etapa del camino.

A Poli y Fio, por los memorables momentos vividos en el labo.

A mis amigos, porque con ustedes la vida tiene más color.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral fueron publicados como se detalla a continuación:

"Lentiviral Gag assembly analyzed through the functional characterization of chimeric simian immunodeficiency viruses expressing different domains of the feline immunodeficiency virus capsid protein"

María Jimena Esteva, Jose Luis Affranchino, Silvia Adriana González

PLoS One (2014) **9**:e114299.

Índice

ABREVIATURAS	p.1
INTRODUCCIÓN	
1. Virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV)	p.2
1.1. Generalidades	p.2
1.2. Organización genómica	p.4
1.2.1. Proteínas estructurales y enzimas virales	p.4
1.2.2. Proteínas regulatorias y accesorias de SIV	p.6
2. Virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)	p.9
2.1. Generalidades	p.9
2.2. Organización genómica	p.12
2.2.1. Proteínas regulatorias y accesorias de FIV	p.13
3. Ciclo de replicación de los SIV y FIV	p.14
3.1. Entrada viral y desnudamiento	p.14
3.2. Transcripción reversa	p.18
3.3. Mecanismos tempranos de restricción celular	p.19
3.4. Importación del PIC al núcleo e integración del ADNc viral al genoma celular	p.21
3.5. Expresión génica viral y exportación de los ARNm al citoplasma	p.22
3.6. Ensamblado de las partículas virales y empaquetamiento del ARN genómico viral	p.23
3.7. Factores celulares de restricción tardía	p.24
4. Formación de los viriones maduros infectivos	p.25
4.1. La poliproteína Gag	p.25
4.2. La proteína matriz	p.26
4.3. La proteína cápside	p.27
4.4. La proteína nucleocápside	p.29
4.5. Dominio carboxilo de las poliproteínas Gag de HIV, SIV y FIV	p.30
OBJETIVOS	p.32
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Células y virus	p.34
2. Sueros y anticuerpos	p.34
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	p.34
4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	p.35

5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	p.35
6. Reacciones de ligación	p.36
7. Transformación de bacterias competentes	p.36
8. Purificación de ADN plasmídico	p.37
9. Transfecciones	p.37
10. Construcciones de ADNs provirales quiméricos	p.38
11. Preparación de lisados celulares y purificación de partículas virales	p.41
12. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	p.41
13. Ensayos de Western blot	p.41
14. Ensayos de actividad de RT	p.42
15. Ensayo de replicación viral en células 293T	p.42
16. Aislamiento de ADN y detección de intermediarios de la replicación viral (forma circular 1-LTR)	p.43
17. Ensayo de infectividad en células indicadoras TZM-bl	p.44
18. Empaquetamiento de ARN genómico viral en viriones	p.44
19. Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes derivadas de la CA de FIV	p.45
20. Reacciones de ensamblado <i>in vitro</i>	p.46
21. Análisis de las proteínas recombinantes derivadas de la CA de FIV por electroforesis en geles nativos	p.47

RESULTADOS

1. Construcción de ADNs provirales de SIV llevando distintas regiones del dominio CA de FIV	p.48
2. Caracterización fenotípica del virus quimérico SIV _{FIV CA}	p.51
3. Fenotipo del virus quimérico SIV _{FIV CA-p1}	p.51
4. Capacidad de ensamblado del virus quimérico SIV _{FIV CA-p1-NC(1-9)}	p.55
5. Infectividad, actividad de transcriptasa reversa y contenido de ARN de los viriones SIV _{FIV CA-p1-NC(1-9)}	p.55
6. Análisis de la capacidad de replicación de la quimera SIV _{FIV CA-p1-NC(1-9)} en células no restrictivas	p.59
7. Reemplazo en Gag de SIV del dominio N-terminal o C-terminal de la CA por las regiones equivalentes de la proteína CA de FIV	p.60
8. Capacidad de oligomerización del dominio C-terminal de la CA de FIV	p.65

DISCUSIÓN	p.69
CONCLUSIONES	p.73
REFERENCIAS	p.75

CA	proteína viral cápside
CTD	dominio carboxilo terminal
DU	enzima viral desoxiuridina pirofosfatasa
Env	glicoproteína viral de envoltura
HRP	peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
IN	enzima viral integrasa
LTR	repetición terminal larga
MA	proteína viral matriz
MHR	región de principal homología (presente en el dominio CA de Gag)
NC	proteína viral nucleocápside
nt	nucleótidos
NTD	dominio amino terminal
PIC	complejo viral de preintegración
PR	enzima viral proteasa
RRE	elemento que responde a Rev
RTC	complejo viral de transcripción reversa
SU	subunidad de superficie de la glicoproteína viral Env de los retrovirus
TM	subunidad transmembrana de la glicoproteína Env de los retrovirus
VSV-G	glicoproteína G de envoltura del virus de la estomatitis vesicular

Introducción

1. Virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV)

1.1. Generalidades

Los SIV pertenecen al género *Lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae*. El genoma de esta familia de virus consiste de dos moléculas idénticas de ARN lineal, simple cadena y de polaridad positiva, cada una de las cuales presenta la modificación por 7-metilguanosina trifosfato (*cap*) en el extremo 5' y la señal de poliadenilación en el 3', características exclusivas de los ARN mensajeros (ARNm) eucariotas. Los viriones poseen un diámetro de aproximadamente 100 nm. En ellos, el ARN genómico viral se asocia a la proteína nucleocápside (NC) formando un complejo ubicado dentro del *core*, constituido a su vez por la proteína cápside (CA), junto con las enzimas virales que cumplen roles catalíticos durante la replicación viral. La forma cónica del *core* viral es una característica distintiva del género lentiviral. Este *core* se encuentra rodeado por una cubierta proteica esférica compuesta por la proteína matriz (MA), la cual a su vez está recubierta por una bicapa lipídica de origen celular en la cual se hallan insertos los trimeros de la glicoproteína viral de envoltura (Env) (Goff, 2007). Los lentivirus son retrovirus complejos con una morfología del virión única y exhiben además ciertas características propias como el tropismo por macrófagos, la capacidad de infectar células que no se encuentran en división celular, y una lenta progresión de la enfermedad (Goff, 2007). Los genomas lentivirales poseen numerosos genes accesorios y regulatorios además de *gag*, *pol* y *env* que codifican para los componentes estructurales y enzimáticos del virión (Figura 1). Estos virus causan infecciones persistentes crónicas en diferentes especies de mamíferos, incluyendo bovinos, equinos, caprinos, felinos y primates. El ejemplo más paradigmático de la familia lentiviral son los virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV), pero entre los virus de este género de animales que no son primates se encuentran el virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV), el virus de la artritis y encefalitis caprina (CAEV) y el virus del Maedi-Visna, entre otros.

SIV, inicialmente denominado virus T-linfotrópico de simios tipo III (STLV-III), fue aislado por primera vez en la década del 80 del siglo XX a partir de monos macacos que presentaban síntomas de inmunodeficiencia o de linfoma (Daniel *et al.*, 1985). Las infecciones con SIV sólo han sido encontradas en monos y simios

africanos, y los SIV se denominan de acuerdo a la especie de primate de la cual fueron aislados.

Los SIV se replican principalmente en células T CD4⁺ CCR5⁺ que constituyen la población celular de memoria (Li *et al.*, 2005). Estas células predominan en el tracto gastrointestinal, en otras mucosas, y se encuentran presentes en los órganos linfoides periféricos en menor proporción. Las infecciones naturales con SIV son frecuentes en la vida silvestre e involucran a más de 40 especies de primates africanos (VandeWoude & Apetrei, 2006). Éstas son típicamente no patogénicas y representan una adaptación evolutiva que permite la coexistencia de SIV con el sistema inmune del primate hospedador. Las infecciones naturales y las patogénicas con SIV comparten las características de presentar una fase aguda y una fase crónica y de generar una respuesta inmune humoral y celular específica para SIV que no alcanza sin embargo a suprimir completamente la replicación viral (Dunham *et al.*, 2006). Pero la infección natural con SIV presenta características propias que la distinguen de la patogénica, entre las que se encuentran el curso clínico benigno y ausencia de inmunodeficiencia, la transmisión vertical poco frecuente, el mantenimiento de niveles normales de células T CD4⁺ de memoria central, la ausencia de activación inmune crónica y la preservación de la inmunidad de mucosas (Broussard *et al.*, 2001; Picker, 2006).

Se ha establecido que SIV, naturalmente originario de monos africanos, fue transmitido a humanos dando origen a los virus HIV tipo 1 y tipo 2 (para una revisión del tema, ver Sharp & Hahn, 2011). Los HIV-1 comprenden cuatro linajes distintivos denominados grupos M, N, O y P; cada uno de los cuales resultó de un evento independiente de transmisión de simios a humanos. El grupo M (*Main*) fue el primero en ser descubierto y representa la forma pandémica de HIV-1, infectando a millones de personas y distribuyéndose virtualmente en todos los países a nivel global (Sharp & Hahn, 2011). El grupo O (*Outlier*) fue descubierto en 1990 y es menos prevalente que el grupo M (De Leys *et al.*, 1990; Gürtler *et al.*, 1994). En efecto, este grupo representa menos del 1% de las infecciones globales por HIV-1, y está mayoritariamente restringido a Camerún, Gabón y los países vecinos (Mauclère *et al.*, 1997; Peeters *et al.*, 1997). El grupo N (*Non-M, Non-O*) fue identificado en 1998 y es menos prevalente que el grupo O (Simon *et*

al., 1998). De hecho, sólo se han documentado hasta el momento 13 casos de infecciones por el grupo N de HIV-1, todos en individuos de Camerún (Vallari *et al.*, 2010). Finalmente, el grupo P (*Pending the identification of further human cases*) fue descubierto en 2009 en una mujer de Camerún viviendo en Francia (Plantier *et al.*, 2009). Los grupos M y N de HIV-1 se originaron por eventos de transmisión de los SIVs de chimpancé SIV_{cpz} a humanos (Keele *et al.*, 2006; Sharp & Hahn, 2011), mientras que el grupo O se originó por transmisión del SIV de gorila SIV_{gor} (Sharp & Hahn, 2011; Van Heuverswyn *et al.*, 2006). Del mismo modo, HIV-2 resulta de la transmisión entre especies de SIV_{SMM} a humanos (VandeWoude & Apetrei, 2006).

Debido a la capacidad de SIV de causar en una especie de primate diferente a la de su hospedador natural un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA en humanos, la infección de macacos con SIV se convirtió en el modelo animal de elección para el desarrollo de drogas antirretrovirales y para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de vacunas contra HIV-1 (Van Rompay, 2010).

1.2. Organización genómica

1.2.1. Proteínas estructurales y enzimas virales

Los genomas retrovirales contienen tres grandes marcos de lectura abiertos (ORFs) que constituyen su repertorio estructural y enzimático: *gag*, *pol* y *env* (en dirección 5'→3' del genoma) (Figura 1). Estos tres ORFs codifican para la poliproteína estructural Gag, cuya multimerización resulta en la formación de la partícula viral; la poliproteína Pol, cuyo procesamiento genera las enzimas virales transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR); y la glicoproteína de envoltura (Env) la cual se distribuye en la superficie del virión para mediar la entrada del virus a sus células blanco (Goff, 2007). Los extremos del ADN proviral están formados por secuencias terminales largas (*Long Terminal Repeats*, LTR), las cuales, en el contexto del genoma proviral integrado, regulan la transcripción viral (Guntaka, 1993). Cada LTR está formada por tres regiones: (i) la región U3, constituida por secuencias no codificantes que incluyen elementos promotores y potenciadores de la ARN polimerasa II, activos en el contexto 5'; (ii) la región R,

conformada por secuencias repetidas y la señal de poliadenilación, activa únicamente como componente de la LTR 3'; y (iii) la región U5, que incluye a los sitios *att* (por *attachment*) requeridos para la integración del ADN copia genómico viral en el genoma celular. Además de los ORFs para las proteínas estructurales y enzimas virales, los lentivirus poseen genes regulatorios y auxiliares presentes únicamente en los retrovirus complejos (Figura 1; Coffin, 1992).

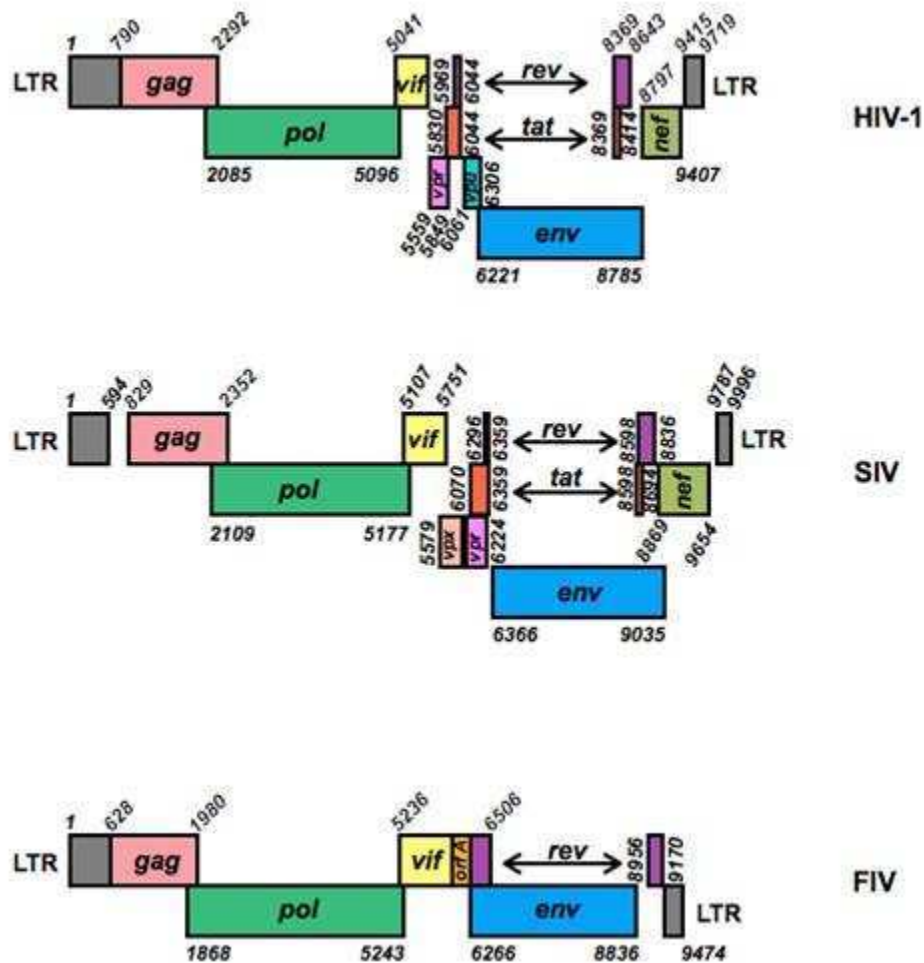


Figura 1. Esquema comparativo de la organización genómica de HIV-1 (clon molecular NL4.3); SIV (clon molecular SIV_{SMM-PBJ}); y FIV (clon molecular Petaluma FIV-14). Los números indican las posiciones nucleotídicas en los genomas virales.

1.2.2. Proteínas regulatorias y accesorias de SIV

Las proteínas regulatorias y accesorias constituyen elementos importantes del genoma lentiviral que diferencian a este grupo de los retrovirus simples (Figura 1). Estos factores regulan la replicación y modulan la infectividad lentiviral (Clements & Payne, 1994).

- **Tat**

La transcripción génica de HIV y SIV es iniciada por la unión de factores celulares al promotor LTR 5' del genoma viral, lo que conduce a la síntesis de bajos niveles de transcritos virales multiprocesados que son sin embargo suficientes para la expresión de la proteína transactivadora Tat. Esta proteína viral estimula la elongación de los transcritos virales iniciados por la ARN polimerasa II (Bieniasz *et al.*, 1999) uniéndose a una secuencia de 59 nucleótidos (nt), denominada elemento TAR (*Transactivation Response Element*), ubicada en el extremo 5' de los ARN virales nacientes, y reclutando al factor de elongación de la transcripción pTEFb al complejo de transcripción en la LTR 5' (Richter *et al.*, 2002). En el caso de SIV, Tat activa la transcripción a partir de la LTR de SIV no sólo por la vía del ARN TAR sino también a través de elementos en la región promotora U3 (van der Velden *et al.*, 2012). Por otra parte, Tat regula la transcripción viral al reclutar varias proteínas modificadoras de la cromatina que remodelan la región promotora del provirus (Romani *et al.*, 2010).

- **Rev**

El gen *rev*, presente en todos los lentivirus, se expresa en la etapa temprana de la infección a partir de un ARNm viral multiprocesado. Una vez sintetizada, la proteína Rev es importada al núcleo asociándose a una secuencia de aproximadamente 350 nt conocida como “elemento que responde a Rev” (*Rev-responsive element*, RRE), la cual está presente únicamente en los ARNm virales monoprocesados y no procesados (Hammar skjöld, 1997). La asociación de Rev al ARN-RRE permite entonces acoplar los ARNm virales conteniendo intrones a la proteína exportadora CRM1 (*chromosome region maintenance 1*). El complejo ARN-RRE-Rev-CRM1 es luego exportado al citoplasma de la célula infectada (Jeang, 2012).

- **Nef**

Nef es una proteína multifuncional de 27 kDa codificada por un ORF del extremo 3' del genoma de los lentivirus de primates (Figura 1). Nef es una de las primeras proteínas virales sintetizadas en las células infectadas, y se halla predominantemente en el citoplasma asociada a la membrana plasmática a través del ácido mirístico N-terminal. Las múltiples funciones de Nef la convierten en un determinante crítico de la progresión de la enfermedad y de la patogénesis viral (Laguette *et al.*, 2010), ya que esta proteína viral: (i) promueve la endocitosis del receptor primario CD4 (García & Miller, 1991; Guy *et al.*, 1987) y del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (Schwartz *et al.*, 1996), lo que resulta en menores niveles de estas moléculas en la superficie de las células infectadas; (ii) regula positivamente los niveles de la cadena invariante (Ii, CD74) del MHC clase II (Schindler *et al.*, 2003); y (iii) altera las vías de señalización de las células T (Baur *et al.*, 1994; lafrate *et al.*, 1997). La reducción de los niveles del MHC-I mediada por Nef contribuye a que las células infectadas no sean destruidas por los linfocitos T citotóxicos (Schwartz *et al.*, 1996). De hecho, la ausencia de un gen *nef* funcional está asociada a cargas virales muy bajas con un curso clínico atenuado tanto en humanos infectados con HIV-1 (Salvi *et al.*, 1998) como en macacos infectados con SIV_{mac} (Kestler *et al.*, 1991).

Resulta interesante destacar que la proteína Nef de ciertos linajes de SIV contrarrestan la actividad antiviral de la proteína celular BST-2 (Zhang *et al.*, 2009), lo cual, en el caso de HIV-1, es llevado a cabo por la proteína Vpu (ver sección 3.7 de Introducción).

- **Vpr**

Los virus del linaje HIV-2/SIV_{SMM}/SIV_{mac} codifican para las proteínas Vpr y Vpx que son homólogas a Vpr de HIV-1. Vpr es una proteína básica de 14 kDa que se incorpora a los viriones asociándose al dominio p6 de Gag (Yu *et al.*, 1990). Diversos estudios en HIV-1 han mostrado que esta proteína accesoria está implicada en la inducción de la apoptosis en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo fibroblastos y células tumorales (Stewart *et al.*, 1999), linfocitos T (Yao *et al.*, 1998), así como también monocitos y neuronas (Patel *et al.*, 2000). Vpr

también interviene en el transporte al núcleo del complejo de preintegración (PIC) en células diferenciadas que no se dividen (Heinzinger *et al.*, 1994), y produce el arresto del ciclo celular en la fase G2/M en líneas celulares humanas y de simios (Jowett *et al.*, 1995). La inducción del arresto celular en G2 es una función conservada evolutivamente en los lentivirus de primates, lo que apoya el concepto de que este mecanismo contribuye a que estos virus escapen a la respuesta inmune del hospedador y establezcan persistencia (Planelles *et al.*, 1996).

- **Vpx**

El gen *vpx* codifica para una proteína de aproximadamente 14-16 kDa asociada al virión (Henderson *et al.*, 1988), el cual, en base a evidencias genéticas y filogenéticas, surgió como una duplicación génica de *vpr* en el grupo HIV-2/SIV_{mac}/SIV_{SMM} (Sharp *et al.*, 1996).

Vpx es esencial para la infección eficiente de células mieloides, tales como los monocitos, las células dendríticas, y los macrófagos (Sharova *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008). Esta proteína viral interacciona con el complejo CRL4A (DCAF1) de la E3 ubiquitina ligasa induciendo así la degradación en proteasomas del factor celular de restricción SAMHD1 (*Sterile alpha motif and HD domain protein 1*), el cual bloquea la etapa de transcripción reversa en células mieloides al depletar la reserva intracelular de desoxirribonucleótidos trifosfato (Laguet *et al.*, 2011).

- **Vif**

El factor de infectividad viral (Vif), codificado por todos los lentivirus, excepto por el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), media la exclusión de la citidina desaminasa APOBEC3G de los viriones mediante mecanismos dependientes e independientes de la degradación de este factor celular en proteasomas (Goila-Gaur & Strebel, 2008). Vif actúa como proteína conectora entre APOBEC3G y el complejo E3 ubiquitina ligasa, lo cual resulta en la poliubiquitinación de este factor de restricción y su ulterior degradación por la vía de proteosomas (Marin *et al.*, 2003). En ausencia de Vif, las proteínas celulares APOBEC3 son incorporadas a los viriones durante el ensamblado viral (Mariani *et*

al., 2003), lo cual resulta en hipermutaciones G→A por desaminación de las citidinas del ADN proviral que se sintetiza en una nueva célula infectada (Mangeat *et al.*, 2003).

- **Vpu**

Vpu es una proteína integral de membrana tipo I de un tamaño de 77 a 86 aminoácidos (Gomez *et al.*, 2005) que está codificada únicamente por los genomas de HIV-1 y sus cepas de SIV predecesoras: los SIV_{cpz} de chimpancé (*Pan troglodytes*); SIV_{mon} de cercopiteco mona (*Cercopithecus mona*); SIV_{gsn} de cercopiteco de nariz blanca (*Cercopithecus nictitans*); SIV_{mus} de cercopiteco de hocico azul (*Cercopithecus cephus*); SIV_{den} de cercopiteco mona de Dent (*Cercopithecus denti*); y los SIV_{gor} de gorila (*Gorilla gorilla*) (Barlow *et al.*, 2003; Courgnaud *et al.*, 2002; Dazza *et al.*, 2005; Van Heuverswyn *et al.*, 2006).

Las funciones de esta proteína accesoria son: (i) interferir con el transporte de CD4 a la membrana plasmática, para lo cual Vpu se une al receptor viral CD4 en el retículo endoplasmático (Bour & Strebel, 2003; Gomez *et al.*, 2005), provocando así su retranslocación a proteasomas y su subsiguiente degradación (Ruiz *et al.*, 2010); y (ii) contrarrestar la acción antiviral del factor celular BST-2, lo que incrementa la liberación de las partículas virales de la superficie celular (ver sección 3.7 de Introducción).

2. Virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)

2.1. Generalidades

Los FIV comparten con los HIV y SIV muchas de las propiedades características del género *Lentivirus*, tales como la morfología del virión (Figura 2), el tropismo por linfocitos T y monocitos/macrófagos, la organización genómica (Figura 1), y la infección persistente en el hospedador (Elder *et al.*, 2010). Sin embargo, los FIV se hallan más estrechamente relacionados a nivel genético con los lentivirus de ungulados (EIAV, el virus Maedi/Visna y CAEV) que con los lentivirus de primates. Este virus fue aislado por primera vez en California a partir de gatos domésticos que presentaban infecciones oportunistas crónicas,

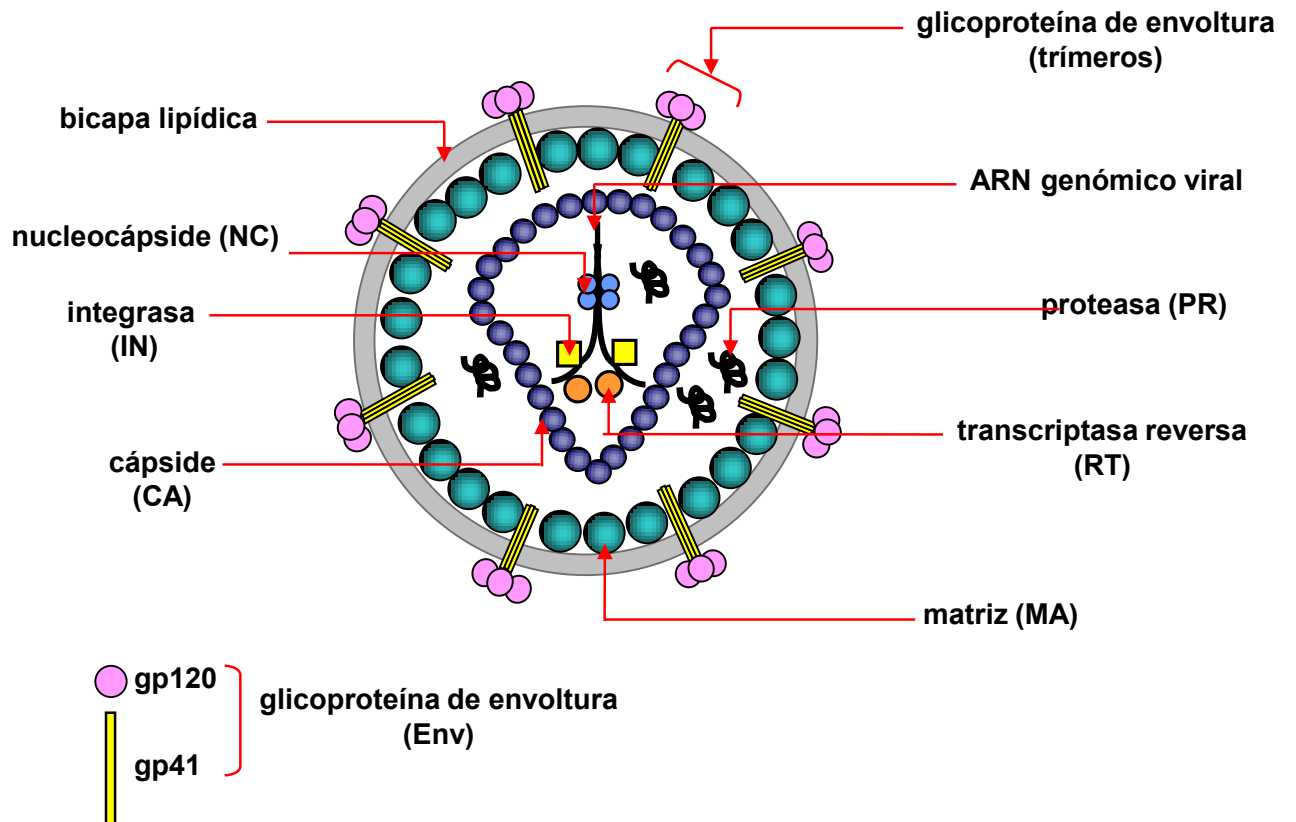


Figura 2. Organización estructural de una partícula lentiviral infecciosa. Esquema de la estructura del virión lentiviral maduro formado por las proteínas que derivan del procesamiento de los precursores Gag, Gag-Pol, y Env. Adaptado de Affranchino (2007).

enfermedad neurológica y un cuadro clínico similar al SIDA en humanos (Pedersen *et al.*, 1987). Cabe destacar que los FIV han sido aislados, además del gato doméstico, de felinos salvajes (Courchamp & Pontier, 1994). Actualmente, FIV representa un patógeno viral importante de los gatos domésticos a nivel mundial, y debido a la marcada similitud con HIV en la organización genómica, la estructura del virus, la replicación y la patogénesis, la infección de gatos con FIV ofrece un modelo animal natural para el desarrollo de nuevas terapias y vacunas (Elder *et al.*, 2010).

La principal vía de transmisión de FIV es a través de las mordeduras de los gatos infectados durante las peleas o el coito (Matteucci *et al.*, 1993). La transmisión sexual y vertical de FIV no es frecuente en la naturaleza (Kolenda-Roberts *et al.*, 2007) y, a diferencia de la infección de SIV en simios, el desarrollo del SIDA felino no requiere de la transmisión entre especies, lo que permite estudiar experimentalmente las vías de transmisión horizontal y vertical en gatos domésticos (Coats, 2005). A pesar de que el gato es un animal doméstico con estrecho contacto con el ser humano, FIV es incapaz de infectar humanos, posiblemente debido en parte a que el promotor viral LTR no es activo en células humanas (Mustafa *et al.*, 2005). De hecho, no se han detectado anticuerpos específicos de FIV en individuos dedicados a la práctica veterinaria (Elder *et al.*, 2010).

El tropismo de FIV incluye células T (Beebe *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1987), macrófagos (Rideout *et al.*, 1992) y células del sistema nervioso central (Dow *et al.*, 1992). Los FIV, junto con los lentivirus de primates HIV y SIV, son únicos en su género por tener como células blanco a los linfocitos T CD4⁺ e inducir inmunodeficiencia. En cambio, los lentivirus de ovinos, caprinos y equinos provocan un estado clínico que se corresponde más a una condición inflamatoria crónica; mientras que la infección con lentivirus de bovinos pasa clínicamente desapercibida.

La patología provocada por la infección con FIV es similar a la inducida por HIV-1 en humanos: los gatos domésticos infectados con FIV desarrollan SIDA caracterizado por un período de latencia seguido por la depleción de linfocitos T CD4⁺, inmunosupresión, y subsiguientes infecciones secundarias (Willett *et al.*, 1997).

El hecho de que la organización genómica de FIV, las propiedades biológicas de sus proteínas y la patogénesis de la infección sean muy similares a las de HIV-1 (Pedersen *et al.*, 1989) ha llevado a establecer al sistema gato doméstico-FIV como un modelo altamente adecuado para el ensayo de compuestos antirretrovirales. Como ejemplos, se pueden mencionar: (1) el compuesto AMD3100, un antagonista del receptor de quimioquinas CXCR4, que bloquea la unión de la glicoproteína Env de FIV al correceptor CXCR4, el cual es también utilizado como correceptor por los HIV-1 X4-trópicos (Egberink *et al.*, 1999; González *et al.*, 2014); (2) el PMEA, un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa (NRTI), que reduce significativamente la replicación viral de FIV tanto *in vitro* como *in vivo* (Egberink *et al.*, 1990); y (3) la zidovudina, otro NRTI que se aplica en algunos casos para el tratamiento de gatos infectados con FIV (Hosie *et al.*, 2009).

2.2. Organización genómica

El tamaño y organización del genoma de FIV son característicos de los genomas lentivirales (Olmsted *et al.*, 1989; Talbott *et al.*, 1989): el provirus integrado se encuentra flanqueado por las LTRs y posee los genes estructurales y enzimáticos *gag*, *pol* y *env*, comunes a todos los retrovirus (Figura 1).

La particularidad del gen *pol* de FIV es que codifica, además de las enzimas PR, RT, e IN, para una desoxiuridina trifosfatasa (DU), al igual que los lentivirus de animales no primates CAEV, EIAV y el virus Maedi/Visna (Wagaman *et al.*, 1993). El rol principal de la DU es prevenir la incorporación errónea de uracilo en el ADN viral durante la transcripción reversa, lo cual resultaría mutagénico, limitando la concentración disponible de dUTP por conversión a dUMP, un precursor en la síntesis de dTTP. La DU no es necesaria para la replicación viral en células que se hallan en división celular debido a los altos niveles endógenos de esta enzima durante dicho proceso. Se ha demostrado que los virus mutantes FIV DU⁻ acumulan 5-8 veces más mutaciones por transición G→A respecto del virus salvaje durante la replicación en macrófagos *in vivo* (Lerner *et al.*, 1995).

2.2.1. Proteínas regulatorias y accesorias de FIV

El genoma de FIV contiene tres genes auxiliares: *vif*, *orf-A* y *rev* (Figura 1); (Tomonaga & Mikami, 1996).

- **Vif**

Al igual que los lentivirus de primates HIV-1 y SIV, FIV codifica para la proteína accesoria Vif que contrarresta la actividad antiviral del factor APOBEC3 felino. En este sentido, se ha demostrado que un FIV mutante con una delección en el gen *vif* no es infeccioso en células mononucleares de sangre periférica ni en macrófagos felinos (Lockridge *et al.*, 1999).

- **OrfA**

El gen *orfA* de FIV, también denominado *orf2*, se localiza en el genoma viral en una posición similar a la del primer exón de *tat* de los lentivirus de primates y no primates (Figura 1; Tomonaga & Mikami, 1996). Sin embargo, a diferencia de la proteína Tat de los lentivirus de primates, la proteína OrfA de FIV (masa molecular de 9 kDa) presenta una baja actividad de transactivación (Waters *et al.*, 1996). Se ha demostrado que OrfA induce el arresto de las células infectadas en la etapa G2 del ciclo celular, reminiscente de las características biológicas que exhiben las proteínas Vpr de HIV-1 y de SIV (Gemeniano *et al.*, 2004). Los FIV mutantes que carecen de una proteína Orf-A funcional son capaces de infectar los mismos tejidos que el virus salvaje, pero la cantidad de ADN viral es significativamente menor (Inoshima *et al.*, 1998); y los gatos infectados con estos virus defectivos muestran niveles de replicación viral bajos y una progresión hacia la enfermedad más lenta (Inoshima *et al.*, 1996).

- **Rev**

El gen *rev* de FIV codifica para un polipéptido de 23 kDa, cuyo ARNm resulta del empalme entre el exón 5', que se superpone con el extremo 5' del gen *env*, y el exón 3' que se halla en la LTR 3' del genoma viral (Figura 1). A diferencia de los lentivirus de primates, donde el RRE se superpone con el marco abierto de lectura del gen *env*, el RRE de FIV se ubica en el extremo 3' del gen

env. Este elemento genético se pliega formando una horquilla de estructura secundaria conservada de aproximadamente 150 nucleótidos que resulta crítica para la función de la proteína Rev (Na *et al.*, 2010).

3. Ciclo de replicación de los SIV y FIV

3.1. Entrada viral y desnudamiento

El ciclo de replicación de los lentivirus comienza con la asociación de la partícula viral a la superficie de la célula blanco mediante la interacción de la glicoproteína viral Env con el receptor y el correceptor celulares (Figura 3). En el caso de HIV y SIV, la subunidad de superficie (SU) del complejo Env trimérico se une al receptor celular primario CD4, lo cual, debido a la distribución tisular de CD4, limita el tropismo de estos lentivirus a los linfocitos T colaboradores y a las células del linaje monocito/macrófago (Goff, 2007). Esta interacción inicial entre Env y CD4 provoca un cambio conformacional en la SU que expone un dominio crítico para la interacción con el correceptor, conduciendo finalmente a la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (para una revisión sobre el tema, ver Affranchino & González, 2014; Checkley *et al.*, 2011). Los grupos de virus SIV_{SMM}/SIV_{mac} y SIV_{agm}, al igual que las cepas HIV-1 llamadas R5-trópicas, utilizan al receptor de quimioquinas CCR5 como correceptor. Sin embargo, los SIV de otras especies pueden usar CCR2b, CCR3, STRL33 (Bonzo), GPR15 (Bob) y GPR1 para entrar a sus células blanco (Clapham & Weiss, 1997). Resulta interesante mencionar que ciertos aislamientos de HIV y SIV poseen la capacidad de unirse directamente al correceptor en ausencia de CD4 (Endres *et al.*, 1996).

Los FIV, al igual que los lentivirus de primates, infectan a los linfocitos T colaboradores y a las células del linaje monocito/macrófago, pero utilizan CD134 como receptor primario (Shimojima *et al.*, 2004). CD134, también conocido como OX40, es una molécula estimuladora presente en altos niveles en los linfocitos felinos activados, las células del linaje monocito/macrófago y las células dendríticas (Reggeti *et al.*, 2008). Se ha demostrado que, al igual que la interacción entre las glicoproteínas Env de HIV y de SIV con el receptor primario CD4, la unión de Env de FIV con CD134 causa cambios conformacionales en la

subunidad SU que permiten su asociación al correceptor CXCR4 (de Parseval *et al.*, 2006).

La reacción de fusión de membranas mediada por Env, que tiene lugar entre las bicapas lipídicas de la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula, posibilita el acceso del *core* viral al citoplasma celular para el proceso de infección y replicación viral (Figura 3). En la fusión de membranas está involucrado el ectodominio de la subunidad transmembrana (TM) de Env, el cual posee una región N-terminal altamente hidrofóbica denominada péptido de fusión, y dos dominios con hepta-repeticiones denominados hélice-N y hélice-C (Chan & Kim, 1998). Estos dos últimos, luego de la unión de la SU al receptor/correceptor, forman un haz de seis hélices en el que tres hélices-N de las TM del trímero de Env se empaquetan de manera antiparalela a tres hélices-C (Chan & Kim, 1998). Esta estructura adoptada por el ectodominio de la TM dispara la inserción del péptido de fusión en la membrana blanco (Weissenhorn *et al.*, 1997). Luego de la fusión de las membranas viral y celular, ocurre el desnudamiento del virión en el citoplasma, durante el cual el *core* viral pasa a formar parte primero del complejo de transcripción reversa, y luego del complejo de preintegración (PIC) que es transportado a núcleo (Logue *et al.*, 2011).

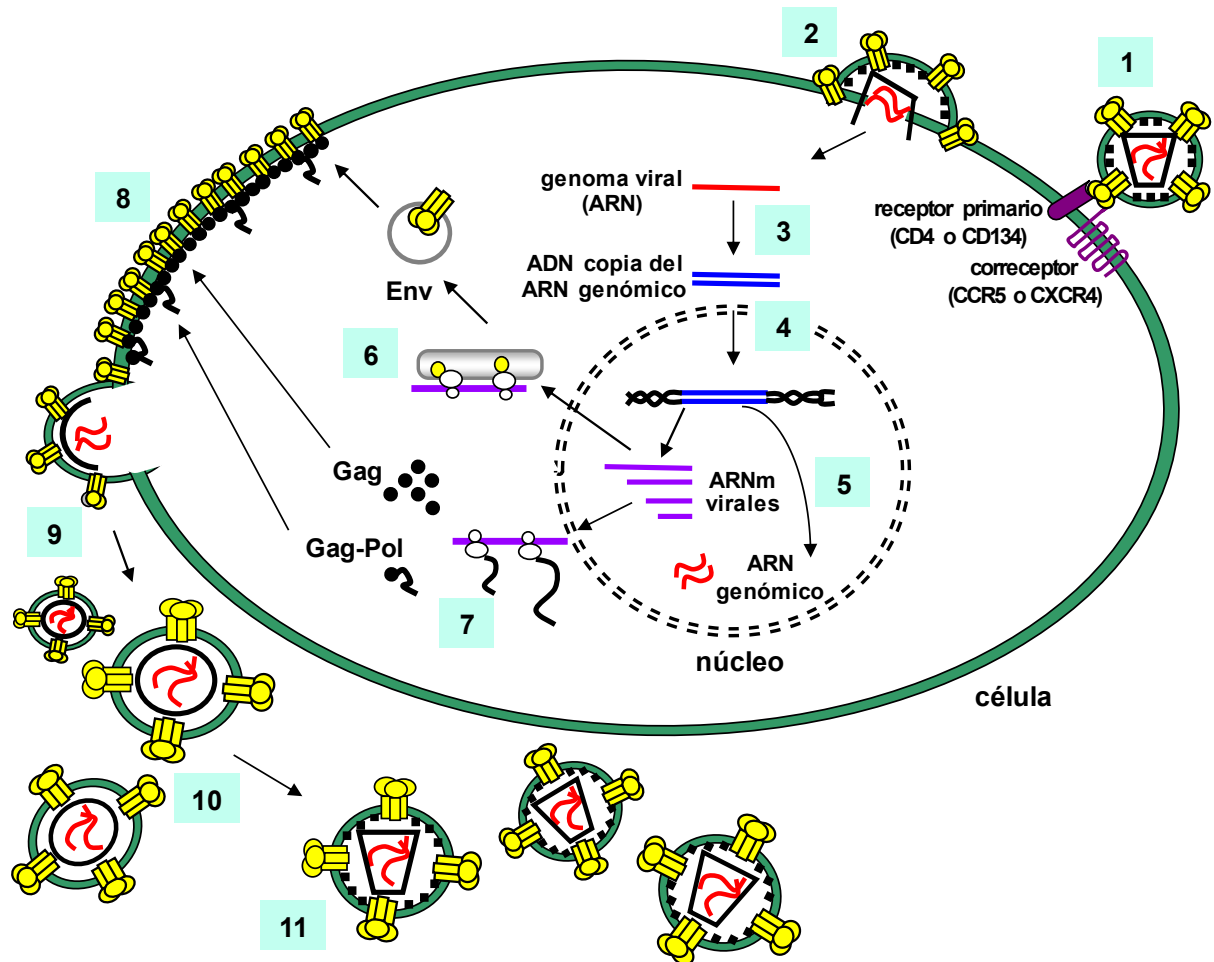


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de los lentivirus SIV y FIV. (1) Unión del virión a la superficie celular. La subunidad SU de la glicoproteína Env se asocia al receptor (CD4 para SIV; CD134 para FIV) y correceptor (CCR5 para SIV; CXCR4 para FIV) celulares; (2) Entrada del virus a la célula. La subunidad TM de Env promueve la fusión de la membrana viral con la celular, permitiendo así la entrada del virus al citoplasma; (3) Retrotranscripción. La RT sintetiza un ADNc doble cadena utilizando como molde al ARN genómico viral; (4) Integración. La IN introduce el ADNc viral en los cromosomas de la célula hospedadora. La forma integrada del ADN viral se denomina provirus; (5) Transcripción del ADN viral y síntesis de los ARNm que codifican para las proteínas virales. También se genera un ARN de tamaño completo que servirá como genoma de la progenie viral; (6) Síntesis de la proteína Env. Esta proteína se sintetiza en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico y es transportada a la membrana plasmática a través de la vía secretoria celular; (7) Síntesis de Gag y Gag-Pol en ribosomas libres del citoplasma, los cuales son transportados a la membrana plasmática; (8) Acumulación de moléculas de Gag en la cara interna de la membrana plasmática; (9) Ensamblado de partículas virales a partir de la multimerización de Gag. Se producen viriones que incorporan a Gag-Pol, a la glicoproteína Env y a dos moléculas de ARN genómico; (10) Brotación de las partículas lentivirales. Se liberan al medio extracelular viriones inmaduros; (11) Maduración. Se activa la PR que procesa a las proteínas Gag y Gag-Pol, lo cual conduce a la formación de viriones maduros infecciosos. Adaptado de Affranchino (2007).

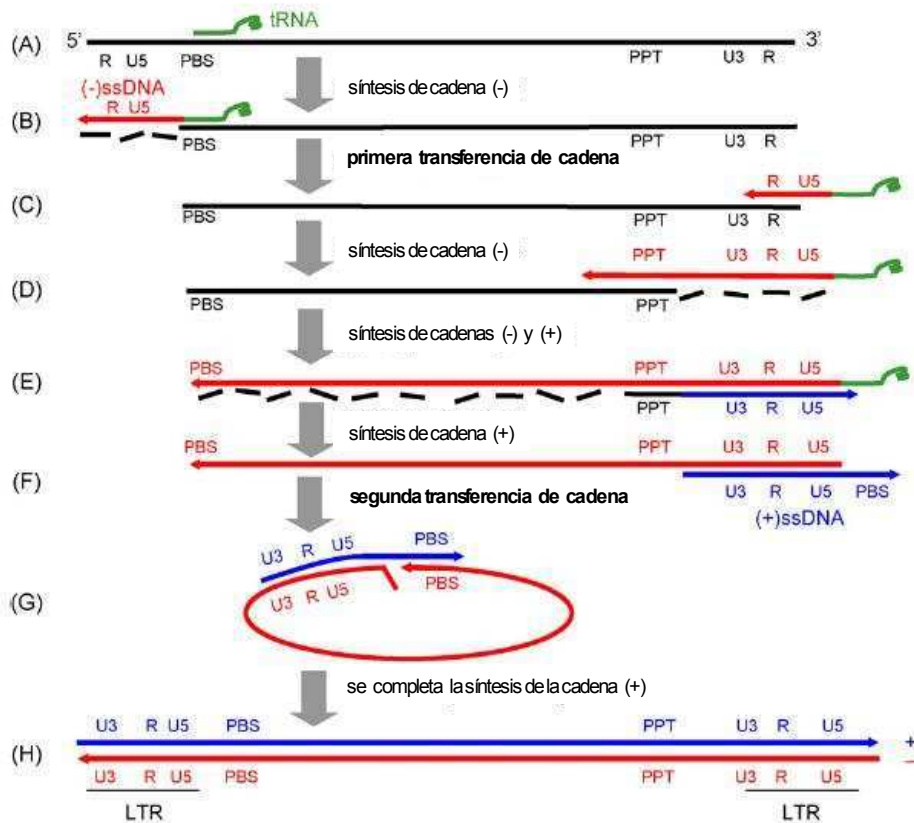


Figura 4. Mecanismo de retrotranscripción. (A) La transcripción reversa se inicia a partir del extremo 3' del ARNt cebador del ARN genómico viral; (B) Se genera un ADN corto de cadena negativa [(-)ssDNA]; el extremo 5' del ARN genómico es degradado mediante la actividad RNasa H de la RT, y el (-)ssDNA es traslocado al extremo 3' del ARN genómico; (C) La región R del (-)ssDNA hibrida con la región R 3' del ARN genómico y continúa la síntesis del ADN cadena negativa; (D) El ARN del híbrido ARN-ADN es también susceptible a la acción de la RNasa H; (E) y (F) Continúa la síntesis del ADN cadena negativa y también comienza la síntesis de la cadena positiva a partir del fragmento PPT, lo que resulta en la generación de un ADN corto de cadena positiva [(+)ssDNA] conteniendo la secuencia PBS; (G) Las copias complementarias de las secuencias PBS presentes en la cadena (+)ssDNA y en la cadena negativa hibridan entre sí; (H) Se reanuda la síntesis de las cadenas negativa y positiva, lo que resulta en la generación del ADNc genómico viral llevando una LTR (secuencias U3-R-U5) en cada extremo.

U3: región promotora; U5: sitio de reconocimiento para la integrasa viral; PBS: *primer binding site*; PPT: *polypurine tract*.

Adaptado de Basu *et al.* (2008).

3.2. Transcripción reversa

Posteriormente a la entrada viral y al desarmado del virión en el citoplasma de la célula blanco, el ARN genómico viral es convertido en ADN doble cadena (Figura 3) en una serie de etapas catalizadas por la enzima RT (Telesnitsky & Goff, 1997).

La retrotranscripción en los lentivirus, cuyo mecanismo se esquematiza en la Figura 4, se inicia a partir de la región doble cadena generada por la asociación de una molécula de ARNt, empaquetada durante el ensamblado de la partícula viral, al sitio de unión del cebador (*primer binding site*; PBS) presente en el extremo 5' del ARN genómico viral. La síntesis de ADN genera un híbrido ADN/ARN que es hidrolizado por la actividad RNasa H de la enzima RT, dejando una molécula de ADN simple cadena de sentido negativo de alrededor de 100-150 nt (*minus strand strong-stop DNA*; indicado como (-)ssDNA en la Figura 4). Esta hebra de ADN hibrida por complementariedad de secuencia en la región R del extremo 3' del genoma viral, donde actúa como cebador para la síntesis de la molécula de ADN de cadena negativa a partir del ARN viral. Esta reacción de hibridación es facilitada por la proteína NC (Guo *et al.*, 1997). El ARN genómico viral presenta regiones que son resistentes a la degradación por la RNasa H denominadas trechos de polipurinas (*polypurine tract*, indicado como PPT en la Figura 4), las cuales se hallan tanto en el centro como hacia el extremo 3' del genoma viral, y funcionan como cebadores para la síntesis de la cadena positiva de ADN genómico viral. La polimerización desde los sitios PPT se detiene en la primera base modificada del ARNt cebador, dando como producto un ADN de cadena positiva (*plus strand strong-stop DNA*; indicado como (+)ssDNA en la Figura 4). El dominio RNasa H de la RT degrada entonces el ARNt y el extremo 3' del (+)ssDNA hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' del templado de cadena negativa, de modo que la hebra positiva continúe y que permita también completar la síntesis de la cadena negativa. Como resultado, se genera un provirus de ADN copia (ADNc) con las LTRs duplicadas. En el caso de FIV, a diferencia de otros lentivirus, las secuencias de los dos sitios PPT del genoma viral son diferentes entre sí. A su vez, el sitio PPT central del genoma de FIV posee uno o dos residuos de pirimidina, pero es funcionalmente similar al de

otros lentivirus en lo que respecta a la iniciación de la síntesis de la hebra positiva y a la formación de la solapa de ADN (Whitwam *et al.*, 2001).

3.3. Mecanismos tempranos de restricción celular

Las infecciones retrovirales patogénicas de mamíferos han inducido la evolución de factores celulares de restricción antiviral. Estos factores de restricción actúan prácticamente sobre todos los estadios del ciclo de vida viral, tales como el desnudamiento del virión, la transcripción reversa, la entrada del complejo de preintegración al núcleo y la brotación de los viriones al medio extracelular (Bieniasz, 2004). A su vez, la expresión y actividad de estos factores de restricción son dependientes del tipo celular y de la especie, lo que controla el espectro de hospedadores virales e impone una barrera a los eventos de transmisión entre especies (Bieniasz, 2004; Nisole *et al.*, 2005; Troyer *et al.*, 2008).

A continuación se describen los factores celulares que participan en los mecanismos tempranos de restricción frente a la infección lentiviral.

❖ APOBEC3G

Como ya se mencionó, APOBEC3G es una proteína celular que pertenece a la familia denominada APOBEC, cuyos miembros se caracterizan por presentar uno o dos dominios desaminasa coordinados por zinc (dominio Z). Este dominio cataliza la desaminación de las citidinas, convirtiendo a las citosinas en uracilos en las moléculas de ARN y ADN en una gran variedad de vertebrados. El factor celular APOBEC3G fue el primer factor de restricción de la replicación de los lentivirus identificado y determina que una célula sea permisiva o no para la infección viral, ya que restringe la replicación de los lentivirus de humanos y de simios en sus respectivas células blanco.

APOBEC3G ejerce su acción antirretroviral a través de los siguientes mecanismos: (i) provoca la acumulación de sustituciones C→dU en el ADNc de polaridad negativa durante la transcripción reversa, lo que resulta en hipermutaciones G→A en la hebra positiva del ADN viral, comprometiendo la

integridad del genoma del virus (Sheehy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003); (ii) inhibe la hibridación del ARNt o su procesamiento durante la transcripción reversa (Guo *et al.*, 2007); (iii) inhibe la transferencia de la hebra del ADN viral en el primer paso de la retrotranscripción, así como también la integración al genoma celular (Li *et al.*, 2007). Como ya se explicó, la proteína viral Vif contrarresta la actividad de APOBEC3G promoviendo la poliubiquitinación de este factor de restricción y su subsiguiente degradación vía proteasomas (Stopak *et al.*, 2003).

Resulta interesante destacar que las proteínas APOBEC3 no sólo ejercen su actividad antiviral sobre HIV-1 (Sheehy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003), SIV (Mussil *et al.*, 2011) y FIV (Munk *et al.*, 2008) sino que también restringen la replicación de otros retrovirus como EIAV (Mangeat *et al.*, 2003), el virus de la leucemia a células T de humanos tipo 1, HTLV-1 (Sasada *et al.*, 2005), espumavirus (Delebecque *et al.*, 2006), el virus de la leucemia murina, MLV (Nitta *et al.*, 2012), el virus del tumor mamario murino, MMTV (Okeoma *et al.*, 2007), y de virus a ADN que se replican vía transcripción reversa como el virus de la hepatitis B (Turelli *et al.*, 2004).

❖ TRIM5 α

La proteína celular TRIM5 pertenece a la familia TRIM (*Tripartite Motif*), cuyos miembros se caracterizan por poseer tres motivos aminoacídicos: un motivo RING N-terminal que une zinc y que exhibe actividad de E3 ubiquitina ligasa, un motivo B-box que une zinc, y una región de hélice superenrollada (*coiled-coil*) (Perez-Caballero *et al.*, 2005).

Luego de la entrada viral, la isoforma alpha de TRIM5, TRIM5 α , reconoce al *core* viral en la célula infectada a través de su dominio B30.2/SPRY, el cual determina la especificidad y la magnitud de la restricción mediada por TRIM5 α frente a la infección retroviral (Nisole *et al.*, 2005). La restricción retroviral posentrada mediada por TRIM5 α tiene lugar en dos etapas. Primero, TRIM5 α induce el desensamblado prematuro y acelerado del *core* viral y la consiguiente degradación del complejo viral de transcripción reversa vía el proteosoma celular. Posteriormente, TRIM5 α bloquea la translocación del PIC al núcleo celular (Wu *et al.*, 2006).

A diferencia de lo que ocurre con otros factores celulares de restricción, no existe una proteína accesoria lentiviral que antagonice la acción mediada por TRIM5 α . Las especies felinas no presentan la tradicional restricción por TRIM5 frente a los retrovirus, ya que expresan una proteína TRIM5 truncada carente del dominio B30.2 (McEwan *et al.*, 2009).

3.4. Importación del PIC al núcleo e integración del ADNc viral al genoma celular

El ADNc genómico viral, resultado de la transcripción reversa, es translocado al núcleo como parte del PIC donde luego es integrado al genoma de la célula hospedadora (Figura 3). La importación del PIC al núcleo es mediada, en el caso de los lentivirus de primates, por la interacción de la proteína viral Vpr presente en el virión infectivo con las nucleoporinas celulares (Fouchier *et al.*, 1998). La solapa central de ADN originada durante el proceso de transcripción reversa ha sido implicada, en el caso de HIV-1, en la importación del PIC al núcleo (Zennou *et al.*, 2000).

Luego de la importación del PIC viral al núcleo de la célula hospedadora, la IN cataliza la inserción del ADN doble cadena lineal del virus en el genoma celular (Figura 3). Inicialmente, los extremos 3' del ADNc viral son procesados por la IN que remueve dos nucleótidos, generando así extremos sobresalientes CA, los cuales se unen a los extremos 5' del ADN celular ya escindidos. El proceso de integración se completa cuando las enzimas celulares reparan los espacios y los extremos 5' son ligados.

La integración del genoma proviral de HIV-1 no es completamente al azar, sino que el provirus se integra preferencialmente en regiones *downstream* de los promotores de genes activos (Schroder *et al.*, 2002). Sin embargo, FIV muestra una preferencia ligeramente distinta a la de HIV-1 respecto al sitio de integración (Shibagaki & Chow, 1997). El ADN viral integrado, ahora denominado provirus, se comporta esencialmente como un gen celular y es mantenido como parte del genoma celular durante toda la vida de la célula infectada.

3.5. Expresión génica viral y exportación de los ARNm al citoplasma

Luego de la integración en el genoma celular, el provirus actúa como molde para la síntesis del ARN viral que codifica para todas las proteínas estructurales, regulatorias y accesorias involucradas en la replicación viral (Figura 3).

En el contexto del provirus, la principal función de la secuencia LTR 5' es dirigir la síntesis del ARN viral. El promotor transcripcional y los elementos regulatorios adyacentes presentes en la región U3, reclutan a la holoenzima ARN pol II al sitio de iniciación de la transcripción viral, que es el primer nucleótido de la región R de la LTR (Li *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1992). Sin embargo, la actividad transcripcional basal de la LTR de los HIV y SIV provirales es muy baja, y la síntesis de ARN viral sólo alcanza niveles elevados en presencia del transactivador transcripcional Tat (Fisher *et al.*, 1986; Vander Velden *et al.*, 2012). La proteína viral Tat se une al bucle formado por el elemento TAR en el extremo 5' de las cadenas nacientes del ARN viral, y recluta entonces al complejo P-TEFb que fosforila a la ARN pol II, lo cual resulta en una estimulación significativa de su procesividad transcripcional (Bieniasz *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó, FIV no posee un elemento con estructura similar al TAR y tampoco codifica para la proteína Tat, pero la proteína OrfA promueve un incremento en la transcripción/traducción viral a través de mecanismos diferentes a los de otros lentivirus (Gemeniano *et al.*, 2003). Además, la actividad promotora basal de la LTR 5' de FIV es significativamente mayor que la de HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2003).

La transcripción del genoma proviral genera un gran número de ARNm virales debido a los múltiples sitios de procesamiento para corte y empalme presentes en el ARN genómico viral (Purcell & Martin, 1993). Por lo tanto, en una célula infectada existen tres clases de ARNs virales (Figura 3): (1) ARNs que no sufren procesamiento y que actúan tanto como ARNm para la síntesis de las poliproteínas Gag y Gag-Pol, así como ARN genómico que será empaquetado por la progenie viral; (2) ARNm monoprocados, de un tamaño aproximado de 5 kb que codifican para las proteínas Env, Vif (en el caso de HIV, SIV y FIV), Vpu/Vpx y Vpr (en el caso de HIV y SIV); y (3) ARNm multiprocados que son traducidos en las proteínas Rev (para los lentivirus HIV, SIV y FIV), y en Tat y Nef (para HIV y SIV). Como ya se explicó, la exportación a citoplasma de los ARNm lentivirales

conteniendo intrones es mediada por la proteína Rev (ver sección 1.2.2. de Introducción).

3.6. Ensamblado de las partículas virales y empaquetamiento del ARN genómico viral

Las proteínas estructurales que forman la partícula lentiviral derivan de los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol, y de la glicoproteína Env (Figura 3). A partir de los ARNm virales que no sufren procesamiento se sintetizan la poliproteína Gag y, por corrimiento en -1 del marco de lectura ribosomal (*frameshifting*), el precursor Gag-Pol (Goff, 2007). Este mecanismo de corrimiento de -1 en la lectura ribosomal del extremo 3' del ORF de *gag* ocurre con una frecuencia de aproximadamente 5%, lo que resulta en niveles del precursor Gag superiores a los de Gag-Pol (Swanstrom & Wills, 1997).

Por su parte, la glicoproteína Env es sintetizada como un precursor altamente glicosilado en el retículo endoplasmático a partir de un ARNm viral monoprocesado, es luego procesada en el trans-Golgi en las subunidades de superficie (SU) y de transmembrana (TM), y transportada como complejo heterotrimérico SU-TM a la membrana plasmática siguiendo la vía biosintética secretoria (Checkley *et al.*, 2011; Swanstrom & Wills, 1997).

El ensamblado de los lentivirus tiene lugar en la membrana plasmática de la célula infectada (Figura 3), siendo la región amino terminal de Gag, el dominio matriz (MA), el principal elemento responsable del direccionamiento y asociación de Gag a la membrana plasmática (González & Affranchino, 1998; Göttlinger *et al.*, 1989; Manrique *et al.*, 2001; 2004a). Durante el ensamblado de la poliproteína Gag en partículas se incorporan los otros componentes del virión: el precursor Gag-Pol, el ARN genómico viral y el complejo trimérico de la Env madura (Affranchino & González, 2014; Freed, 1998).

La secuencia en *cis* que dirige la encapsidación del ARN genómico viral, conocida como señal de empaquetamiento ψ o E, se encuentra ubicada en la región 5' que precede al codón de iniciación del gen *gag* siendo la estructura secundaria que adopta ψ lo que determina la especificidad del proceso de empaquetamiento del ARN genómico (Berkowitz *et al.*, 1996). Experimentos

realizados en FIV sugieren que la asociación del ARN genómico a Gag ocurre en la cara citoplasmática de la envoltura nuclear (Kemler *et al.*, 2010). La rigurosa especificidad de Gag por los ARN genómicos retrovirales está mediada por su región carboxilo, el dominio nucleocápside (NC), el cual reconoce una o más señales de empaquetamiento (Jewell & Mansky, 2000). Los ARN genómicos retrovirales se unen entre sí a través de la secuencia denominada sitio de iniciación de la dimerización (*dimerization initiation site*, DIS) localizada en el extremo 5' de los mismos (Berkowitz *et al.*, 1996; Jewell & Mansky, 2000).

La etapa final del ensamblado lentiviral involucra la brotación de las partículas virales hacia el medio extracelular (Figura 3). Este proceso está mediado por secuencias aminoacídicas cortas presentes en las poliproteínas Gag denominadas dominios tardíos (*late domains*, L) (para revisiones sobre el tema, ver Bieniasz, 2006; Freed, 2002). En los lentivirus, los motivos aminoacídicos PT/SAP (HIV-1, SIV y FIV) y/o YPX_nL (HIV-1 y EIAV) en el dominio C-terminal de Gag interactúan, directamente o a través de factores celulares intermediarios, con componentes de la maquinaria endosomal conocida como ESCRT (*endosomal-sorting complexes required for transport*) (Bieniasz, 2006). La asociación de Gag a ESCRT, por medio del dominio L, promueve la brotación de los viriones lentivirales a través de la membrana plasmática de las células infectadas. Resulta interesante destacar que nuestro laboratorio ha demostrado que el dominio C-terminal p2 de Gag de FIV contiene los dominios L involucrados en la brotación de partículas, por lo que es funcionalmente equivalente al péptido p6 de HIV y SIV (Manrique *et al.*, 2004b).

Durante o inmediatamente después de la brotación de las partículas virales ocurre la maduración de la progenie viral (Figura 3): la PR viral procesa a las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol, dando lugar a las proteínas maduras que forman los viriones infectivos (Figura 2), los cuales iniciarán un nuevo ciclo de infección (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008; Sundquist & Kräusslich, 2012).

3.7. Factores celulares de restricción tardía

En las etapas tardías del ciclo de replicación viral, el factor celular inducible por interferón BST-2/HM1.24/CD317, también conocido como *tetherin*, impide el

desprendimiento de las partículas virales maduras a partir de la membrana de las células infectadas (Neil *et al.*, 2008; Van Damme *et al.*, 2008). BST-2 es una proteína transmembrana de tipo II de aproximadamente 30-36 kDa, distribuida entre la superficie celular, el aparato de Golgi y los endosomas de reciclaje (Kupzig *et al.*, 2003).

La restricción ejercida por este factor celular es contrarrestada por la proteína accesoria Vpu de HIV-1 y de algunos SIV, la cual reduce los niveles de BST-2 en la superficie celular al promover su degradación (Neil *et al.*, 2006; Van Damme *et al.*, 2008). En los lentivirus que carecen de Vpu, la función antagonista de BST-2 es ejercida por la glicoproteína Env, es el caso de HIV-2 (Tokarev *et al.*, 2009) y de FIV (Celestino *et al.*, 2012), o por Nef, para la mayoría de los SIV (Tokarev *et al.*, 2009).

4. Formación de los viriones maduros infectivos

4.1. La poliproteína Gag

Los lentivirus se ensamblan y brotan de la célula infectada inicialmente como partículas esféricas inmaduras, no infecciosas, formadas por aproximadamente 2.500 moléculas de Gag dispuestas radialmente (Briggs *et al.*, 2009; Sundquist & Kräusslich, 2012; Wilk *et al.*, 2001). En el virión inmaduro, la MA, como dominio N-terminal de Gag, se encuentra asociada a la cara interna de la membrana lipídica viral, mientras que el dominio p6 en el extremo carboxilo de Gag se proyecta hacia el centro de la partícula viral (Briggs *et al.*, 2009; Wilk *et al.*, 2001). El polipéptido Gag contiene todos los elementos estructurales necesarios para su ensamblado en partículas (para revisiones sobre el tema, referirse a Affranchino & González, 2014; Ganser-Pornillos *et al.*, 2008; Sundquist & Kräusslich, 2012). En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado, utilizando a los virus SIV y FIV como modelos para el ensamblado lentiviral, que las poliproteínas Gag de estos lentivirus, expresadas en células de mamíferos, o incubadas *in vitro* en condiciones bioquímicamente definidas y en ausencia de otras proteínas virales, forman partículas cuya morfología es similar a la de los viriones auténticos (Affranchino & González, 2010; González *et al.*, 1993; Manrique *et al.*, 2001; Rauddi *et al.*, 2011).

El clivaje proteolítico de Gag por la PR viral resulta en la reorganización de las proteínas procesadas en la estructura del virión maduro. El procesamiento del precursor Gag permite así la organización de una partícula estable con capacidad infectiva, competente para el ensamblado y brotación, que en una nueva célula hospedadora se transforma en una estructura viral lábil que se desarma para dar lugar a la replicación viral.

Las funciones de cada uno de los dominios funcionales de las poliproteínas Gag de SIV y de FIV se describen a continuación.

4.2. La proteína matriz

El dominio N-terminal del precursor Gag corresponde a la proteína MA, la cual provee durante el ensamblado de las partículas los determinantes primarios para el transporte y asociación de Gag con la membrana plasmática: (a) el ácido mirístico que se une cotraduccionalmente a la glicina N-terminal (Delchambre *et al.*, 1989; Göttlinger *et al.*, 1989; Manrique *et al.*, 2001); (b) una región altamente básica, localizada entre los residuos 26 y 32 de las proteínas MA de SIV y HIV-1, que establece interacciones electroestáticas con los fosfolípidos, especialmente con fosfatidil inositol-(4,5)-bifosfato, presentes en la cara interna de la membrana plasmática (González *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994); y (c) los residuos hidrofóbicos Val7 y Leu8 de las MA de SIV y HIV-1, que contribuyen a estabilizar la asociación de Gag con la membrana plasmática (González & Affranchino, 1998; Ono & Freed, 1999).

En el caso del precursor Gag de FIV, nuestro laboratorio ha demostrado que su interacción con la membrana plasmática es más dependiente del grupo N-miristilo que de la región N-terminal de la MA que contiene aminoácidos básicos (Manrique *et al.*, 2001). El concepto de que el dominio MA de Gag de FIV no exhibe una región con características idénticas a la región polibásica de las proteínas MA de SIV y de HIV-1 quedó establecido al caracterizar el fenotipo de un virus quimérico SIV en el que se reemplazó el dominio MA de SIV por el de FIV: este virus no forma viriones debido a la incapacidad del precursor Gag quimérico de asociarse a la membrana plasmática (Manrique *et al.*, 2004a).

Estudios adicionales de nuestro laboratorio en SIV y de otros grupos de investigación en HIV-1 han demostrado que otras de las funciones de la MA son las de participar en el ensamblado de las partículas virales (Cannon *et al.*, 1997; Chazal *et al.*, 1994; Freed *et al.*, 1994; González *et al.*, 1993, 1996; González & Affranchino, 1995) y la de mediar la incorporación de la glicoproteína Env a los viriones (Dorfman *et al.*, 1994; Freed & Martin, 1996; González *et al.*, 1993, 1996; Manrique *et al.*, 2003, 2008; Murakami & Freed, 2000; Yu *et al.*, 1992).

Por otra parte, se ha propuesto que la unión del ARN genómico a la región polibásica del dominio MA de HIV-1 impediría que Gag se asocie de manera prematura e inespecífica a otras membranas celulares antes de unirse a la membrana plasmática para ensamblarse en partículas (Alfadhli *et al.*, 2009; Chukkapalli *et al.*, 2010).

4.3. La proteína cápside

Las proteínas CA retrovirales son polipéptidos de aproximadamente 24-27 kDa formados por dos dominios con α -hélices que se pliegan de manera independiente, un dominio N-terminal (NTD) y otro C-terminal (CTD), conectados entre sí por un interdominio flexible (Campos-Olivas *et al.*, 2000). Si bien los dominios CA de las proteínas Gag retrovirales exhiben escasa similitud de secuencia, a excepción de una pequeña región altamente conservada de aproximadamente 20 aminoácidos denominada región de principal homología (*Major homology region*, MHR) (Swanstrom & Wills, 1997), las estructuras en solución de las CA retrovirales presentan una organización muy similar (Campos-Olivas *et al.*, 2000). Numerosos estudios estructurales de la proteína CA de HIV-1 establecieron que el NTD presenta una forma de cabeza de flecha, con siete α -hélices (numeradas de 1 a 7) y una horquilla β amino-terminal, mientras que el dominio CTD es globular con una hélice 3_{10} de único giro y cuatro α -hélices cortas (numeradas de 8 a 11) (Bharat *et al.*, 2012; Byeon *et al.*, 2009; Gamble *et al.*, 1997; Ganser-Pornillos *et al.*, 2007; Gitti *et al.*, 1996; Pornillos *et al.*, 2011).

Estudios de microscopía electrónica mostraron que la estructura cónica de la cápside madura de HIV-1 es una red hexagonal compuesta por anillos hexaméricos de la proteína CA en la que 12 anillos pentaméricos posibilitan que

el cono se cierre en ambos extremos (Sundquist & Hill, 2007). De este modo, la superficie de la cápside madura de HIV-1 consiste de anillos hexaméricos y pentaméricos formados por los NTDs de la CA, los cuales se hallan estabilizados a través de interacciones NTD-NTD, y donde cada anillo está asociado al hexámero vecino mediante la dimerización de los CTDs de la proteína CA (Byeon *et al.*, 2009; Ganser-Pornillos *et al.*, 2007). Además, las interacciones intermoleculares adicionales NTD-CTD y CTD-CTD de la CA contribuyen a estabilizar la estructura de la cápside madura en los viriones (Ganser-Pornillos *et al.*, 2007; Pornillos *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013).

La proteína CA juega un papel importante en la morfogénesis lentiviral: como dominio central de la poliproteína Gag, la CA participa de las múltiples interacciones proteína-proteína que conducen a la multimerización de Gag en partículas (Briggs *et al.*, 2009; de Marco *et al.*, 2010; Rauddi *et al.*, 2011; von Schwedler *et al.*, 2003), mientras que ya como proteína independiente, la CA se autoensambla en la estructura cónica de *core* que protege a los componentes del virión necesarios para las siguientes etapas de infección y replicación (Forshey *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2001; von Schwedler *et al.*, 2003).

Una propiedad biológica única de las proteínas CA es la de autoensamblarse *in vitro* en matrices tubulares con una simetría similar a la de la cápside madura (Campbell & Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1997). En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que la proteína CA de SIV se autoensambla *in vitro* en estructuras multiméricas que corresponden a hexámeros formados por el NTD que se hallan unidos por dimerización del CTD de la CA de SIV (Rauddi *et al.*, 2011).

Los resultados de estudios de mutagénesis dirigida de la CA de HIV-1 (von Schwedler *et al.*, 2003) junto con las conclusiones obtenidas de la tomografía crioeléctrica de partículas inmaduras de HIV-1 (Briggs *et al.*, 2009) indican que tanto el NTD como el CTD de la CA son importantes para el ensamblado de partículas virales. Este concepto ha sido extendido por nuestro laboratorio a FIV al analizar el fenotipo de ensamblado de proteínas Gag de este virus con mutaciones en el dominio CA (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014).

Por otro lado, mutaciones que afectan al dominio MHR de la CA anulan la formación de partículas de HIV-1 (Mammano *et al.*, 1994), de SIV (Rauddi *et al.*,

2011) y de FIV (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014). Asimismo, se ha observado que distintas mutaciones y deleciones en la porción carboxilo de la CA de HIV-1 afectan la incorporación de Gag-Pol en las partículas virales así como también la expresión de la RT (Huang & Martin, 1997). Finalmente, se ha demostrado en HIV-1 que la proteína CA está involucrada en las etapas tempranas del ciclo de vida viral; básicamente, en el desnudamiento del virión y en la importación a núcleo del PIC (Fassati, 2012; Forshey *et al.*, 2002; Krishnan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; von Schwedler *et al.*, 2003).

4.4. La proteína nucleocápside

La principal función del dominio NC de la poliproteína Gag es mediar la encapsidación selectiva del ARN genómico en los viriones a través de su interacción con la señal de empaquetamiento presente en el extremo 5' del genoma viral (Jewell & Mansky, 2000). Los dominios de la NC responsables de la encapsidación del genoma viral son los dos motivos Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys (CCHC) denominados "dedos de zinc" similares a los motivos presentes en varias proteínas celulares con capacidad de unir ácidos nucleicos (Jewell & Mansky, 2000).

Estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos han establecido que la interacción NC-ARN es importante para el ensamblado retroviral (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014; Cimorelli *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Manrique *et al.*, 2004b; Muriaux *et al.*, 2001; Zhang & Barklis, 1997; Zhang *et al.*, 1998). A este respecto, nuestro grupo también demostró que el ensamblado *in vitro* de las proteínas Gag de SIV y de FIV es dependiente de la presencia de ARN en la reacción de multimerización de la proteína (Affranchino & González, 2010; Rauddi *et al.*, 2011). Otros grupos alcanzaron las mismas conclusiones trabajando con la proteína Gag de HIV-1 (Campbell & Rein, 1999; Huseby *et al.*, 2005; Morikawa *et al.*, 1999). En particular, nuestro grupo de trabajo demostró que la sustitución en la NC de FIV de la primera cisteína del motivo "dedo de zinc" amino terminal por serina reduce drásticamente tanto el ensamblado de los viriones como el empaquetamiento del ARN genómico (Manrique *et al.*, 2004b).

Además de su rol en el empaquetamiento del genoma viral, la proteína NC facilita la dimerización del ARN genómico, promueve la asociación del iniciador ARN^{t^{Lys}} a su sitio de unión en la cadena de ARN genómico, y participa en las etapas tempranas de la retrotranscripción que conducen a la síntesis del ADN proviral (Allain *et al.*, 1994; Darlix *et al.*, 1990).

4.5. Dominio carboxilo de las poliproteínas Gag de HIV, SIV y FIV

Como ya se explicó, la principal función del dominio p6, presente únicamente en las proteínas Gag de los lentivirus de primates, es mediar la brotación de las partículas virales (Bieniasz, 2006). Esta actividad de p6 depende del motivo PT/SAP, el cual recluta a TSG101, una proteína celular que forma parte de ESCRT-I, la cual participa normalmente en la brotación de vesículas hacia el lumen endosomal (Garrus *et al.*, 2001; Martin-Serrano *et al.*, 2001; VerPlank *et al.*, 2001). Por otra parte, el factor celular ALIX se une al motivo aminoacídico YP(X)_nL en el extremo carboxilo de Gag (HIV-1 y EIAV) o al dominio NC (el resto de los lentivirus), lo que resulta en la asociación de Gag con el complejo ESCRT-III. La unión de Gag al complejo ESCRT-III, facilitada por una ubiquitina ligasa similar a NEDD4, conduce a la activación y polimerización del complejo ESCRT-III en una estructura que promueve el proceso de brotación de los viriones (Sundquist & Kräusslich, 2012). El complejo ESCRT-III también recluta a las ATPasas VPS4, las cuales, una vez que las partículas virales se escinden de la membrana, desorganizan la estructura multimérica formada por ESCRT-III de manera que sus componentes se reciclen al citoplasma (Sundquist & Kräusslich, 2012).

Resulta interesante mencionar aquí el hallazgo de nuestro grupo de trabajo acerca de que si bien la proteína Gag de FIV carece del péptido p6, su dominio p2 C-terminal exhibe el motivo PSAP cuya mutación inhibe la producción de viriones (Manrique *et al.*, 2004b). De hecho, recientemente mostramos que la poliproteína Gag Δ p2 de FIV, que carece del dominio p2 C-terminal, actúa como mutante transdominante negativa formando con el precursor Gag salvaje complejos multiméricos no funcionales incapaces de ensamblarse en partículas extracelulares (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014), lo cual demuestra el rol biológico del péptido p2 en el ensamblado de los viriones de FIV.

Cabe destacar que el dominio MA del precursor Gag de SIV exhibe la particularidad de contener el motivo aminoacídico PTAP en su región carboxilo, además del presente en el dominio p6. El hecho que la expresión de la proteína MA de SIV en células de mamífero resulta en la producción de partículas pseudovirales extracelulares (González *et al.*, 1993) es una fuerte evidencia del rol como dominio tardío del motivo PTAP de la MA de SIV (Affranchino & González, 2014).

Objetivos

Estudios realizados en HIV-1 (Briggs *et al.*, 2009; Ganser-Pornillos *et al.*, 2008) y en SIV por nuestro laboratorio (Rauddi *et al.*, 2011) indican que la proteína CA cumple por lo menos dos roles diferentes según forme parte del precursor Gag o se halle como proteína madura en el virión. Como dominio de Gag, la CA participa de las interacciones proteína-proteína que conducen a la oligomerización de Gag en partículas, mientras que al formar el *core* viral de la partícula madura, la CA preserva la integridad de los componentes virales que iniciarán la retrotranscripción en el siguiente ciclo viral. El dominio CA de Gag participa también en fases tempranas del ciclo de replicación viral, tales como el desnudamiento del virión y la importación a núcleo del complejo de preintegración (Fassati, 2012). Estas características de las proteínas CA lentivirales hacen especialmente atractivo su estudio y las convierten en un blanco antiviral potencial contra el cual diseñar inhibidores de eventos tempranos y tardíos del ciclo de replicación lentiviral.

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han centrado casi exclusivamente en la proteína CA de HIV-1. En cambio, la información disponible sobre las proteínas CA de SIV y de FIV es escasa.

Si bien los virus SIV y FIV presentan similitudes a nivel de morfología, patogenicidad y de algunos aspectos de su ciclo de vida, estos lentivirus exhiben también diferencias significativas a nivel genético y replicativo (Affranchino & González, 2014).

El intercambio de dominios aminoacídicos entre proteínas equivalentes de virus relacionados filogenéticamente constituye una estrategia eficaz para identificar elementos funcionales que son esenciales para la replicación viral (Manrique *et al.*, 2004a). Teniendo en cuenta este concepto, y dado que las proteínas CA de SIV y de FIV han sido escasamente estudiadas, el objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue establecer la relación estructural y funcional entre las CA de estos dos lentivirus e investigar si las regiones estructuralmente distintivas de la CA de SIV pueden ser reemplazadas funcionalmente por sus respectivas contrapartes de la CA de FIV. Para ello, se generaron virus quiméricos SIV en los que se sustituyó parcial o totalmente su dominio CA por el de FIV para luego comparar el fenotipo de los virus quiméricos con el de SIV salvaje.

En base a lo planteado, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Analizar el fenotipo de los virus quiméricos resultantes en cuanto a: (a) la síntesis y el procesamiento de las poliproteínas Gag quiméricas; (b) su capacidad de ensamblarse en partículas extracelulares; (c) su capacidad de empaquetar el ARN genómico viral; (d) su capacidad de incorporar una RT funcional; y (e) su capacidad de incorporar la glicoproteína Env.
- ❖ Determinar la capacidad infectiva de los virus quiméricos SIV-FIV, tanto en las células indicadores TZM-bl como en las células permisivas 293T.

Materiales y Métodos

1. Células y virus

Las líneas celulares 293T (de riñón humano) y TZM-bl (HeLa-CD4-CCR5-LTR_{HIV-1}- β -gal/LTR_{HIV-1}-luciferasa) (Wei *et al.*, 2002), obtenida del programa de reactivos para SIDA de los Institutos Nacionales de Salud de los E.E.U.U. (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*), fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (HyClone), aminoácidos no esenciales (GIBCO) y solución de antibiótico-antimicótico (GIBCO) conteniendo penicilina (100 U/ml), anfotericina B (250 ng/ml) y estreptomycin a (100 μ g/ml).

2. Sueros y anticuerpos

Para la detección de las proteínas Gag salvaje de FIV y Gag quiméricas llevando regiones derivadas de la CA de FIV, se empleó el anticuerpo monoclonal (MAb) PAK3-2C1 dirigido a la proteína CA de FIV, obtenido del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*. El MAb KK60, específico de la CA de SIV, así como el MAb KK41 anti-gp41 de SIV, fueron obtenidos a través del *MRC AIDS Directed Program* (Reino Unido). Para la detección de la proteína MA de SIV se usó un suero policlonal de ratón anti-MA de SIV generado en nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2008). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP; Promega).

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100 μ l conteniendo 60 mM Tris-SO₄ (pH 9,1 a 25 °C); 18 mM (NH₄)₂SO₄; 1,6 mM MgSO₄; 200 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP); 0,4 μ M de los oligonucleótidos iniciadores sentido y antisentido; 50-100 ng de ADN molde; y 2 μ l de la ADN polimerasa termoestable *Elongase* que tiene actividad exonucleolítica 3'→5' (*Elongase Enzyme Mix*, Thermo Fisher Scientific-Invitrogen). Las mezclas de reacción fueron desnaturizadas durante 5 minutos a 94 °C y luego sometidas a 30 ciclos de 3 etapas: desnaturización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 60 segundos y elongación a 68 °C (60 segundos por

cada kb de producto a amplificar). Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico *MiniCycler* (MJ Research, Inc.). Previamente a su purificación, los productos de PCR fueron tratados con proteinasa K (100 µg/ml) a 37 °C durante 2 horas e incubados luego a 68 °C por 10 minutos para inactivar la proteasa.

4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las electroforesis de los ADNs se realizaron en geles de agarosa en buffer TBE (90 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA [pH 8,3]) aplicando corriente constante. Las bandas de ADN se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y posterior transiluminación con luz ultravioleta.

5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Alternativamente, algunos productos de PCR fueron purificados por el método de Tautz y Renz (1983). Una vez realizada la electroforesis, las bandas de ADN de interés se cortaron del gel y se incubaron en una solución de 0,3 M acetato de sodio (pH 7,0) durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, el fragmento de agarosa equilibrado en buffer acetato se introdujo en un microtubo de 500 µl con un orificio en el fondo del mismo cubierto con lana de vidrio. Luego de congelar el tubo de 500 µl conteniendo el fragmento de agarosa a -80 °C, éste se introdujo en un microtubo de 1,5 ml y el dispositivo se centrifugó durante 10 minutos a 16.000 xg. La agarosa queda retenida en la lana de vidrio mientras que la solución conteniendo el ADN pasa al tubo de 1,5 ml. El ADN se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, se recuperó por centrifugación durante 20 minutos a 16.000 xg, y se resuspendió en agua bidestilada esterilizada.

6. Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos se realizaron en un volumen final de 10 µl utilizando 0,5 unidades de la T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen) en buffer de ligación (50 mM Tris-HCl [pH 7,6]; 10 mM MgCl₂; 1mM ditioneitol [DTT]; 1 mM ATP y 5% [p/v] polietilenglicol 8000). Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16 °C.

7. Transformación de bacterias competentes

Las reacciones de ligación y las construcciones plasmídicas generadas durante el desarrollo de este trabajo se transformaron en bacterias competentes *Escherichia coli* cepa **Stbl2** [*F*⁻ *mcrA* (Δ *mcrBC*-*hsdRMS*-*mrr*) *recA1* *endA1* *lon* *gyrA96* *thi-1* *supE44* *relA1* λ ⁻ Δ (*lac*-*proAB*)] (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen), o en la cepa **BL21(DE3)** [*E. coli* B *F*⁻ *dcm* *ompT* *hsdS* (*rB*⁻, *mB*⁻) *gal* λ (DE3)] (Stratagene). La preparación de las bacterias competentes se realizó según el protocolo de Hanahan (1983).

La cepa **Stbl2** de *E. coli* fue utilizada para la transformación y propagación de los plásmidos llevando los diferentes ADN provirales derivados de SIV y FIV debido al alto grado de inestabilidad de las secuencias retrovirales durante el proceso de clonado molecular (Trinh *et al.*, 1994).

Para la transformación de las bacterias competentes, éstas se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron luego en hielo durante 10 minutos. Se agregaron 50 µl de estas bacterias a cada reacción de ligación y las muestras se incubaron 30 minutos en hielo, 60 segundos a 42 °C, y finalmente, 2 minutos en hielo. Las bacterias transformadas se incubaron en presencia de 200 µl de medio Luria-Bertani (LB) durante 90 minutos a 30 °C en el caso de las *E. coli* **Stbl2**, o por 60 minutos a 37 °C al emplearse la cepa **BL21**. Las mezclas de transformación se plaquearon en medio LB-1,5% agar conteniendo, de acuerdo al vector de clonado, 100 µg/ml de ampicilina o 30 µg/ml de kanamicina para la selección de los clones recombinantes. Las placas de Petri se incubaron a 30 °C (cepa **Stbl2**) o a 37 °C (cepa **BL21**) durante 16-18 horas.

8. Purificación de ADN plasmídico

Las preparaciones en pequeña escala de ADN plasmídico de los clones obtenidos en las transformaciones de bacterias competentes se realizaron siguiendo el método de lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981). Los ADNs plasmídicos fueron sometidos a un mapeo con enzimas de restricción para identificar los diferentes ADN provirales quiméricos. Las construcciones plasmídicas fueron luego verificadas por secuenciación automática utilizando el servicio de Macrogen Inc (Corea).

Los ADN plasmídicos utilizados para las transfecciones fueron purificados utilizando el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN).

9. Transfecciones

Las células 293T, crecidas en placas de 35 mm de diámetro, fueron transfectadas con 4 µg de ADN plasmídico utilizando *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen) como ya ha descrito nuestro laboratorio (Celma *et al.*, 2004). A las 48 horas postransfección, se prepararon los lisados de las células transfectadas, y los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados a través de membranas de 0,45 µm de poro. Los sobrenadantes de cultivo libres de células fueron utilizados como stocks virales para los ensayos de infectividad (secciones 14 y 17 de Materiales y Métodos), o sometidos a ultracentrifugación para purificar viriones (sección 11 de Materiales y Métodos).

Los stocks de virus pseudotipificados con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) se obtuvieron por cotransfección de células 293T con cada uno de los ADN provirales y el plásmido pcDNA que codifica para la proteína VSV-G en una proporción de masa 1:1 como ya hemos publicado (Manrique *et al.*, 2003).

Para los experimentos de coexpresión de SIV_{SMM-PBj} salvaje con el virus FIV-14(ΔU3) en células 293T, los ADN provirales correspondientes fueron cotransfectados en una relación de masa de 1:1. El plásmido pcDNA-FIV(ΔU3), que lleva el ADN proviral de FIV-14 del cual se eliminó la región U3 de la LTR 5', fue generado en nuestro laboratorio de manera de expresar el genoma de FIV en células humanas directamente bajo el control del promotor del citomegalovirus

humano que lleva el vector pcDNA 3.1 (Celma *et al.*, 2007).

10. Construcciones de ADNs provirales quiméricos

Todas las quimeras se generaron reemplazando diferentes secuencias de la región codificante para CA-SP1-NC del clon proviral infectivo SIV_{SMM-PBj} (Celma *et al.*, 2004) con las secuencias equivalentes del clon molecular FIV-14 del aislamiento Petaluma de FIV (Celma *et al.*, 2007). Las regiones codificantes de la CA de SIV y FIV fueron empalmadas de manera de mantener la distancia entre los residuos Pro1 y Asp50 (Asp51 en la CA de HIV-1), ya que se ha demostrado que estos aminoácidos forman un puente salino en la proteína CA madura de HIV-1 (von Schwedler *et al.*, 1998).

Para generar la quimera SIV_{FIV CA}, el fragmento de ADN amplificado correspondiente a los nt 601-1272 de SIV fue ligado al ADN codificante para los residuos 14 a 222 de la CA de FIV (nt 1072-1698 del genoma de FIV-14). El fragmento resultante fue luego ligado a la región de SIV que comprende los últimos seis aminoácidos de la CA, SP1, NC, SP2 y parte del dominio p6 de Gag de SIV (nt 1905-2190 de SIV_{SMM-PBj}).

En el caso de la región quimérica SIV_{FIV CA-p1}, las secuencias de FIV correspondientes a los residuos 14-222 de la CA y el péptido espaciador p1 (nt 1072-1725) fueron ligadas a la secuencia correspondiente al codón Gly11 de SP1 de gag de SIV (nt 1954 de SIV_{SMM-PBj}).

Para la construcción del ADN proviral quimérico SIV_{FIV CA(NTD)}, la región correspondiente a la LTR y la MA de SIV (nt 601-1233) se empalmó con las secuencias codificantes para los residuos Pro1-Ala 142 (nt 1033-1458 de FIV-14). El producto de ligación fue amplificado por PCR y luego unido a las secuencias codificantes para el CTD de la CA de SIV (Leu150 a Met230) junto con la región 3' de gag (nt 1681-2190 de SIV_{SMM-PBj}).

La quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} fue construida ligando secuencialmente los siguientes fragmentos de ADN amplificados por PCR: el ADN de 633 pb que comprende la región LTR y la MA de SIV_{SMM-PBj} mencionado arriba, un fragmento que abarca la región para la CA completa, el péptido espaciador p1 y los primeros 9 aminoácidos de la NC de FIV (nt 1033-1752 de FIV-14), y un fragmento de ADN

derivado de SIV que codifica para los residuos 11 a 52 del dominio NC junto con las secuencias 3' de *gag* (nt 2005-2190).

La quimera SIV_{FIV CA(CTD)}, en la cual el CTD de la CA de SIV fue sustituido por el de FIV en el contexto del genoma de SIV_{SMM-PBj}, se generó ligando primero las secuencias de SIV que incluyen las regiones LTR, MA, y los primeros 151 residuos de la CA (nt 601-1686) a la región de FIV que codifica para los aminoácidos 145-222 de la CA (nt 1465-1698 de FIV-14). El ADN resultante fue reamplificado por PCR y luego ligado al fragmento que comprende los últimos seis residuos de la CA de SIV y las secuencias 3' de *gag* (nt 1906-2190).

Todos los fragmentos quiméricos fueron digeridos con las enzimas de restricción DraIII y Bsu36I y utilizados para sustituir la región salvaje DraIII-Bsu36I (nt 1214-2190) en el ADN genómico proviral de SIV_{SMM-PBj}. Las construcciones provirales quiméricas fueron primero analizadas por mapeo con enzimas de restricción y luego secuenciadas para confirmar que los marcos de lectura fueran correctos.

A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestra de manera esquemática una de las estrategias metodológicas aplicadas para construir los ADN provirales de los SIV quiméricos.

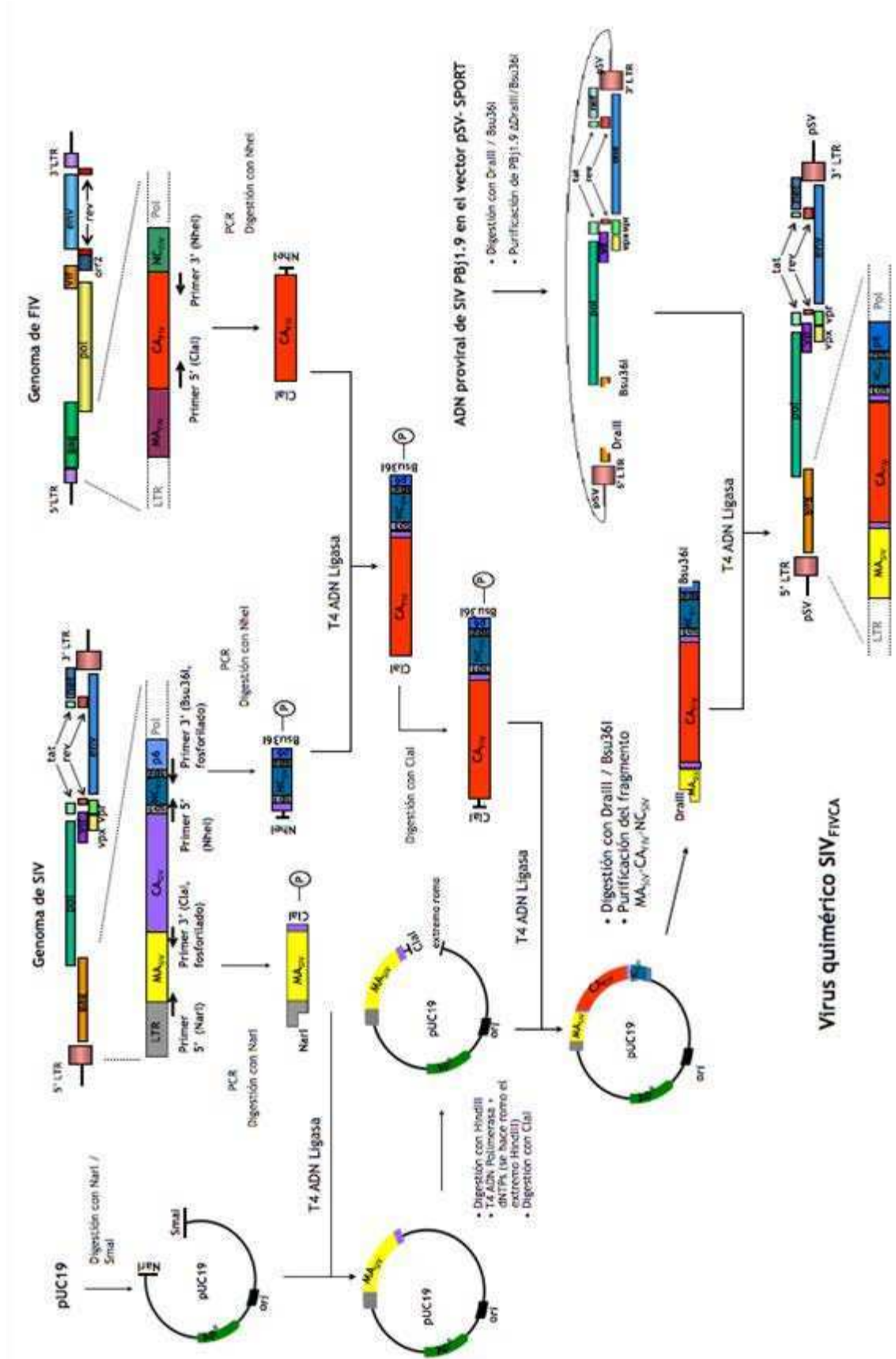


Figura 5. Construcción de ADN provirales de SIV quiméricos llevando diferentes regiones del dominio CA de FIV. A modo de ejemplo, se esquematiza la estrategia seguida para la construcción del virus quimérico SIV_{FIVCA}.

11. Preparación de lisados celulares y purificación de partículas virales

A las 48 horas postransfección, las células 293T se lavaron dos veces con solución salina de buffer fosfato (PBS) fría y se lisaron a 4 °C durante 20 minutos en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,1% dodecil sulfato de sodio [SDS]; 0,5% desoxicolato de sodio; 1 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonilo [PMSF] y 10 µg/ml de aprotinina). Los lisados se centrifugaron a 16.000 xg durante 5 minutos para remover los restos celulares, y los sobrenadantes resultantes se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

Para purificar la fracción de viriones a partir del medio de cultivo de las células transfectadas con los ADNs provirales, los sobrenadantes de cultivo libres de células fueron sometidos a ultracentrifugación (100.000 xg, 90 minutos, 4 °C) a través de un colchón de sacarosa 20% (p/v en PBS) de acuerdo a lo descrito previamente por el laboratorio (Affranchino & González, 2006).

12. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Las proteínas virales presentes en las células transfectadas o en los viriones fueron separadas por electroforesis en geles de 12,5% o 15% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al sistema descrito por Laemmli (1970). La electroforesis se realizó en buffer conteniendo 25 mM Tris base; 250 mM glicina; y 0,1% SDS (Laemmli, 1970).

13. Ensayos de Western blot

Las proteínas virales resueltas en geles 12,5% o 15% poliacrilamida-0,1% SDS fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (*HyBond ECL*, GE Life Sciences) utilizando el sistema *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc) en un buffer conteniendo 25 mM Tris base; 192 mM glicina; 20% metanol, y aplicando un voltaje constante de 10 V durante 60 minutos. Las membranas se bloquearon primero durante toda la noche a 4 °C en buffer PBS-0,1% Tween 20 (PBS-T) conteniendo 5% seroalbúmina bovina (BSA) y posteriormente se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo primario (diluido en PBS-T conteniendo 3% BSA). Luego de cuatro lavados con PBS-T, las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-inmunoglobulinas

de ratón conjugado a HRP (dilución 1:1000 en PBS-T; 3% BSA). Las reacciones antígeno-anticuerpo se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific). Las señales de quimioluminiscencia se detectaron por exposición de las membranas a películas *Hyperfilm ECL* (GE Life Sciences) durante diferentes períodos de tiempo.

14. Ensayos de actividad de RT

La cuantificación de la RT asociada a los viriones extracelulares presentes en los sobrenadantes de las células transfectadas se llevó a cabo utilizando el kit comercial colorimétrico para RT (Roche Applied Science) como describió previamente el laboratorio (Affranchino & González, 2006; Manrique *et al.*, 2003).

Brevemente, alícuotas de los sobrenadantes de cultivo libres de células, previamente lisados con Tritón X-100, se mezclaron con el buffer de reacción conteniendo nucleótidos marcados con digoxigenina y un cebador híbrido poli(rA).oligo(dT)₁₅, e incubaron por 2 horas a 37 °C. El ADN sintetizado fue detectado usando IgG de oveja anti-digoxigenina conjugada a HRP y el sustrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). La señal colorimétrica resultante de la reacción fue medida en un lector de ELISA a 405 nm (longitud de onda de referencia de 490 nm). Las absorbancias de las muestras fueron luego referidas a la curva de calibración obtenida con la enzima RT recombinante de HIV-1 provista en el kit. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado a partir de tres experimentos independientes.

15. Ensayo de replicación viral en células 293T

Para evaluar la capacidad replicativa de los virus quiméricos en células no restrictivas, se infectaron células 293T con los pseudotipos de SIV salvaje o virus quiméricos llevando la VSV-G, normalizados por actividad de RT y por nivel de la proteína MA de SIV (previamente tratados con DNasa I por 20 minutos a 25 °C para eliminar el ADN plasmídico que potencialmente pudiera contaminar el inóculo). Luego de un período de adsorción viral en presencia de 20 µg/ml de DEAE-dextrano de 2-3 horas a 37 °C y en atmósfera de 5% CO₂, las células

infectadas fueron sedimentadas, lavadas dos veces con PBS para eliminar el virus residual, y resuspendidas en medio fresco. Como control, se incubaron en paralelo células 293T con un stock del virus defectivo SIV_{SMM-PBj}-*env*(-). A las 48 horas posinfección, las células fueron fraccionadas en alícuotas de $2-3 \times 10^6$, y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización para purificar ADN celular total o ADN de bajo peso molecular como se explica en la sección siguiente.

16. Aislamiento de ADN y detección de intermediarios de la replicación viral (forma circular 1-LTR)

El ADN celular total fue purificado utilizando el sistema *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Life Sciences) de acuerdo al protocolo recomendado por la compañía. Las reacciones de amplificación para el gen de la β -actina, incluido como control interno tanto de la cuantificación de ADN como de la eficiencia de PCR, se llevaron a cabo con 300 ng de ADN genómico en 50 μl de reacción en presencia del 1X buffer de reacción Q5 (New England Biolabs); 200 μM dNTPs; 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador (5'- β -actina, 5'-CATGTGCAAGGCCGGCTTCGC-3' y 3'- β -actina, 5'-CCTTAATGTCACGCACGA TTTCC -3' que hibridan en el primer y tercer exón del gen humano de la β -actina, respectivamente); y 1 U de *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Luego de 5 minutos de incubación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, se realizaron 25 ciclos de amplificación de 20 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 25 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguidos de una etapa final de elongación a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos.

El procedimiento para la detección de las formas circulares de ADN viral no integrado se basó en la estrategia descrita por Cara *et al.* (2004). El ADN de bajo peso molecular fue aislado a partir de las células infectadas empleando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), y luego utilizado como molde en las reacciones de amplificación. Las formas circulares 1-LTR fueron detectadas usando un cebador *gag* antisentido (5'-CTCCACTCTCCTACTCTTTTCTC -3'; nt 828-805 de SIV_{SMM-PBj}) y un cebador *env* sentido (5'-TGGCTATTGAGGAAGTCC-3'; nt 8763-8781 de SIV_{SMM-PBj}). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la Q5 ADN polimerasa termoestable como se describió arriba utilizando 5 μl de ADN de bajo peso molecular como molde y los siguientes parámetros: 35 ciclos de 20 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,

60 segundos a 72 °C y una etapa final de elongación de 2 minutos a 72 °C. Los productos de PCR fueron luego analizados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. En el caso de las reacciones de amplificación para las formas circulares 1-LTR, los productos de PCR fueron mapeados en primer lugar por digestiones con endonucleasas de restricción y luego clonados en el sitio EcoRV del vector pcDNA3.1 para su posterior secuenciación.

17. Ensayo de infectividad en células indicadoras TZM-bl

Los stock virales obtenidos por transfección de células 293T fueron normalizados por actividad RT y utilizados para infectar por duplicado 4×10^4 células TZM-bl en placas de 24 pocillos como fue descrito previamente por nuestro laboratorio (Celma *et al.*, 2004; González *et al.*, 2012). A las 48 horas posinfección las células se fijaron con buffer PBS conteniendo 1% formaldehído y 0,2% glutaraldehído a temperatura ambiente por 5 minutos, y se determinó la formación de focos azules luego de la tinción con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal). Los eventos de entrada viral fueron cuantificados como el número total de células azules por pocillo. Para ello, se contaron primero las células azules en por lo menos 20 campos no superpuestos de cada duplicado y el promedio de células azules por campo se multiplicó por el número total de campos que forman un pocillo. El resultado obtenido para cada virus quimérico fue referido al número total de células azules obtenido con SIV_{SMM-PBJ} salvaje.

18. Empaquetamiento de ARN genómico viral en viriones

El ARN genómico viral fue aislado a partir de los viriones purificados por ultracentrifugación de los sobrenadantes de cultivo de las células 293T transfectadas según se describió en la sección 11. Brevemente, se incubaron cantidades equivalentes de viriones (normalizados en base a los niveles de la proteína MA de SIV) con 5 U de DNasa I (*RNase-free DNase I RQ1*; Promega) en una solución buffer conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM MgCl₂ y 1 mM CaCl₂ por 1 hora a 37 °C y posteriormente se trataron con proteinasa K (50 μ g/ml; 1 hora a 37 °C) en presencia de 0,5% SDS. Luego de la etapa de inactivación por

calor, las muestras fueron desproteinizadas mediante dos extracciones con fenol-cloroformo, y el ARN fue concentrado por precipitación con etanol absoluto, previo agregado de 10 µg de ARNt de levadura para facilitar la precipitación del ARN genómico viral. Las muestras de ARN fueron utilizadas por duplicado como molde en la reacción de RT acoplada a PCR semicuantitativa (RT-sqPCR) basada en el protocolo descrito anteriormente por el laboratorio (Affranchino & González, 2010). La reacción de RT se realizó usando la enzima *SuperScript II RT* (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen) y un cebador antisentido que hibrida en los nt 967-987 de SIV_{SMM-PBj}, mientras que la etapa posterior de PCR (20, 25, y 30 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos; a 56 °C por 30 segundos; y a 72 °C por 60 segundos) se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido 5' que corresponde a los nt 589-611 del genoma de SIV_{SMM-PBj} y el oligonucleótido 3' utilizado en el primer paso de la reacción de RT. Los experimentos piloto iniciales de la reacción de RT-sqPCR se llevaron a cabo para determinar el número de ciclos necesarios para alcanzar la fase exponencial. Se realizaron sistemáticamente reacciones control sin el agregado de la enzima RT utilizando como molde la misma cantidad de ARN genómico viral de manera de descartar cualquier posible contaminación con ADN. Los productos de las reacciones de RT-PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2% y cuantificados por densitometría de los geles teñidos con bromuro de etidio (Affranchino & González, 2010).

19. Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes derivadas de la CA de FIV

Las regiones codificantes para la CA de FIV (nt 1033-1698 de FIV-14) y el CTD de la CA de FIV (CTD-CA_{FIV}; aminoácidos Ala137 a Leu222; nt 1441-1698 de FIV-14) fueron amplificadas por PCR y clonadas en los sitios Sall-NotI o NcoI-NotI del vector pET-30b(+), respectivamente, de modo de expresar los polipéptidos correspondientes con una etiqueta N-terminal de seis histidinas. Ambos polipéptidos fueron producidos en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* por inducción con 1 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido. Luego de 4 horas de incubación a 37 °C, las bacterias fueron sedimentadas, y lisadas en buffer fosfato frío (100 mM fosfato de sodio [pH 8]; 300 mM NaCl; 1 mM imidazol e inhibidores de proteasas [Roche Applied Science]), en presencia de 1 mg/ml de lisozima,

mediante incubación en hielo durante 30 minutos. Luego del tratamiento con DNasa I (5 µg/ml), los lisados bacterianos fueron sonicados, y los polipéptidos recombinantes llevando la etiqueta N-terminal de histidinas fueron purificados a partir de los extractos clarificados por cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel-ácido nitrilotriacético (*Ni-NTA kit*; QIAGEN) como ya ha sido descrito por nuestro laboratorio previamente (Affranchino & González, 2010; Manrique *et al.*, 2008; Rauddi *et al.*, 2011). Para eliminar la etiqueta de histidinas del polipéptido His-CTD-CA_{FIV}, la proteína recombinante purificada se incubó con 0,006% (m/m) de enteroquinasa (New England Biolabs) durante 16 horas a 23 °C; seguidamente, la proteasa se eliminó de la solución por inmunoafinidad (*Enterokinase removal kit*, SIGMA-ALDRICH), y, finalmente, se realizó una segunda cromatografía de afinidad. Las preparaciones de proteína fueron posteriormente dializadas contra 50 mM fosfato de sodio (pH 7,2). Todas las preparaciones de proteínas recombinantes exhibieron una pureza superior al 90% de acuerdo a los resultados obtenidos por tinción de los geles de poliacrilamida con Coomassie Blue. Las concentraciones de las proteínas recombinantes fueron estimadas por comparación con cantidades conocidas de BSA en geles de SDS-poliacrilamida teñidos con Coomassie G-250 *SimplyBlue Safe Stain* (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Finalmente, la cuantificación de las proteínas se realizó por densitometría de los geles como se ha descrito previamente (Affranchino & González, 2010; Manrique *et al.*, 2008; Rauddi *et al.*, 2011).

20. Reacciones de ensamblado *in vitro*

Las reacciones de ensamblado *in vitro* se llevaron a cabo esencialmente de acuerdo a lo descrito anteriormente por el laboratorio (Affranchino & González, 2010; Rauddi *et al.*, 2011). Las proteínas recombinantes purificadas CTD-CA_{FIV} fueron incubadas en una solución buffer conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 M NaCl, 5 mM DTT durante 16 horas a 8 °C. Las reacciones de ensamblado fueron directamente sembradas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes o analizadas mediante ensayos de sedimentación (Affranchino & González, 2010; Huseby *et al.*, 2005; Rauddi *et al.*, 2011). Para los ensayos de sedimentación, las reacciones de ensamblado fueron primero centrifugadas durante 1 hora en una microcentrífuga a 16.000 xg a 4 °C para separar las estructuras ensambladas en

partículas de las moléculas no ensambladas. Las fracciones pellet y sobrenadante se resolvieron luego por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y las proteínas se visualizaron utilizando el MAb anti-CA de FIV, o por tinción con Coomassie Blue.

21. Análisis de las proteínas recombinantes derivadas de la CA de FIV por electroforesis en geles nativos

El estado oligomérico de los polipéptidos CA de FIV y CTD-CA_{FIV} fue examinado por electroforesis en geles de 5% poli acrilamida no desnaturizantes de acuerdo al procedimiento ya descrito por nuestro laboratorio (Rauddi *et al.*, 2011), seguido de tinción con Coomassie Blue o de ensayos de Western blot utilizando el MAb específico para la CA de FIV. Las masas moleculares de los complejos multiméricos formados por las proteínas CA de FIV y CTD-CA_{FIV} fueron estimadas en base a la movilidad relativa de los estándares de peso molecular para electroforesis nativa (*High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis*, GE Life Sciences).

Resultados

1. Construcción de ADNs provirales de SIV llevando distintas regiones del dominio CA de FIV

Al analizar las secuencias primarias de las proteínas CA de SIV y de FIV se observa que éstas exhiben una organización similar: un NTD de 151 residuos para SIV y de 144 aminoácidos para FIV; y un CTD, que incluye la región MHR, cuya longitud es de 79 y 78 residuos para SIV y FIV, respectivamente. Sin embargo, las proteínas CA de SIV y de FIV sólo presentan 30% de identidad y 52% de similitud a nivel aminoacídico (Figura 6). Por lo tanto, con el objeto de investigar la relación funcional entre los dominios CA de estos dos lentivirus filogenéticamente distantes, generamos una serie de ADNs provirales de SIV_{SMM-PBj} llevando diferentes secuencias codificantes de la CA de FIV_{PETALUMA} (Figura 7).

En el virus quimérico SIV_{FIV CA} los primeros trece residuos de la CA de SIV fueron empalmados con la secuencia que codifica para los aminoácidos 14-222 de la CA de FIV, sin eliminar la secuencia correspondiente a los seis residuos C-terminales de la CA de SIV de manera de asegurar el correcto procesamiento por la proteasa viral de los sitios de clivaje MA-CA y CA-SP1. Esta poliproteína quimérica nos permitió investigar si la CA de FIV es capaz de reemplazar tanto funcional como estructuralmente a la CA de SIV en el contexto del virus SIV_{SMM-PBj}.

Para examinar cómo el ensamblado de las poliproteínas Gag de SIV quiméricas puede ser modulado por las secuencias de FIV contiguas al extremo carboxilo del dominio CA, se construyeron dos ADNs provirales quiméricos: (a) SIV_{FIV CA-p1}, en el cual el péptido espaciador p1 de FIV se empalmó con los últimos siete residuos de SP1 de SIV; y (b) SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}, en el cual las secuencias de FIV que codifican para el dominio CA completo junto con p1 y los primeros nueve residuos de la NC sustituyen a la región equivalente en el genoma de SIV_{SMM-PBj} (Figura 7).

Por otra parte, las quimeras SIV_{FIV CA(NTD)} y SIV_{FIV CA(CTD)} fueron diseñadas para estudiar la homología funcional entre los dominios N-terminal y C-terminal de las CA de SIV y de FIV, respectivamente (Figura 7).

Para el diseño de todas estas construcciones quiméricas, nos basamos en los datos estructurales disponibles sobre la proteína CA de HIV-1 (Byeon *et al.*, 2009; Ganser-Pornillos *et al.*, 2007).

```

1
FIV  PIQTVNGVPQYVALDPK----MVSIFMEKAREGLGGEEVQLWFTAFSANLT
SIV  PVQQIGGNYTHLPLSPRTLNAWVKLIEEK-----FGAEVVPGFQALSEGCT
      P*Q * G    **L P*      V * EK      G EV F A S T

      PTDMATLIMAAPGCAADKEILDES LKQLTAEYDRTHPPDAPRPLPYFTAEE
      PYDINQMLNCVGEHQAA MQI IRE I INEEAADWDLQHPQ-PG-PIPPGQLRE
      P D* ** * A *I* E * * A**D HP ** P*P E

      IMG--IGLT-----QEQQAEARFAPARMQCRAWYLEALGKLAAIKAKSPR
      PRGSDIAGTTSTVDEQIQW MYRQQNP I PVGNIYRRWIQLGLQKCV RMYNPT
      G* I* T      Q Q      P *      LG ** P

      -AVQLRQGA KEDYSS FIDRLFAQIDQEQNTAEVKLYLKQSLSIANANADCK
      NILDVKQGPKEPFQSYVDRFYKSLRAEQTDP AVKNWMTQTLLIQNANPDCK
      ***Q*KE * S**DR * EQ * VK ** Q*L I NAN*DCK

      KAMSHLKPESTLEEKLRACQEIGSPGYKMQL 222
      LVLKGLGINPTLEEMLTACQGVGGPGQKARLM 230
      * L **TLEE L ACQ *G*PG K L
  
```

Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas CA de FIV y de SIV. Los números indican el tamaño de cada proteína. Los asteriscos representan cambios aminoacídicos conservativos entre las proteínas CA de SIV y de FIV. La región MHR se indica con un recuadro, mientras que las líneas por debajo del alineamiento representan las hélices de los dominios N-terminal (rojo) y C-terminal (azul) en las que se halla organizada la estructura de la proteína CA de HIV-1.

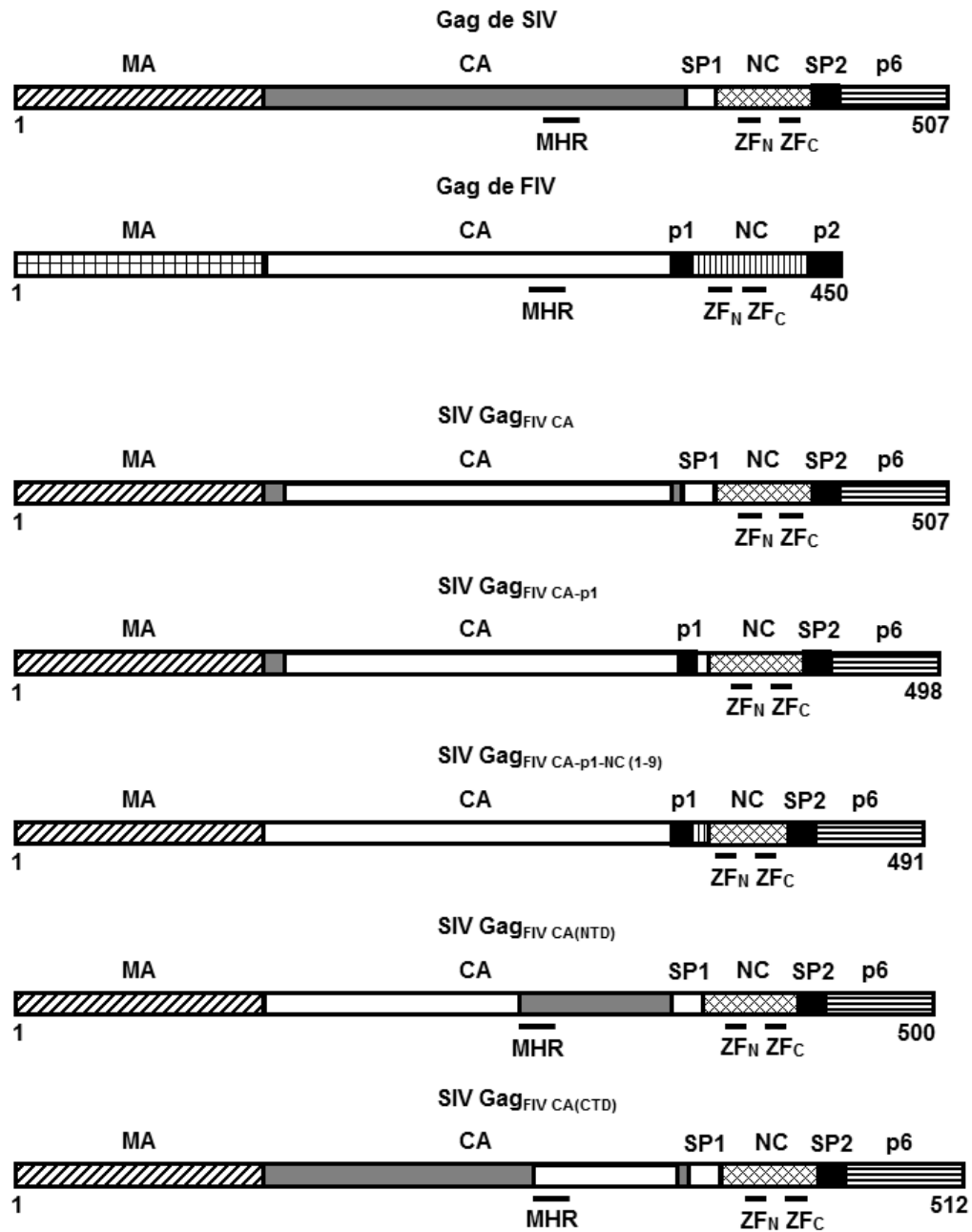


Figura 7. Diagrama esquemático de las poliproteínas Gag quiméricas codificadas por las construcciones provirales de SIV. En la parte superior del esquema se muestra la organización de los precursores Gag de SIV y de FIV, indicando los dominios comunes a todos los precursores Gag retrovirales (MA, CA y NC), el péptido C-terminal p6 en Gag de SIV, así como los péptidos espaciadores (SP1 y SP2 en Gag de SIV; p1 y p2 en Gag de FIV). Se indican las posiciones de las regiones MHR en los dominios CA, y de los motivos "dedos de zinc" N-terminales (ZF_N) y C-terminales (ZF_C) en los dominios NC. Los números se refieren a la longitud de cada poliproteína Gag quimérica, donde el residuo 1 corresponde a la metionina iniciadora en los precursores Gag.

2. Caracterización fenotípica del virus quimérico SIV_{FIV CA}

Con el objetivo de determinar si la CA de FIV es capaz de reemplazar funcionalmente al dominio equivalente de SIV y de conferir capacidad de ensamblado a la proteína Gag de SIV quimérica, se transfectaron en paralelo células 293T con los ADNs provirales de SIV salvaje y de la quimera SIV_{FIV CA}. Al analizar los lisados celulares y de la fracción de los viriones mediante Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la MA de SIV encontramos que la poliproteína Gag quimérica SIV_{FIV CA} se expresa y es procesada en niveles equivalentes a los de Gag salvaje, y que es además capaz de ensamblarse en viriones (Figuras 8A y 8C). Sin embargo, cuando se utilizaron los anticuerpos específicos para la proteína CA de FIV y para la CA de SIV se observó que los viriones quiméricos presentan, además de la proteína CA de FIV madura, bandas adicionales de menor peso molecular derivadas de la misma (Figuras 8B y 8D). Este resultado sugería que la CA de FIV era *per se* inestable en el contexto del *core* derivado del precursor Gag quimérico, o bien que el dominio CA de FIV era susceptible al procesamiento por la proteasa de SIV. Con el objeto de evaluar esta última posibilidad, se cotransfectaron células 293T con el ADN proviral de SIV salvaje y el plásmido pcDNA-FIV(Δ U3), que permite que el genoma de FIV se exprese en células humanas (Figura 9). Como control, se incluyeron células expresando solamente el genoma proviral de FIV. Como se muestra en la Figura 9, los resultados de los Western blots de la fracción de viriones mostraron que la proteasa de SIV no altera ni el procesamiento de la poliproteína Gag de FIV ni la integridad de la CA de FIV. Estos resultados demuestran entonces que la maduración de los viriones quiméricos SIV_{FIV CA} es acompañada por cierto grado de inestabilidad del dominio CA de FIV.

3. Fenotipo del virus quimérico SIV_{FIV CA-p1}

En base a los resultados obtenidos para el virus SIV_{FIV CA}, se planteó evaluar si la inclusión del péptido espaciador p1 de FIV en lugar de los primeros 10 aminoácidos de la región espaciadora SP1 podía revertir la inestabilidad de la CA de FIV en los viriones quiméricos. Para ello se generó la construcción quimérica SIV_{FIV CA-p1} (Figura 7).

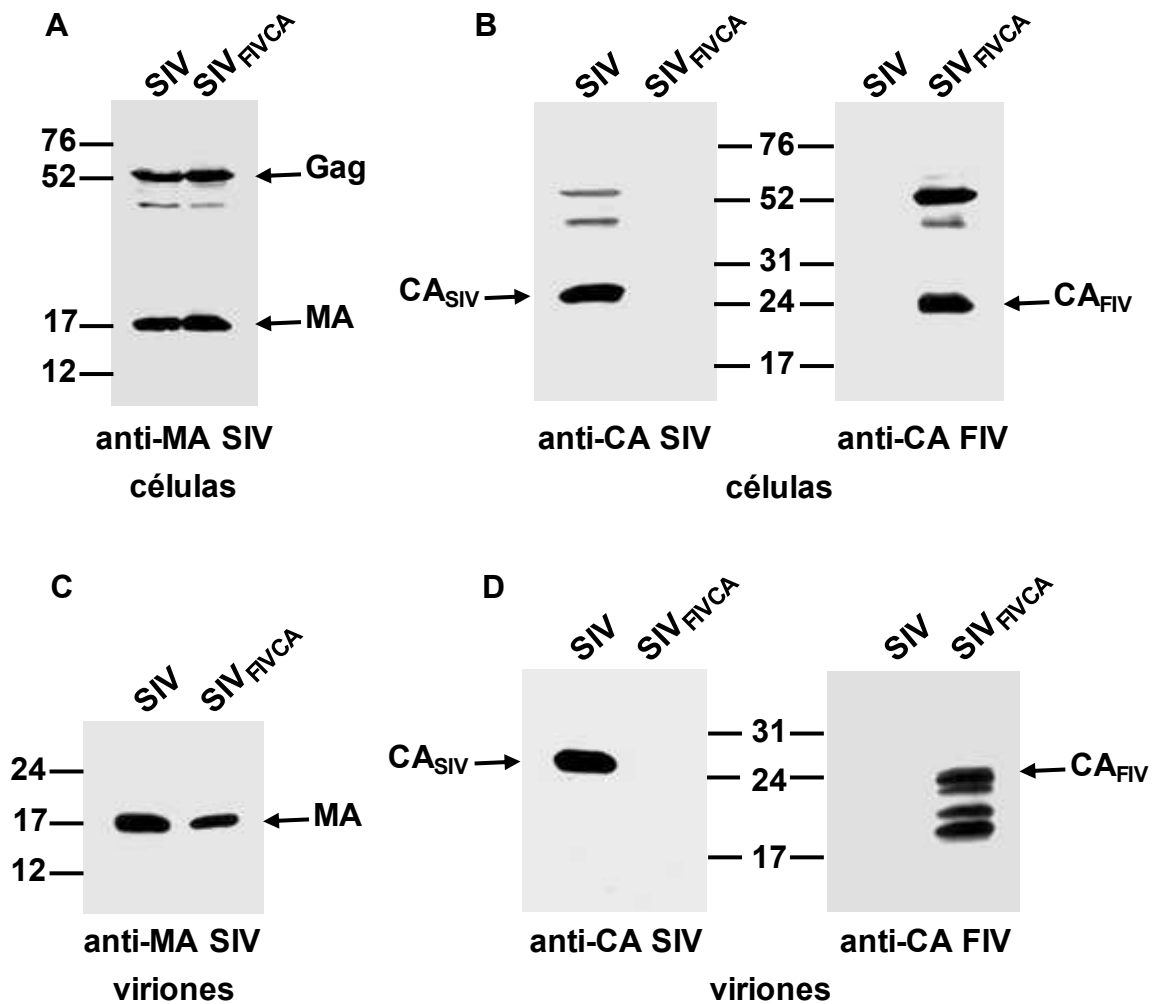


Figura 8. Análisis de la expresión y de la capacidad de ensamblado del virus quimérico SIV_{FIV CA}. Se transfecaron células 293T con los ADNs provirales de SIV_{SMM-PBj} salvaje o de SIV_{FIV CA}. A las 48 hs postransfección se prepararon los lisados celulares y se purificaron los viriones extracelulares a partir del medio de cultivo libre de células como se explica en Materiales y Métodos. Las proteínas virales de los lisados de las células transfectadas y de los viriones se separaron en geles de SDS-poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron con anticuerpos específicos para las proteínas MA de SIV (**A y C**) y para las CA de SIV y de FIV (**B y D**). Se indica la movilidad de las proteínas Gag salvaje y quimérica, de las proteínas MA de SIV, CA de SIV y de FIV. Los números se refieren a las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

Al comparar el perfil de proteínas virales de los lisados de las células 293T expresando la quimera $SIV_{FIV\ CA-p1}$ con los de las células expresando SIV salvaje, observamos que el precursor Gag quimérico se expresa y procesa intracelularmente de manera similar a Gag de SIV salvaje (Figura 10A). Sin embargo, los Western blots de la fracción de partículas virales de la quimera $SIV_{FIV\ CA-p1}$ mostraron un perfil de subproductos de la CA de FIV similar al obtenido con los viriones de $SIV_{FIV\ CA}$ (Figura 10B). Este resultado indica que la inclusión de p1, región de Gag de FIV que se halla contigua al extremo carboxilo del dominio CA, no es suficiente para revertir la inestabilidad intrínseca que exhibe el dominio CA de FIV en el contexto de Gag de SIV.

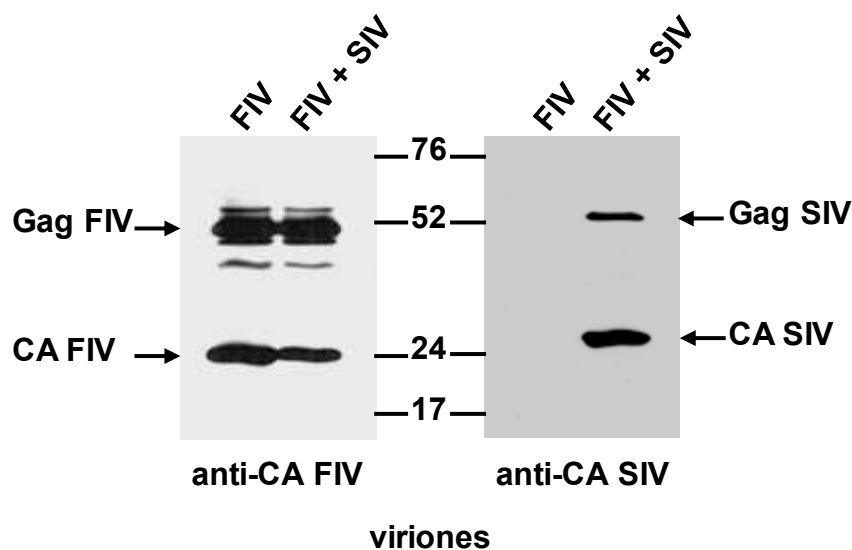


Figura 9. Coexpresión de SIV salvaje con FIV para evaluar la susceptibilidad del dominio CA de FIV al procesamiento por la proteasa de SIV. Se purificaron las fracciones de viriones a partir de células 293T transfectadas con el ADN proviral de FIV($\Delta U3$) solo (calles indicadas como "FIV") o junto con el de $SIV_{SMM-PBj}$ (calles indicadas como "FIV + SIV"), como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron luego por Western blot utilizando los MAb's específicos de la proteína CA de SIV o de FIV. Se indican las movilidades electroforéticas de las proteínas Gag y CA tanto de SIV como de FIV. Los números indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

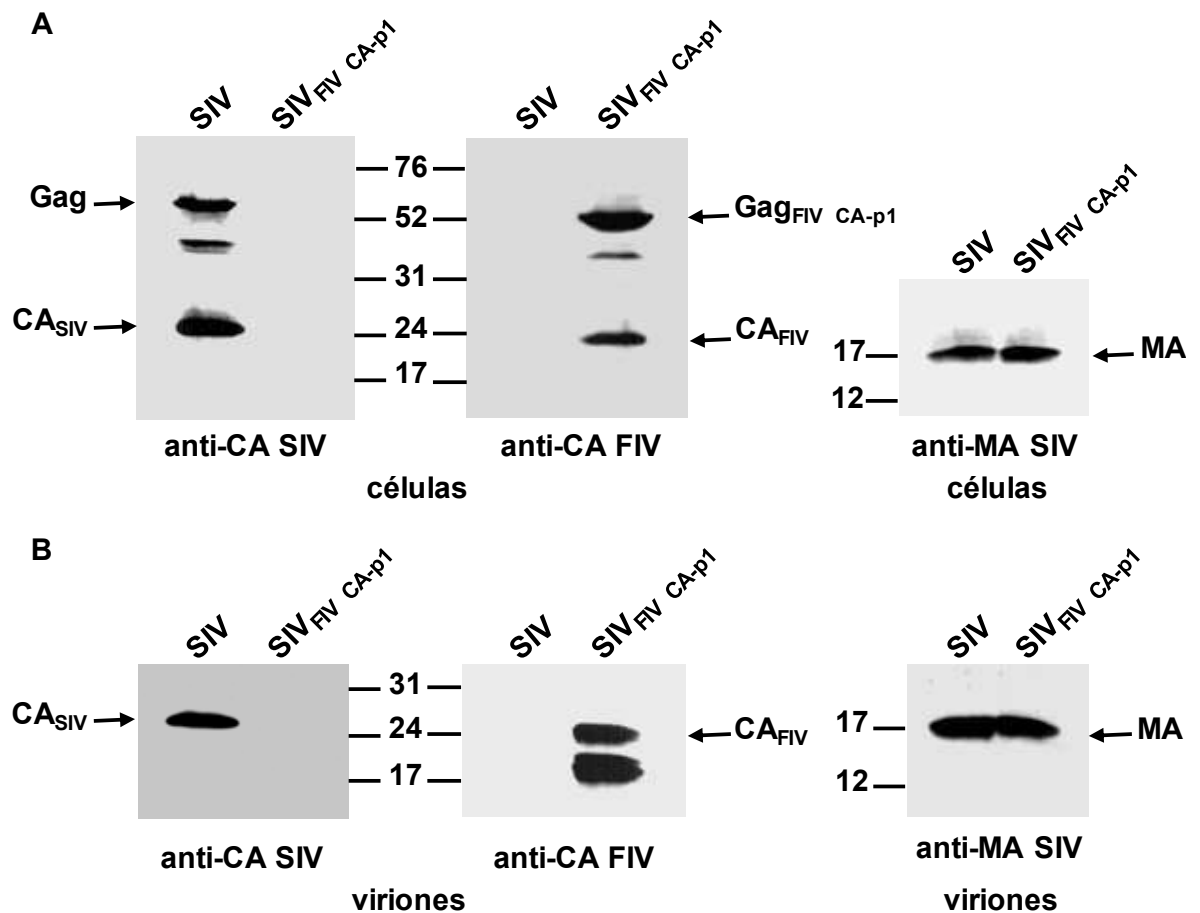


Figura 10. Fenotipo de ensamblado de la quimera SIV_{FIV CA-p1}. Se transfectaron células 293T con los ADNs provirales SIV_{SMM-PBJ} salvaje o SIV_{FIV CA-p1}. A las 48 hs se prepararon los lisados de las células transfectadas y los viriones se purificaron por ultracentrifugación del medio de cultivo clarificado. **(A)** Análisis por Western blot de la expresión y procesamiento de los virus salvaje y quimérico empleando los MABs dirigidos contra las CA de SIV o FIV (panel izquierdo), así como también contra la MA de SIV (panel derecho). **(B)** Análisis de la fracción de viriones con los anticuerpos anti-CA de SIV o de FIV (panel izquierdo) y anti-MA de SIV (panel derecho). Se indica la movilidad de los precursores Gag salvaje y quimérico, de las proteínas maduras MA y CA de SIV y CA de FIV. Los números indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

4. Capacidad de ensamblado del virus quimérico SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}

Seguidamente, se analizó la capacidad de ensamblarse de la construcción proviral SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}, en la cual los dominios CA, SP1 y los primeros 10 aminoácidos del dominio NC de SIV previos al primer motivo "dedo de zinc" fueron sustituidos por la región homóloga de FIV (Figura 7).

Cultivos de células 293T se transfectaron con el ADN proviral SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} o de SIV_{SMM-PBj}, y posteriormente, tanto los lisados de las células transfectadas como los viriones purificados fueron analizados por Western blot con el suero anti-MA de SIV o con los MAbs específicos de la proteína CA de SIV o de FIV (Figura 11). Cuando la fracción de viriones se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-MA de SIV, se observó que la quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} se ensambla en viriones con una eficiencia similar a la de SIV salvaje (Figura 11B, panel derecho). Sin embargo, a diferencia de la inestabilidad del dominio CA de FIV en los viriones SIV_{FIV CA} y SIV_{FIV CA-p1}, el virus quimérico SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} exhibe un perfil de procesamiento, maduración y ensamblado típico del precursor Gag salvaje. En estas partículas virales quiméricas se detecta además un intermediario de Gag de mayor peso molecular, el cual correspondería a la especie (CA-p1)_{FIV-NC} (Figura 11B).

5. Infectividad, actividad de transcriptasa reversa y contenido de ARN genómico de los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}

Dado que encontramos que la proteína CA de FIV es estable dentro del *core* de los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}, se decidió investigar entonces si este virus quimérico es infeccioso. Para ello, realizamos el ensayo de infectividad en las células indicadoras TZM-bl de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. La línea celular TZM-bl expresa de manera estable el receptor CD4 y el correceptor CCR5, los cuales son utilizados por SIV para entrar a las células. Por otra parte, el genoma de estas células tiene integrado el gen *lacZ* bajo el control del promotor LTR de HIV-1. Si los viriones obtenidos por transfección de las células 293T son capaces de unirse al receptor CD4 y correceptor CCR5 presentes en la superficie celular y entrar a las células, se sintetizará la proteína transactivadora Tat, codificada por el genoma viral, la cual se unirá entonces al

promotor LTR para dirigir la expresión de la enzima β -galactosidasa. Al incubar las células TZM-bl con el sustrato cromogénico X-Gal, las células en las que el virus haya entrado y se haya transcrito podrán ser rápidamente individualizadas al microscopio óptico por su coloración azul. De esta manera, la capacidad infectiva de SIV puede ser cuantificada determinando el número de células azules presentes en el cultivo. Al evaluar la capacidad infectiva de SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} en las células TZM-bl utilizando los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas, encontramos que la infectividad del virus quimérico es sólo el $3,0 \pm 0,9\%$ de la del virus salvaje (promedio de 5 experimentos independientes \pm desviación estándar). Teniendo en cuenta que este virus quimérico lleva secuencias que provienen de Gag de FIV, resulta relevante mencionar que las células TZM-bl derivan de la línea celular HeLa, la cual es sólo parcialmente restrictiva para la replicación de FIV (Saenz *et al.*, 2005). La baja infectividad de la quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} no puede atribuirse a un defecto en la incorporación de la glicoproteína Env ya que las partículas quiméricas contienen niveles de la subunidad gp41 de Env similares a los de SIV salvaje (Figura 11C).

Una estrategia utilizada para examinar el efecto de mutaciones en HIV-1 y SIV sobre etapas posteriores a la entrada del virus a la célula es generar pseudotipos llevando en su superficie la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Aiken, 1997; Manrique *et al.*, 2003). La proteína VSV-G le confiere a las partículas virales de HIV-1 y SIV la capacidad de entrar a las células por la vía endocítica en lugar de utilizar el complejo receptor-correceptor requerido normalmente por estos virus (Aiken, 1997). Es por ello que investigamos además si el pseudotipo de SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} llevando la VSV-G era infeccioso en las células indicadoras TZM-bl. La baja infectividad obtenida para el pseudotipo VSV-G/SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} (datos no mostrados) confirmó que el fenotipo defectivo del virus quimérico no se debe a que los viriones no incorporan la glicoproteína Env.

Analizamos entonces si la baja infectividad del virus SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} es debida a menor actividad de la RT en los viriones quiméricos y/o a un defecto en el empaquetamiento del ARN genómico. Luego de normalizar las muestras en base a la cantidad de proteína MA de SIV, se determinó la actividad de la RT de los viriones utilizando un ensayo enzimático como se describe en Materiales y Métodos. No se observaron diferencias significativas en la actividad de RT de los

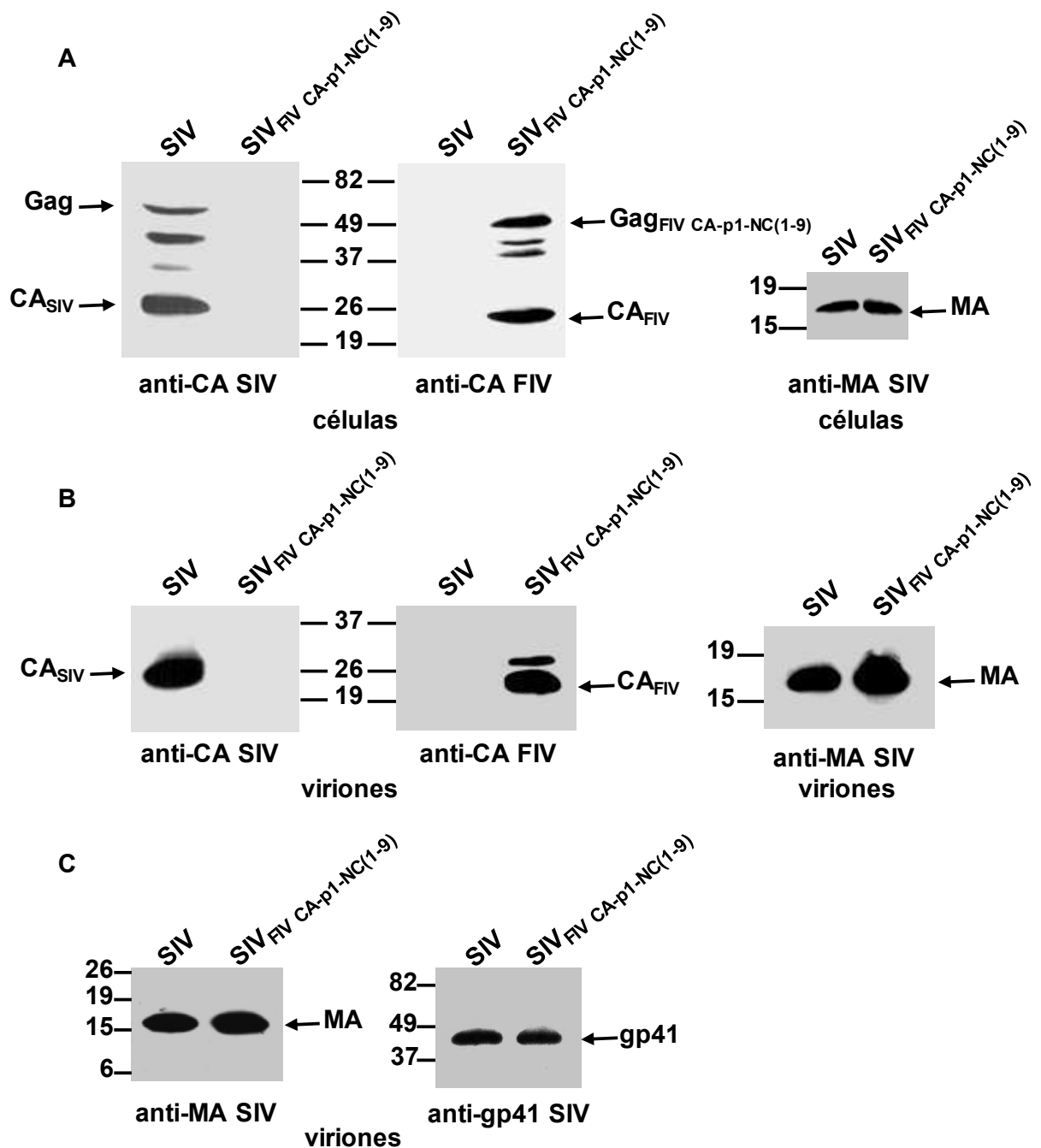


Figura 11. Análisis de la producción de partículas e incorporación de Env en los viriones de la quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}. Células 293T fueron transfectadas en paralelo con los ADNs provirales SIV_{SMM-PBj} salvaje y SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}. Las proteínas virales presentes en los lisados celulares (**A**) y viriones (**B**) fueron detectadas por Western blot con los anticuerpos dirigidos contra la MA de SIV, la CA de SIV y la CA de FIV. (**C**) La incorporación de Env en los viriones de SIV_{SMM-PBj} y SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} fue determinada utilizando un MAAb anti-gp41 de SIV (panel derecho). La cantidad de viriones fue normalizada en base a su contenido de MA (panel izquierdo). Se indica la movilidad de los precursores Gag salvaje y quimérico, de las proteínas maduras MA de SIV, CA de SIV, CA de FIV y gp41 de SIV. Los números indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} en comparación a los valores obtenidos para SIV salvaje ($15,0 \pm 0,2$ ng RT/ml para la quimera versus $16,0 \pm 0,3$ ng RT/ml para SIV salvaje; promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar).

Finalmente, evaluamos si las secuencias derivadas de FIV en el contexto de Gag de SIV afectan la eficiencia de empaquetamiento de ARN en los viriones quiméricos SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}. Se determinaron los niveles de ARN genómico en las partículas virales utilizando una etapa de transcripción reversa acoplada a PCR semicuantitativa (RT-sqPCR) en la que se amplificó la región del genoma de SIV que se extiende entre la señal de empaquetamiento Ψ y el extremo 5' de la región codificante para la MA. Los productos de ADN resultantes fueron luego cuantificados por densitometría de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Esta estrategia ya ha sido aplicada por nuestro laboratorio para cuantificar el contenido de ARN en partículas de Gag de FIV formadas en reacciones de ensamblado *in vitro* (Affranchino & González, 2010). Las muestras de viriones de SIV salvaje y quimérico fueron primero normalizadas en base a los niveles de la proteína MA de SIV de modo de comparar cantidades equivalentes de partículas virales respecto a su contenido de ARN. En la Figura 12A (panel superior) se muestra que luego de 25 o 30 ciclos de PCR se detectaron cantidades similares del producto de ADN amplificado a partir de las muestras de SIV salvaje y quimérico. Como control, cuando no se agregó la enzima RT a las reacciones no se obtuvo ningún producto de ADN (Figura 12B). Con el objeto de confirmar que bajo nuestras condiciones experimentales la amplificación procedió de manera exponencial durante 25 ciclos, se utilizó en la etapa de PCR la mitad de volumen del ADNc obtenido a partir del ARN de SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} respecto del volumen de ADNc de los viriones salvajes. Al utilizar esta cantidad de ADNc de la quimera en 25 ciclos de reacción, los niveles del producto de PCR correspondiente representaron el $59 \pm 6\%$ de los valores del virus salvaje (Figura 12A, panel inferior). En cambio, al realizar reacciones de amplificación de 30 ciclos se obtuvieron cantidades comparables de productos de PCR para la quimera y el virus salvaje (Figura 12A, panel inferior), indicando que, en efecto, la fase de la meseta de la reacción se alcanza a los 30 ciclos de amplificación. Por lo tanto, en base al hecho de que se obtienen cantidades similares de producto de PCR a partir de las muestras de SIV salvaje y de la quimera durante 25 ciclos de

amplificación exponencial (Figura 12A, panel superior), se puede concluir que los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} empaquetan el ARN genómico con la misma eficiencia que las partículas de SIV salvaje.

6. Análisis de la capacidad de replicación de la quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} en células no restrictivas

Dado que los resultados obtenidos mostraron que la escasa infectividad de los viriones quiméricos SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} no se debe a un impedimento en la incorporación de Env, a un defecto en la actividad de la RT asociada a viriones, o a que no se empaquete el ARN genómico, nos propusimos identificar las etapas en el ciclo de vida viral, posteriores a la entrada del virus, que fueron afectadas por la inclusión de las secuencias CA-p1-NC₍₁₋₉₎ de FIV en el contexto del genoma de SIV. Examinamos entonces si la quimera SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} es capaz de llevar a cabo el proceso de transcripción reversa realizando la infección de células 293T con el virus quimérico llevando en su superficie la proteína VSV-G. Para evitar que la proteína TRIM5- α restrinja la replicación del virus quimérico uniéndose a la CA de FIV utilizamos en estos experimentos la línea celular 293T, ya que ésta es permisiva tanto para la replicación de FIV (Saenz *et al.*, 2005) como de SIV (Kahl *et al.*, 2008).

La detección de formas circulares de ADNc viral no integrado al genoma celular sirve como criterio del transporte a núcleo de un ADNc viral de tamaño completo y, por lo tanto, de una infección viral productiva (Cara *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2001; Sloan & Wainberg, 2011). A partir de las células infectadas con los pseudotipos de SIV salvaje o quimérico SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}, se aisló por PCR las formas circulares de ADN viral utilizando la metodología descrita en Materiales y Métodos. Como muestra la Figura 13A, mientras que la especie circular 1-LTR se halla presente en las células infectadas con SIV salvaje, esta forma de ADNc no se detecta en las células infectadas con el virus quimérico SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)}. La ausencia de la forma 1-LTR en este caso no se debe a que la reacción de PCR para el virus quimérico se haya llevado a cabo a partir de un menor número de células que el empleado en el caso del SIV salvaje. En efecto, la amplificación del gen de la β -actina humana a partir de ADN genómico obtenido de células infectadas con uno u otro virus resultó en cantidades equivalentes del producto de

PCR esperado (Figura 13B). Cabe mencionar que la identidad de las formas circulares de ADNc viral 1-LTR amplificadas fue confirmada por secuenciación (datos no mostrados).

7. Reemplazo en Gag de SIV del dominio N-terminal o C-terminal de la CA por las regiones equivalentes de la proteína CA de FIV

Para profundizar nuestra investigación sobre la relación estructural y funcional entre las proteínas CA de SIV y FIV, examinamos si el NTD o CTD de la CA de FIV son capaces de reemplazar funcionalmente a sus dominios equivalentes de la CA de SIV. Para ello, estudiamos el fenotipo de ensamblado de los virus quiméricos $SIV_{FIV\ CA(NTD)}$ y $SIV_{FIV\ CA(CTD)}$. Se transfectaron células 293T en paralelo con los ADN provirales salvaje o quiméricos y tanto los lisados celulares como los viriones fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos anti-MA de SIV, anti-CA de SIV, o anti-CA de FIV. Los niveles de expresión y los perfiles de procesamiento de ambas poliproteínas Gag quiméricas fueron similares a los de la proteína Gag de SIV salvaje (Figuras 14A, 15A y 15B). Sin embargo, los virus quiméricos exhibieron fenotipos de ensamblado diferentes; mientras que la inclusión en el genoma de SIV del NTD de la CA de FIV inhibe drásticamente el ensamblado viral (Figura 14B), el virus quimérico SIV llevando el CTD de la CA de FIV produce partículas virales con una eficiencia similar a la de SIV salvaje (Figura 15C). Cabe mencionar que un virus quimérico derivado de SIV llevando los primeros 13 residuos de la CA de SIV unidos a los aminoácidos 14-142 del NTD de la CA de FIV exhibe el mismo fenotipo defectivo de ensamblado que la quimera $SIV_{FIV\ CA(NTD)}$ (datos no mostrados).

En el caso del virus $SIV_{FIV\ CA(CTD)}$ las partículas virales contienen, además de la proteína quimérica madura $CA_{FIV\ CA(CTD)}$ de SIV, un producto del procesamiento de Gag, el cual, en base a su masa molecular y a su reactividad a anticuerpos específicos, corresponde al intermediario de procesamiento NTD- CA_{SIV} -CTD- CA_{FIV} -SP1 (Figura 15D). Al igual que en el caso del $SIV_{FIV\ CA-p1-NC(1-9)}$, encontramos que los viriones quiméricos $SIV_{FIV\ CA(CTD)}$ incorporan la glicoproteína Env en niveles comparables a los de $SIV_{SMM-PBj}$ salvaje, pero no exhiben infectividad en los ensayos con las células indicadoras TZM-bl (dato no mostrado).

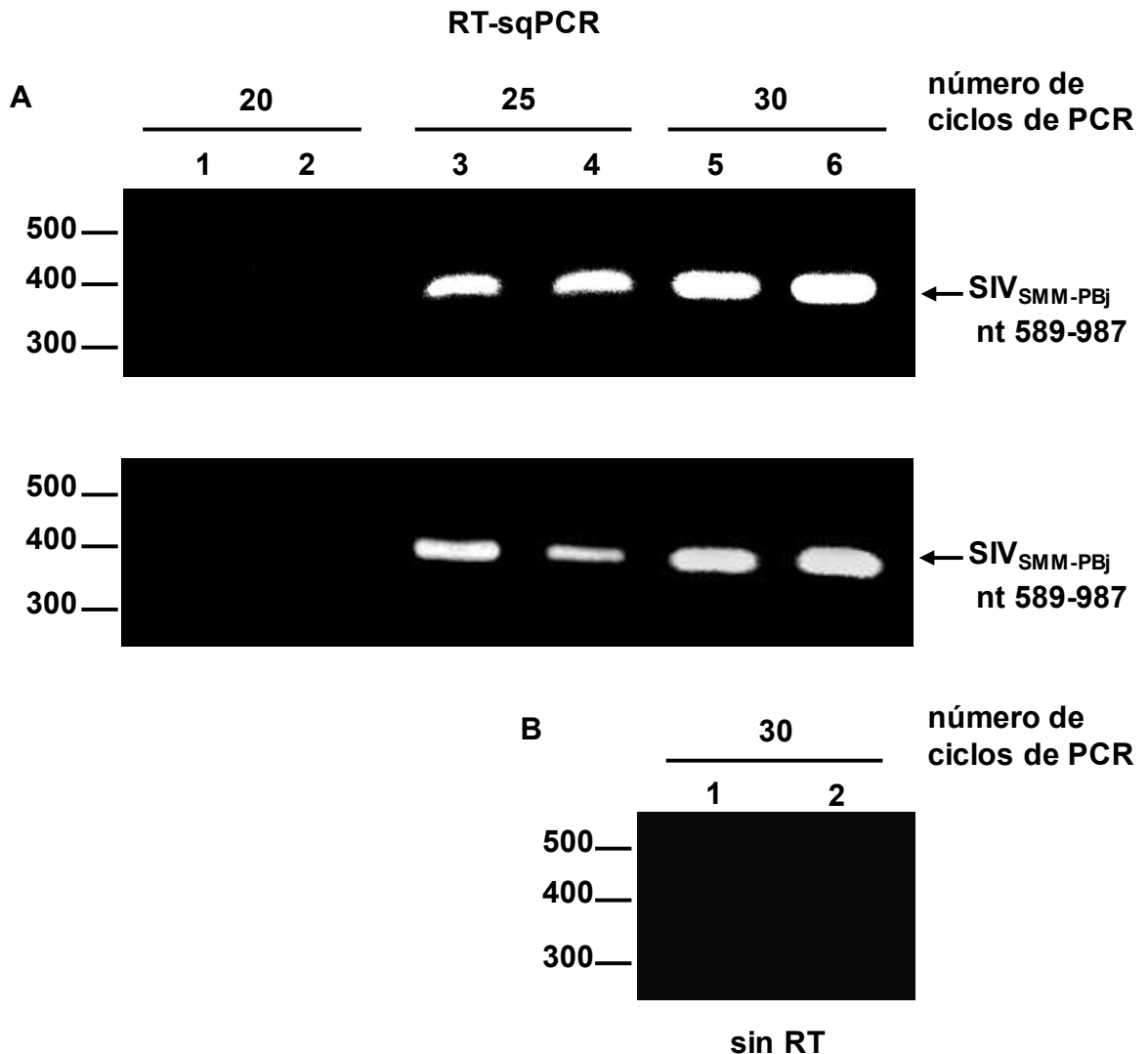


Figura 12. Análisis del contenido de ARN genómico de los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} por RT-sqPCR. (A) Panel superior: alícuotas iguales de la primer cadena de ADNc obtenida a partir del ARN genómico extraído de cantidades equivalentes de viriones de SIV salvaje (calles 1, 3 y 5) y SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} (calles 2, 4 y 6) fueron utilizadas como molde en reacciones de PCR de 20, 25 o 30 ciclos para la amplificación de la región genómica de SIV comprendida entre los nucleótidos 589-987. Panel inferior: en paralelo, se llevó a cabo la misma ronda de ciclos de PCR descrita anteriormente, pero utilizando la mitad del volumen del producto de ADNc de los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} (calles 2, 4 y 6) respecto del de los viriones salvajes (calles 1, 3 y 5). (B) Reacciones realizadas en paralelo (30 ciclos) para los ARNs genómicos extraídos de viriones de SIV salvaje (calle 1) o SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} (calle 2) sin agregar la RT en la primera etapa (sin RT), lo que demuestra la ausencia de contaminación con ADN plasmídico.

Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. A la izquierda, se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular de ADN (en pares de bases), y a la derecha, la región de ARN genómico viral amplificado por RT-PCR utilizando los cebadores 5' y 3' específicos del genoma de SIV.

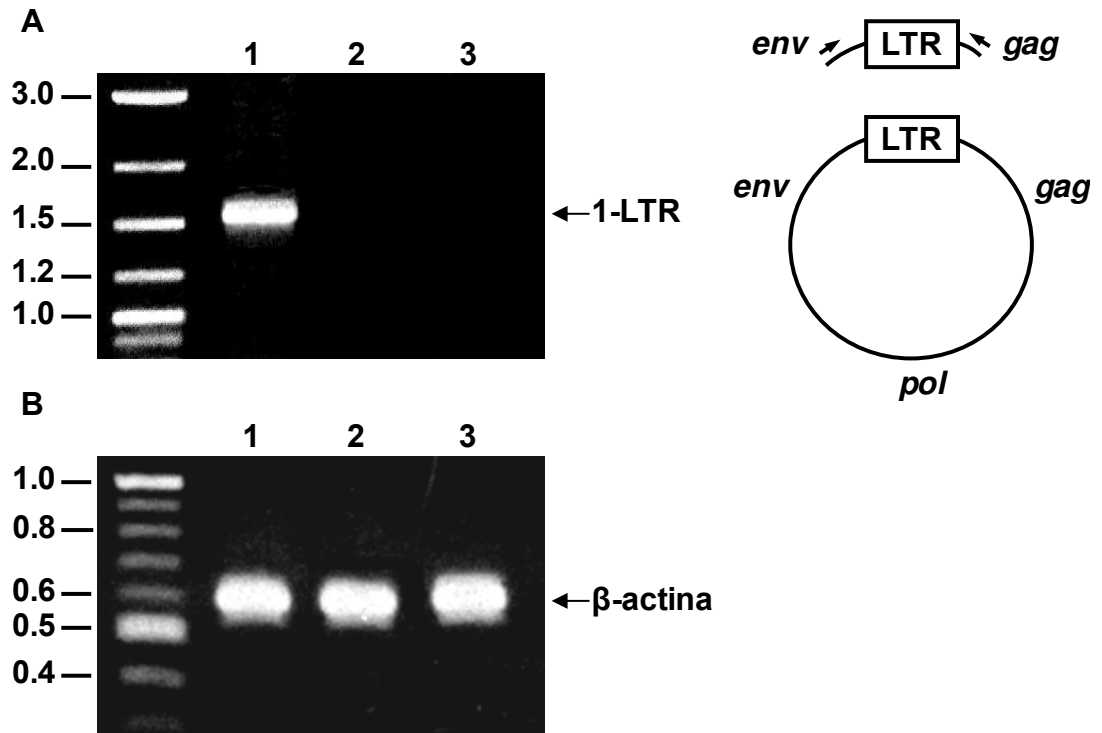


Figura 13. Análisis de la capacidad de replicación de la quimera $SIV_{FIV\ CA-p1-NC(1-9)}$ en las células permisivas 293T detectando las formas circulares de ADN viral nuclear no integrado. (A) Panel izquierdo: detección de los productos tardíos de RT a las 48 horas posinfección de células 293T con el pseudotipo VSV-G/ $SIV_{SMM-PBj}$ salvaje (calle 1), el pseudotipo VSV-G/ $SIV_{FIV\ CA-p1-NC(1-9)}$ (calle 2), o con el virus defectivo $SIV_{SMM-PBj}$ *env* (-) (calle 3). Panel derecho: representación esquemática de los productos de PCR resultantes de la forma circular 1-LTR utilizando los cebadores específicos 5' *env* y 3' *gag* (indicados con flechas). (B) Como control de la cantidad de ADN genómico en cada muestra, se amplificó una región del gen de la β -actina humana a partir de una alícuota del ADN purificado a partir de las células infectadas con el pseudotipo VSV-G/ $SIV_{SMM-PBj}$ (calle 1), el pseudotipo VSV-G/ $SIV_{FIV\ CA-p1-NC(1-9)}$ (calle 2), o con $SIV_{SMM-PBj}$ *env* (-) (calle 3). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los productos de la reacción fueron luego analizados por electroforesis en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular de ADN (en kb).

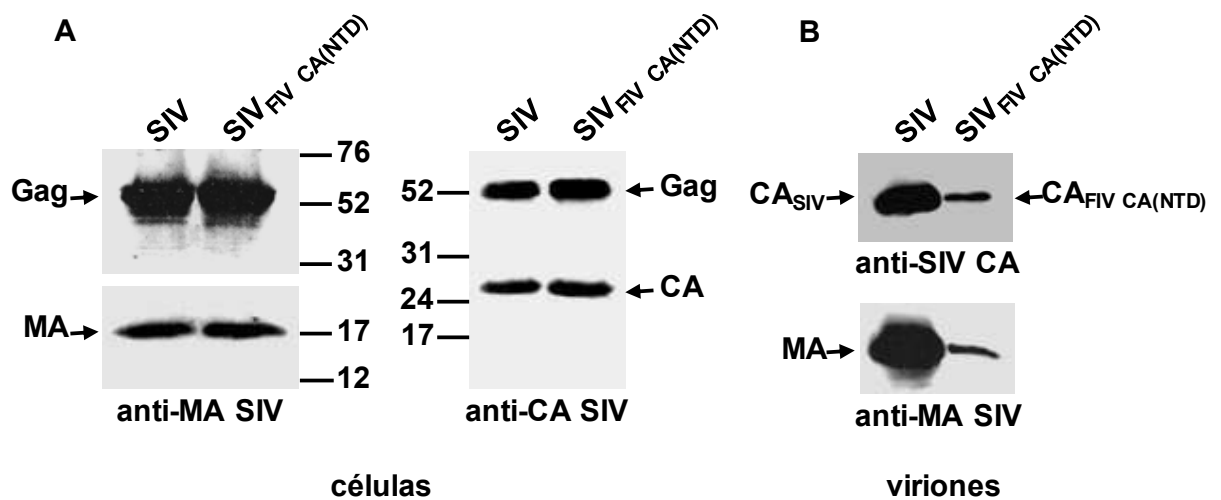


Figura 14. Efecto sobre el ensamblado de Gag de SIV de reemplazar el NTD de la CA por el dominio equivalente de FIV. Se transfectaron células 293T en paralelo con los ADNs provirales SIV_{SMM-PBJ} salvaje y SIV_{FIV CA(NTD)}. A las 48 hs postransfección, las proteínas virales de los lisados celulares (**A**) y de los viriones (**B**) fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida, transferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas con anticuerpos específicos para las proteínas MA y CA de SIV. Se indican las movilidades relativas de las proteínas Gag, CA salvaje y quimérica, y de la MA de SIV. Los números indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

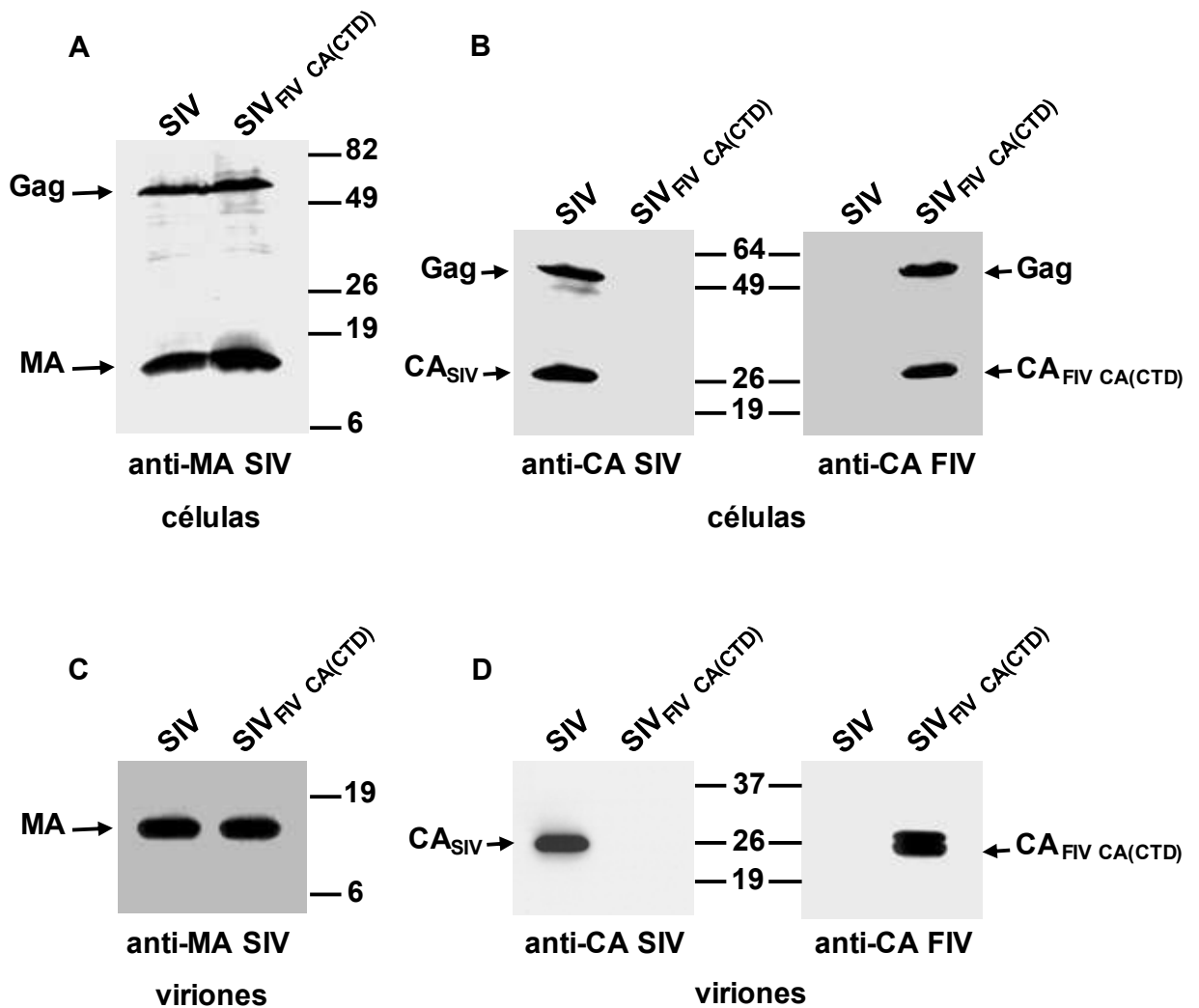


Figura 15. Efecto sobre el ensamblado de Gag de SIV de sustituir el CTD de la región CA por su contraparte equivalente de FIV. Se transfectaron células 293T en paralelo con los ADNs provirales SIV_{SMM-PBj} salvaje y SIV_{FIV CA(CTD)}. Los lisados celulares (**A y B**) y los viriones (**C y D**) fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos específicos para las proteínas MA de SIV (**A y C**), la CA de SIV (**B y D**), y la CA de FIV (**B y D**). Se indican las movilidades relativas de las proteínas Gag, CA salvaje y quimérica, y la MA de SIV. Los números se refieren a las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa).

8. Capacidad de oligomerización del dominio C-terminal de la CA de FIV

Hasta este punto, nuestros resultados mostraban que, en el contexto de la poliproteína Gag de SIV, el CTD de la CA de FIV es capaz de reemplazar funcionalmente a la región equivalente de SIV en lo que respecta al ensamblado de virines.

Con el objeto de investigar con mayor detalle las propiedades del CTD de la CA de FIV (CA-CTD_{FIV}), examinamos si este dominio es capaz de oligomerizar en solución realizando reacciones de ensamblado *in vitro* similares a las que hemos descrito para las poliproteínas Gag de FIV (Affranchino & González, 2010) y de SIV (Rauddi *et al.*, 2011). En paralelo y como control, se analizó la capacidad de multimerización *in vitro* de la proteína CA completa de FIV.

Las proteínas CA de FIV y CTD-CA_{FIV} fueron expresadas en *Escherichia coli* como proteínas de fusión con una etiqueta N-terminal de histidinas, y purificadas por cromatografía de afinidad. En el caso de la proteína recombinante CTD-CA_{FIV}, ésta fue luego tratada con enteroquinasa, como se describe en Materiales y Métodos, para eliminar la etiqueta de histidinas. Para evaluar la capacidad de multimerización de la proteína CA de FIV, los productos de las reacciones de ensamblado *in vitro* fueron analizados tanto a través de ensayos de sedimentación (Affranchino & González, 2010; Huseby *et al.*, 2005) como por electroforesis en geles nativos como ha sido descrito por nuestro laboratorio (Rauddi *et al.*, 2011).

Como muestra la Figura 16A, el análisis de las fracciones particulada y soluble obtenidas de la centrifugación de las reacciones de ensamblado mostró que la CA de FIV particiona mayoritariamente en la fracción particulada. Además, se detectó en la fracción particulada un intermediario de ensamblado (resistente al SDS) el cual representaría dímeros de la CA de FIV (Figura 16A). En este sentido, hemos demostrado previamente que la proteína CA de SIV es capaz de formar dímeros resistentes al SDS (Rauddi *et al.*, 2011).

Cuando la reacción de ensamblado *in vitro* de la proteína CA de FIV fue analizada por electroforesis nativa acoplada a Western blotting, se detectó un oligómero con una masa molecular de 310-340 kDa que reacciona específicamente con el MAb anti-CA de FIV (Figura 16B). Esta especie molecular

es compatible con el ensamblado de la CA de FIV en complejos multiméricos. En efecto, nuestras observaciones están de acuerdo con la demostración de Serrière *et al.* (2013) de que la CA de FIV se halla principalmente en forma dimérica y que es capaz de ensamblarse en oligómeros de alto peso molecular.

Para determinar si el CTD-CA_{FIV} es el responsable de la habilidad de la proteína CA para dimerizar y formar complejos de alto peso molecular, evaluamos primero si la adición de SDS al buffer de muestra afecta el comportamiento electroforético del polipéptido recombinante CTD-CA_{FIV}. Encontramos que, bajo condiciones desnaturalizantes, el CTD-CA_{FIV} migra en los geles de SDS-poliacrilamida con una masa molecular aparente de 7,4 kDa (Figura 17A, calle 1). En cambio, cuando el SDS fue omitido del buffer de muestra se detecta una banda adicional de 16,2 kDa, la cual, en base a su movilidad electroforética, seguramente corresponde a dímeros del CTD-CA_{FIV} (Figura 17A, calle 2). Por otra parte, el análisis de la reacción de ensamblado *in vitro* del CTD-CA_{FIV} por electroforesis nativa reveló que este polipéptido se autoensambla en oligómeros de 74,8 kDa (Figura 17B). Obtuvimos resultados similares cuando utilizamos otros sistemas de electroforesis no desnaturalizantes, tales como el *Blue Native* (Schägger & von Jagow, 1991) y el método Tris-histidina (Niepmann & Zheng, 2006) (datos no mostrados).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el CTD de la CA de FIV oligomeriza *in vitro*, y que los dímeros del CTD constituyen probablemente la unidad básica de ensamblado necesaria para la formación de los multímeros de la proteína CA de FIV que detectamos en las reacciones de ensamblado *in vitro*.

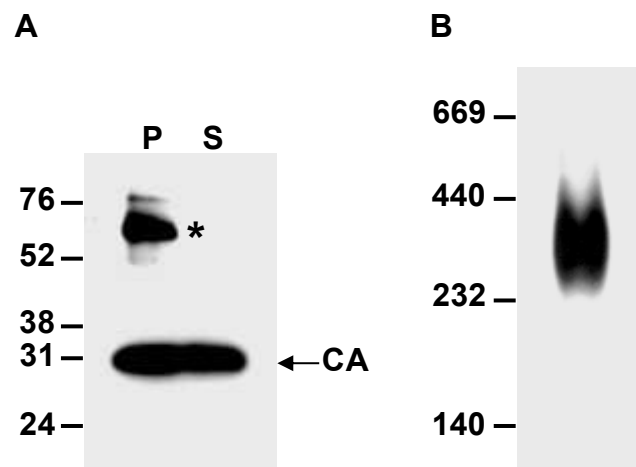


Figura 16. Análisis de la capacidad de autoensamblado *in vitro* de la proteína CA de FIV. (A) Análisis mediante ensayos de sedimentación de la reacción de ensamblado *in vitro* de la proteína recombinante CA de FIV. La proteína His-CA_{FIV} purificada fue incubada bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos para las reacciones de ensamblado *in vitro*. Los productos de la reacción de ensamblado fueron luego separados por centrifugación en las fracciones particulada (P) y sobrenadante (S), las cuales fueron sometidas a SDS-PAGE y posterior Western blot utilizando el MAb anti-CA de FIV. El asterisco indica los dímeros de la CA resistentes al SDS. (B) Para examinar la organización oligomérica de la CA de FIV, una alícuota de la reacción de ensamblado *in vitro* fue analizada por electroforesis en geles nativos (geles no desnaturizantes de 5% poliacrilamida) seguida de Western blot usando el anticuerpo anti-CA de FIV. Las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa) para electroforesis en geles desnaturizantes (A) y nativos (B) se indican a la izquierda.

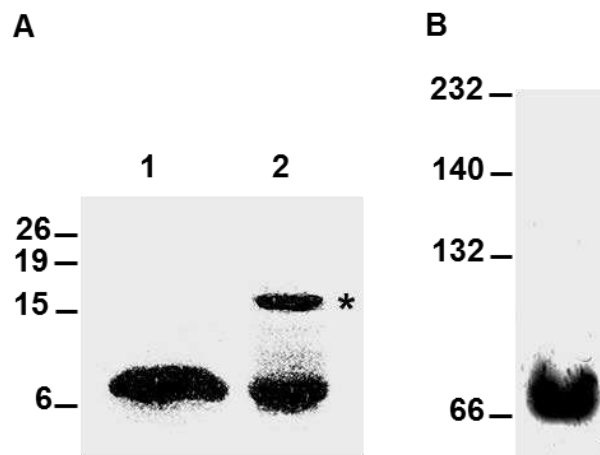


Figura 17. Capacidad de oligomerización *in vitro* del CTD de la proteína CA de FIV. **(A)** Análisis por electroforesis en condiciones desnaturizantes del polipéptido CTD-CA_{FIV}. La proteína recombinante CTD-CA_{FIV} llevando la etiqueta N-terminal de His fue purificada por cromatografía de afinidad, tratada con enteroquinasa, y analizada en un gel de SDS-poliacrilamida utilizando buffer de siembra Laemmli con SDS (calle 1) o sin SDS (calle 2). Los geles se tiñeron luego con Coomassie G-250. El asterisco denota los dímeros del CTD de la CA de FIV. **(B)** Reacción de ensamblado del polipéptido CTD-CA_{FIV}. La proteína recombinante CTD-CA_{FIV} fue incubada bajo las mismas condiciones empleadas para la CA de FIV y la reacción de ensamblado fue luego analizada por Western blot de los geles nativos utilizando el MAb anti-CA de FIV. Se indican las movilidades electroforéticas de los marcadores de peso molecular (en kDa) en los geles desnaturizantes (A) y nativos (B).

Discusión

Una característica biológica distintiva de las poliproteínas Gag retrovirales es su habilidad de dirigir la morfogénesis viral. En particular, el dominio CA de Gag está involucrado no sólo en el ensamblado y maduración de las partículas virales sino también en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral, tales como el desnudamiento del virión y el transporte al núcleo del complejo de preintegración (Fassati, 2012). Basados en el concepto de que todas las proteínas CA retrovirales se encuentran organizadas estructuralmente en dos dominios diferentes, decidimos investigar en este trabajo de Tesis Doctoral la homología a nivel funcional entre las proteínas CA de dos lentivirus evolutivamente distantes. Para ello, se generaron y caracterizaron fenotípicamente virus quiméricos derivados de SIV en los cuales el dominio CA de *gag* fue parcial o completamente reemplazado por su equivalente de FIV.

La inclusión en la proteína Gag de SIV de los residuos 14-222 de la CA de FIV solos (quimera SIV_{FIV CA}) o junto con el péptido p1 adyacente (quimera SIV_{FIV CA-p1}) no afecta la capacidad de los virus quiméricos de ensamblarse en partículas. Sin embargo, la maduración de los viriones de estas quimeras resulta en la inestabilidad de la CA. Esto probablemente refleja que, luego del procesamiento del precursor Gag quimérico por la proteasa viral, la CA de FIV es incapaz de formar un *core* estructuralmente estable. Cabe mencionar que en estos virus quiméricos se conservaron los primeros trece aminoácidos de la CA de SIV debido a que, como se ha demostrado en HIV-1, el procesamiento proteolítico en el sitio MA-CA del precursor Gag induce el plegamiento de los primeros trece residuos de la proteína CA madura en una estructura de horquilla β estabilizada por un puente salino entre los residuos Pro1 y Asp51 (Gitti *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2002). En las proteínas CA de SIV y de FIV, el residuo de Asp que participaría en el puente salino junto con la Pro1 se halla en la posición 50 (Figura 6). Esta estructura de horquilla β es esencial para la formación de hexámeros de la CA, los cuales a su vez son necesarios para generar los viriones maduros infecciosos (von Schwedler *et al.*, 1998; 2003). Por lo tanto, dado que en estas quimeras se conservan los primeros trece aminoácidos de la CA de SIV y la presencia del residuo Asp en posición 50, es improbable que la inestabilidad de la CA en los viriones quiméricos SIV_{FIV CA} y SIV_{FIV CA-p1} sea debida a un impedimento en la formación del puente salino entre los aminoácidos Pro1-Asp50.

Un fenotipo diferente al discutido arriba es el de las quimeras SIV_{FIV CA-p1}.

NC(1-9) y SIV_{FIV CA(CTD)}, las cuales producen viriones que exhiben una proteína CA madura estable e intacta. Por otro lado, demostramos que estas dos quimeras, SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} y SIV_{FIV CA(CTD)}, se ensamblan en viriones que incorporan la glicoproteína Env, empaquetan niveles de ARN genómico viral similares a los de SIV salvaje, y contienen una enzima RT funcional. Sin embargo, estos virus quiméricos no son infecciosos. Cuando infectamos células permisivas con pseudotipos de estos virus quiméricos con VSV-G, no detectamos en el núcleo celular las formas circulares del ADNc viral, las cuales son indicativas de una infección productiva. Por lo tanto, es probable que estos virus quiméricos, que son capaces de ensamblarse eficientemente, no sean infecciosos debido a un defecto en una etapa posentrada viral: desnudamiento del core viral, transcripción reversa, o importación del complejo de preintegración al núcleo. Cabe destacar que en HIV-1 se ha demostrado que solamente el 50% del total de la proteína CA madura se ensambla para formar el core viral (Briggs *et al.*, 2004; Lanman *et al.*, 2004), y que la presencia de pequeñas cantidades de intermediarios del procesamiento de Gag, tales como el péptido CA-SP1, ejerce un efecto dominante negativo sobre la infectividad viral (Lee *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009). Por lo tanto, dado que los viriones SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} y SIV_{FIV CA(CTD)} exhiben, además de la proteína CA madura estable, los intermediarios de procesamiento de Gag CA-p1-NC y CA-SP1, respectivamente, se podría especular que estos subproductos de Gag presentes en los viriones son los responsables de la falta de infectividad de estas quimeras.

En síntesis, los resultados que obtuvimos al caracterizar el fenotipo de estos SIVs llevando regiones de la CA de FIV resaltan que la estructura que adquiere la CA en el virión maduro es esencial para asegurar que etapas posteriores a la entrada viral, que son clave para la infectividad, tales como el desensamblado/desnudamiento del core y la transcripción reversa, procedan de manera eficiente.

Resulta interesante comparar el fenotipo de ensamblado de los virus quiméricos SIV_{FIV CA(CTD)} y SIV_{FIV CA(NTD)}. Mientras el CTD de la CA de FIV provee un dominio que permite las interacciones Gag-Gag que conducen al ensamblado de la proteína Gag quimérica en viriones, el NTD de la CA de FIV es funcionalmente incompatible con el resto de las secuencias de Gag de SIV en la quimera, y, por lo tanto, no sirve como plataforma para el ensamblado de Gag en

partículas. Cabe mencionar que tanto resultados en FIV de nuestro laboratorio como de otros investigadores en HIV-1 han demostrado que regiones tanto en el NTD como en el CTD de la CA de FIV son necesarias para que el precursor Gag se ensamble en partículas (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014; Byeon *et al.*, 2009; von Schwedler *et al.*, 2003). En base a este concepto, puede especularse entonces que el fenotipo defectivo del virus quimérico $SIV_{FIV\ CA(NTD)}$ se debe a la incapacidad del NTD de la CA de FIV, en el contexto de las secuencias de Gag de SIV, de establecer las interacciones intermoleculares específicas CA_{NTD} - CA_{NTD} requeridas para la formación de la red hexamérica de Gag característica de los viriones inmaduros. Por otra parte, el hecho de que los CTDs de las CA de SIV y de FIV exhiban mayor homología a nivel aminoacídico (43,6% de identidad de secuencia; 65,4% de similitud de secuencia) que sus respectivos NTDs (23,6% de identidad de secuencia; 45,1% de similitud de secuencia) podría contribuir a explicar por qué la quimera $SIV_{FIV\ CA(CTD)}$ se ensambla eficientemente en viriones.

Otro aspecto a considerar es que los dominios que constituyen los precursores Gag de SIV y de FIV presentan algunas diferencias en lo que respecta a su participación en las interacciones proteína-proteína que conducen a la multimerización de Gag. En efecto, nuestro laboratorio ha demostrado previamente que mientras el subdominio MA-CA de SIV y las proteínas maduras MA y NC interactúan con Gag de SIV (Rauddi *et al.*, 2011), sus contrapartes de FIV son incapaces de asociarse con el precursor Gag salvaje de FIV (Abdusetir Cerfoglio *et al.*, 2014). Además, a excepción de la región CA, el resto de los dominios de las proteínas Gag retrovirales adoptan diferentes estructuras, lo cual refleja la diversidad de la familia *Retroviridae* (de Marco *et al.*, 2010).

Otro aspecto interesante a destacar de este trabajo es que las diferencias fenotípicas entre las quimeras $SIV_{FIV\ CA(NTD)}$ y $SIV_{FIV\ CA(CTD)}$ señalan que el CTD de la CA exhibe una plasticidad funcional que no posee el NTD, el cual requeriría de una única conformación invariable para promover la multimerización de Gag en hexámeros. En apoyo a este concepto, al caracterizar una biblioteca de mutantes de la CA de HIV-1 se encontró que la integridad de las secuencias correspondientes a las hélices del NTD es particularmente crítica para la conservación de la viabilidad viral (Rihn *et al.*, 2013).

En este trabajo de Tesis Doctoral demostramos además que la proteína CA de FIV es capaz de autoensamblarse *in vitro*, lo cual está de acuerdo con los

datos publicados recientemente mostrando que esta proteína forma estructuras esféricas (Serrière *et al.*, 2013). También demostramos que el CTD de la CA de FIV dimeriza en solución y forma oligómeros de alto peso molecular. Nuestros resultados sobre la capacidad intrínseca de oligomerización del CTD de la CA de FIV junto con el hallazgo de que el virus quimérico SIV_{FIV CA(CTD)}, el cual lleva únicamente el CTD de la CA de FIV, es competente para el ensamblado proveen evidencias biológicas y bioquímicas sobre la plasticidad funcional del CTD de la CA de FIV. Este concepto es además apoyado por estudios estructurales sobre la CA de HIV-1 que indican que el dímero del CTD de la CA y la proteína CA dimérica se hallan en varias conformaciones (Byeon *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).

En síntesis, este trabajo de Tesis Doctoral aporta información original sobre la homología funcional entre los dominios CA de las proteínas Gag de lentivirus de primates y de no primates, lo que contribuye al conocimiento de cómo han evolucionado en los retrovirus los requerimientos para el ensamblado de viriones infecciosos.

Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral, los resultados obtenidos al caracterizar el fenotipo de ensamblado de una serie de virus quiméricos SIV llevando diferentes regiones del dominio CA de FIV permiten concluir que:

- Las quimeras SIV_{FIV CA} y SIV_{FIV CA-p1}, en las cuales se reemplazó la CA de SIV por la de FIV, o por la CA junto con el péptido espaciador p1 de FIV, respectivamente, son capaces de ensamblarse en partículas virales con una eficiencia similar a la de SIV salvaje; pero la maduración de ambos viriones quiméricos resulta en la acumulación de subproductos derivados de la CA de FIV. Estos resultados señalan que la inestabilidad intrínseca que exhibe la CA de FIV en el contexto de las secuencias de Gag de SIV en los viriones SIV_{FIV CA} y SIV_{FIV CA-p1} no puede ser revertida por la inclusión de las secuencias del péptido p1, adyacentes al extremo carboxilo del dominio CA de FIV.
- Las quimeras SIV_{FIV CA-p1-NC(1-9)} y SIV_{FIV CA(CTD)}, donde se reemplazó la CA, el péptido SP1 junto con los primeros diez aminoácidos de la NC de SIV por su equivalente de FIV, o que posee el CTD de la CA de FIV en el contexto genómico de SIV, respectivamente, presentan un procesamiento, maduración y ensamblado característicos del precursor Gag salvaje. Los viriones quiméricos poseen una proteína CA madura estable y una RT funcional, incorporan a la glicoproteína Env, y empaquetan niveles de ARN genómico viral similares a los de SIV salvaje. Sin embargo, estos virus quiméricos no son infecciosos debido a defectos en etapas posteriores a la entrada viral. Estos resultados enfatizan la función crucial que desempeña el dominio CA de Gag en la organización del core, lo cual asegura que las etapas posentrada viral, esto es, el desensamblado/desnudamiento del virión y la transcripción reversa del ARN genómico, procedan de manera ordenada y sincronizada.
- El intercambio del NTD de la CA de SIV por el de la CA de FIV en la quimera SIV_{FIV CA(NTD)} es detrimental para el ensamblado del precursor Gag quimérico en partículas virales. Esto indica que el NTD de la CA de FIV, en el contexto de las secuencias de Gag de SIV, es funcionalmente incompatible y que es incapaz de establecer las interacciones intermoleculares específicas CA_{NTD}-CA_{NTD} requeridas para la formación de la red hexamérica de Gag característica de los viriones inmaduros.

- El CTD de la proteína CA de FIV exhibe la capacidad de dimerizar y de formar oligómeros de alto peso molecular *in vitro*. Estos datos, junto con el hallazgo de que el virus quimérico SIV_{FIV CA(CTD)} se ensambla en viriones con la misma eficiencia que SIV salvaje, aportan evidencias bioquímicas y biológicas de la plasticidad funcional del CTD de la CA de FIV.

Referencias

- Abdusetir Cerfoglio JC, González SA, & Affranchino JL (2014). Structural elements in the Gag polyprotein of feline immunodeficiency virus involved in Gag self-association and assembly. *J Gen Virol* **95**, 2050-2059.
- Affranchino JL (2007). El virus de la inmunodeficiencia humana. *Ciencia Hoy* **17**, 20-25.
- Affranchino JL, & González SA (2006). Mutations at the C-terminus of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein affect gp120-gp41 stability on virions. *Virology* **347**, 217-225.
- Affranchino JL, & González SA (2010). In vitro assembly of the feline immunodeficiency virus Gag polyprotein. *Virus Res* **150**, 153-157.
- Affranchino JL, & González SA (2014). Understanding the process of envelope glycoprotein incorporation into virions in simian and feline immunodeficiency viruses. *Viruses* **6**, 264-283.
- Aiken C (1997). Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* **71**, 5871-5877.
- Alfadhli A, Still A, & Barklis E (2009). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *J Virol* **83**, 12196-12203.
- Allain B, Lapadat-Tapolsky M, Berlioz C, & Darlix JL (1994). Transactivation of the minus-strand DNA transfer by nucleocapsid protein during reverse transcription of the retroviral genome. *EMBO J* **13**, 973-981.
- Barlow KL, Ajao AO, & Clewley JP (2003). Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *J Virol* **77**, 6879-6888.
- Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, & Bambara RA (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* **134**, 19-38.
- Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, & Peterlin BM (1994). HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* **1**, 373-384.

- Beebe AM, Dua N, Faith TG, Moore PF, Pedersen NC, & Dandekar S (1994). Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J Virol* **68**, 3080-3091.
- Bharat TA, Davey NE, Ulbrich P, Riches JD, de Marco A, Rumlova M, Sachse C, Ruml T, & Briggs JA (2012). Structure of the immature retroviral capsid at 8 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature* **487**, 385-389.
- Bieniasz PD (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* **5**, 1109-1115.
- Bieniasz PD (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**, 55-63.
- Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, & Cullen BR (1999). Highly divergent lentiviral Tat proteins activate viral gene expression by a common mechanism. *Mol Cell Biol* **19**, 4592-4599.
- Berkowitz R, Fisher J, & Goff SP (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 177-218.
- Bour S, & Strebel K (2003). The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**, 1029-1039.
- Briggs JA, Riches JD, Glass B, Bartonova V, Zanetti G, & Kräusslich HG (2009). Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 11090-11095.
- Briggs JA, Simon MN, Gross I, Kräusslich HG, Fuller SD, Vogt VM, & Johnson MC (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 672-675.
- Briggs JA, Will T, Welker R, Kräusslich H-G, & Fuller SD (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* **22**, 1707-1715.
- Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, & Allan JS (2001). Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* **75**, 2262-2275.

- Byeon IJ, Meng X, Jung J, Zhao G, Yang R, Ahn J, Shi J, Concel J, Aiken C, Zhang P, & Gronenborn AM (2009). Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* **139**, 780-790.
- Byeon IJ, Hou G, Han Y, Suiter CL, Ahn J, Jung J, Byeon CH, Gronenborn AM, & Polenova T (2012). Motions on the millisecond time scale and multiple conformations of HIV-1 capsid protein: implications for structural polymorphism of CA assemblies. *J Am Chem Soc* **134**, 6455-6466.
- Campbell S, & Rein A (1999). In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**, 2270-2279.
- Campbell S, & Vogt VM (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**, 6487-6497.
- Campos-Olivas R, Newman JL, & Summers MF (2000). Solution structure and dynamics of the Rous sarcoma virus capsid protein and comparison with capsid proteins of other retroviruses. *J Mol Biol* **296**, 633-649.
- Cannon PM, Matthews S, Clarks N, Byles ED, Iourin O, Hockley DJ, Kingsman SM, & Kingsman AJ (1997). Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17. *J Virol* **71**, 3474-3483.
- Cara A, Maggiorella MT, Bona R, Sernicola L, Baroncelli S, Negri DR, Leone P, Fagrouch Z, Heeney J, Titti F, Cafaro A, & Ensoli B (2004). Circular viral DNA detection and junction sequence analysis from PBMC of SHIV-infected cynomolgus monkeys with undetectable virus plasma RNA. *Virology* **324**, 531-539.
- Celestino M, Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Chiuppesi F, Pistello M, Borsetti A, Palú G, & Parolin C (2012). Feline tetherin is characterized by a short N-terminal region and is counteracted by the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Virol* **86**, 6688-6700.
- Celma CCP, Manrique JM, Hunter E, Affranchino JL, & González SA (2004). Second-site revertants of a simian immunodeficiency virus gp41 mutant

- defective in envelope glycoprotein incorporation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 731-739.
- Celma CCP, Paladino MG, González SA, & Affranchino JL (2007). Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. *Virology* **366**, 405-414.
- Chan DC, & Kim PS (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- Chazal N, Carrière C, Gay B, & Boulanger P (1994). Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells. *J Virol* **68**, 111-122.
- Checkley MA, Luttge BG, & Freed EO (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* **410**, 582-608.
- Chukkapalli V, Oh SJ, & Ono A (2010). Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 1600-1605.
- Cimarelli A, Sandin S, Höglund S, & Luban J (2000). Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* **74**, 3046-3057.
- Clapham PR, & Weiss RA (1997). Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* **388**, 230-231.
- Clements JE, & Payne SL (1994). Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Res* **32**, 97-109.
- Coats KS (2005). The feline immunodeficiency virus-infected cat: a model for lentivirus-induced placental immunopathology and reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* **54**, 169-185.
- Coffin JM (1992). Structure and classification of retroviruses. En: *The Retroviridae*, Levy JA (ed.), Plenum Press, New York, pp. 19-50.
- Courchamp F, & Pontier D (1994). Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *C R Acad Sci III* **317**, 1123-1134.

- Courgnaud V, Salemi M, Pourrut X, Mpoudi-Ngole E, Abela B, Auzel P, Bibollet-Ruche F, Hahn B, Vandamme AM, Delaporte E, & Peeters M (2002). Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**, 8298-8309.
- Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, & Desrosiers RC (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**, 1201-1204.
- Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, & Barré-Sinoussi F (1990). Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* **216**, 689-699.
- Dazza MC, Ekwilanga M, Nende M, Shamamba KB, Bitshi P, Paraskevis D, & Saragosti S (2005). Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J Virol* **79**, 8560-8571.
- Delchambre M, Gheysen D, Thines D, Thiriart C, Jacobs E, Verdin E, Horth M, Burny A, & Bex F (1989). The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J* **8**, 2653-2660.
- Delebecque F, Suspene R, Calattini S, Casartelli N, Saib A, Froment A, Wain-Hobson S, Gessain A, Vartanian JP, & Schwartz O (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**, 605-614.
- De Leys R, Vanderbotgth B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, & Willems B (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**, 1207-1216.
- de Marco A, Davey NE, Ulbrich P, Phillips JM, Lux V, Riches JD, Fuzik T, Ruml T, Kräusslich HG, Vogt VM, & Briggs JA (2010). Conserved and variable features of Gag structure and arrangement in immature retrovirus particles. *J Virol* **84**, 11729-11736.
- de Parseval A, Grant CK, Sastry KJ, & Elder JH (2006). Sequential CD134-CXCR4 interactions in feline immunodeficiency virus (FIV): Soluble CD134

- activates FIV env for CXCR4-dependent entry and reveals a cryptic neutralization epitope. *J Virol* **80**, 3088-3091.
- Dorfman T, Mammano F, Haseltine WA, & Göttlinger HG (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* **68**, 1689-1696.
- Dow SW, Dritz MJ, & Hoover EA (1992). Feline immunodeficiency virus neurotropism: evidence that astrocytes and microglia are the primary target cells. *Vet Immunol Immunopathol* **35**, 23-35.
- Dunham R, Pagliardini P, Gordon S, Sumpter B, Engram J, Moanna A, Paiardini M, Mandl JN, Lawson B, Garg S, McClure HM, Xu YX, Ibegbu C, Easley K, Katz N, Pandrea I, Apetrei C, Sodora DL, Staprans SI, Feinberg MB, & Silvestri G (2006). The AIDS-resistance of naturally SIV-infected sooty mangabeys is independent of cellular immunity to the virus. *Blood* **108**, 209-217.
- Egberink H, Borst M, Niphuis H, Balzarini J, Neu H, Schellekens H, de Clercq E, Horzinek M, & Koolen M (1990). Suppression of feline immunodeficiency virus infection in vivo by 9-(-2-phosphonomethoxyethyl)adenine. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3087-3091.
- Egberink HF, de Clercq E, van Vliet AL, Balzarini J, Bridger GJ, Henson G, Horzinek MC, & Schols D (1999). Bicyclams, selective antagonists of the human chemokine receptor CXCR4, potently inhibit feline immunodeficiency virus replication. *J Virol* **73**, 6346-6352.
- Elder JH, Lin YC, Fink E, & Grant CK (2010). Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Curr HIV Res* **8**, 73-80.
- Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, & Hoxie JA (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**, 745-756.
- Fassati A (2012). Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res* **170**, 15-24.

- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, & Wong-Staal F (1986). The *trans*-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**, 367-371.
- Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, & Aiken C (2002). Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* **76**, 5667-5677.
- Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, Fischer U, Albright AV, González-Scarano F, & Malim MH (1998). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* **72**, 6004-6013.
- Freed EO (1998). HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15.
- Freed EO (2002). Viral late domains. *J Virol* **76**, 4679-4687.
- Freed EO, & Martin MA (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**, 341-351.
- Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, & Martin MA (1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* **68**, 5311-5320.
- Frey SC, Hoover EA, & Mullins JI (2001). Feline immunodeficiency virus cell entry. *J Virol* **75**, 5433-5440.
- Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, & Hill CP (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**, 849-853.
- Ganser-Pornillos BK, Cheng A, & Yeager M (2007). Structure of full-length HIV-1 CA: A model of the mature capsid lattice. *Cell* **131**, 70-79.
- Ganser-Pornillos BK, Yeager M, & Sundquist WI (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 203-217.
- García JV, & Miller AD (1991). Serine phosphorylation-independent down-regulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508-511.

- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, & Zavitz KH (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**, 55-65.
- Gemeniano MC, Sawai ET, Leutenegger CM, & Sparger EE. (2003). Feline immunodeficiency virus ORF-A is required for virus particle formation and virus infectivity. *J Virol* **77**, 8819-8830.
- Gemeniano MC, Sawai ET, & Sparger EE (2004). Feline immunodeficiency virus Orf-A localizes to the nucleus and induces cell cycle arrest. *Virology* **325**, 167-174.
- Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, & Sundquist WI (1996). Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **273**, 231-235.
- Goff SP (2007). Retroviridae and their replication. En: *Fields Virology*, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, & Straus SE (eds.), 5ta ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2000-2069.
- Goila-Gaur R, & Strebel K (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**:51.
- Gomez LM, Pacyniak E, Flick M, Hout DR, Gomez ML, Nerrienet E, Ayoub A, Santiago ML, Hahn BH, & Stephens EB (2005). Vpu-mediated CD4 downregulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains. *Virology* **335**, 46-60.
- González SA, & Affranchino JL (1995). Mutational analysis of the conserved cysteine residues in the simian immunodeficiency virus matrix protein. *Virology* **210**, 501-507.
- González SA, & Affranchino JL (1998). Substitution of leucine 8 in the simian immunodeficiency virus matrix protein impairs particle formation without affecting N-myristoylation of the Gag precursor. *Virology* **240**, 27-35.
- González SA, Affranchino JL, Gelderblom HR, & Burny A (1993). Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* **194**, 548-556.

- González SA, Burny A, & Affranchino JL (1996). Identification of domains in the simian immunodeficiency virus matrix protein essential for assembly and envelope glycoprotein incorporation. *J Virol* **70**, 6384-6389.
- González SA, Falcón JI, Affranchino JL. (2014). Replacement of the V3 domain in the surface subunit of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein with the equivalent region of a T cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 results in a chimeric surface protein that efficiently binds to CXCR4. *AIDS Res Hum Retroviruses* **30**, 250-259.
- González SA, Paladino MG, & Affranchino JL (2012). Palmitoylation of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein and its effect on fusion activity and envelope incorporation into virions. *Virology* **428**, 1-10.
- Göttlinger HG, Sodroski JG, & Haseltine WA (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5781-5785.
- Gross I, Hohenberg H, & Kräusslich HG (1997). *In vitro* assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *Eur J Biochem* **249**, 592-600.
- Guntaka RV (1993). Transcription termination and polyadenylation in retroviruses. *Microbiol Rev* **57**, 511-521.
- Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**, 1581-1585.
- Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, & Kleiman L (2007). The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA³Lys annealing to viral RNA. *J Virol* **81**, 11322-11331.
- Guo J, Henderson LE, Bess J, Kane B, & Levin JG (1997). Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA. *J Virol* **71**, 5178-5188.

- Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, Montagnier L, & Lecocq JP (1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266-269.
- Hammarskjöld ML (1997). Regulation of retroviral RNA export. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 83-90.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, & Emerman M (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7311-7315.
- Henderson LE, Sowder RC, Copeland TD, Benveniste RE, & Oroszlan S (1988). Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science* **241**, 199-201.
- Holmes DS, & Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-197.
- Hosie MJ, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, & Horzinek MG (2009). Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* **11**, 575-584.
- Huang M, & Martin MA (1997). Incorporation of Pr160gag-pol into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein. *J Virol* **71**, 4472-4478.
- Huseby D, Barklis RL, Alfadhli A, & Barklis E (2005). Assembly of human immunodeficiency virus precursor gag proteins. *J Biol Chem* **280**, 17664-17670.
- lafrate AJ, Bronson S, & Skowronski J (1997). Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J* **16**, 101-112.

- Inoshima Y, Kohmoto M, Ikeda Y, Yamada H, Kawaguchi Y, Tomonaga K, Miyazawa T, Kai C, Umemura T, & Mikami T (1996). Roles of the auxiliary genes and AP-1 binding site in the long terminal repeat of feline immunodeficiency virus in the early stage of infection in cats. *J Virol* **70**, 8518-8526.
- Inoshima Y, Miyazawa T, & Mikami T (1998). The roles of *vif* and ORF-A genes and AP-1 binding site in in vivo replication of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* **143**, 789-795.
- Jeang KT (2012). Multi-faceted post-transcriptional functions of HIV-1 Rev. *Biology (Basel)* **1**, 165-174.
- Jewell NA, & Mansky LM (2000). In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J Gen Virol* **81**, 1889-1899.
- Johnson MC, Scobie NM, Ma YM, & Vogt VM (2002). Nucleic acid-independent retrovirus assembly can be driven by dimerization. *J Virol* **76**, 11177-11185.
- Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, & Chen IS (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**, 6304-6313.
- Kahl CA, Cannon PM, Oldenburg J, Tarantal AF, & Kohn DB (2008). Tissue-specific restriction of cyclophilin A-independent HIV-1 and SIV-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* **15**, 1079-1089.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, & Hahn BH (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523-526.
- Kemler I, Meehan A, & Poeschla EM (2010). Live-cell coimaging of the genomic RNAs and gag proteins of two lentiviruses. *J Virol* **84**, 6352-6366.
- Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, & Desrosiers RC (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651-662.

- Kolenda-Roberts HM, Kuhnt LA, Jennings RN, Mergia A, Gengozian N, & Johnson CM (2007). Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. *Front Biosci* **12**, 3668-3682.
- Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, Li X, Dar MJ, Kewalramani VN, & Engelman A (2010). The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase. *J Virol* **84**, 397-406.
- Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sudgen A, Wilde A, & Banting G (2003). Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* **4**, 694–709.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laguet N, Brégnard C, Benichou S, & Basmaciogullari S (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med* **31**, 418-433.
- Laguet N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654-657.
- Lanman J, Lam TT, Emmett MR, Marshall AG, Sakalian M, & Prevelige PE Jr (2004). Key interactions in HIV-1 maturation identified by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 676-677.
- Lee K, Ambrose Z, Martin TD, Oztop I, Mulky A, Julias JG, Vandegraaff N, Baumann JG, Wang R, Yuen W, Takemura T, Shelton K, Taniuchi I, Li Y, Sodroski J, Littman DR, Coffin JM, Hughes SH, Unutmaz D, Engelman A, & KewalRamani VN (2010). Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe* **7**, 221-233.
- Lee SK, Harris J, & Swanstrom R (2009). A strongly transdominant mutation in the human immunodeficiency virus type 1 *gag* gene defines an Achilles heel in the virus life cycle. *J Virol* **83**, 8536-8543.

- Lerner DL, Wagaman PC, Phillips TR, Prospero-Garcia O, Henriksen SJ, Fox HS, Bloom FE, & Elder JH (1995). Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7480-7484.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, & Haase AT (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **434**, 1148-1152.
- Li X, Mak J, Arts EJ, Gu Z, Kleiman L, Wainberg MA, & Parniak MA (1994). Effects of alterations of primer-binding site sequences on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **68**, 6198-6206.
- Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L, & Cen S (2007). APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **282**, 32065-32074.
- Lockridge KM, Himathongkham S, Sawai ET, Chienand M, & Sparger EE (1999). The feline immunodeficiency virus vif gene is required for productive infection of feline peripheral blood mononuclear cells and monocyte derived macrophages. *Virology* **261**, 25-30.
- Logue EC, Taylor KT, Goff PH, & Landau NR (2011). The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. *J Virol* **85**, 12950-12961.
- Lu W, Zawel L, Fisher L, Egly JM, & Reinberg D (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**, 641-645.
- Mammano F, Ohagen A, Höglund S, & Göttlinger HG (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* **82**, 2106-2119.
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, & Trono D (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**, 99-103.
- Manrique JM, Affranchino JL, & González SA (2008). In vitro binding of simian immunodeficiency virus matrix protein to the cytoplasmic domain of the envelope glycoprotein. *Virology* **374**, 273-279.

- Manrique JM, Celma CCP, Hunter E, Affranchino JL, & González SA (2003). Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N-terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein. *J Virol* **77**, 10881-10888.
- Manrique ML, Celma CCP, González SA, & Affranchino JL (2001). Mutational analysis of the feline immunodeficiency virus matrix protein. *Virus Res* **76**, 103-113.
- Manrique ML, González SA, & Affranchino JL (2004a). Functional relationship between the matrix proteins of feline and simian immunodeficiency viruses. *Virology* **329**, 157-167.
- Manrique ML, Rauddi ML, González SA, & Affranchino JL (2004b). Functional domains in the feline immunodeficiency virus nucleocapsid protein. *Virology* **327**, 83-92.
- Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, & Landau NR (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**, 21-31.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, & Kabat D (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**, 1398-1403.
- Martin-Serrano J, Zang T, & Bieniasz PD (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**, 1313-1319.
- 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. *J Clin Microbiol* **31**, 494-501.
- Mauclère P, LouSSERT-Ajaka I, Damond F, Fagot P, Souquières S, Monny Lobe M, Mbopi Keou FX, Barré-Sinoussi F, Saragosti S, Brun-Vézinet F, & Simon F (1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS* **11**, 445-453.

- McEwan WA, Schaller T, Ylinen LM, Hosie MJ, Towers GJ, & Willett BJ (2009). Truncation of TRIM5 in the Feliformia explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat. *J Virol* **83**, 8270-8275.
- Moore MD, Fu W, Soheilian F, Nagashima K, Ptak RG, & Hu WS (2008). Suboptimal inhibition of protease activity in human immunodeficiency virus type 1: effects on virion morphogenesis and RNA maturation. *Virology* **379**, 152-160.
- Morikawa Y, Goto T, & Sano K (1999). In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* **274**, 27997-28002.
- Müller B, Anders M, Akiyama H, Welsch S, Glass B, Nikovics K, Clavel F, Tervo HM, Keppler OT, & Kräusslich HG (2009). HIV-1 Gag processing intermediates trans-dominantly interfere with HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* **284**, 29692-29703.
- Murakami T, & Freed EO (2000). Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* **74**, 3548-3554.
- Muriaux D, Mirro J, Harvin D, & Rein A (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5246-5251.
- Mussil B, Sauermann U, Motzkus D, Stahl-Hennig C, & Sopper S (2011). Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology* **8**:77.
- Mustafa F, Jayanth P, Phillip PS, Ghazawi A, Schmidt RD, Lew KA, & Rizvi TA (2005). Relative activity of the feline immunodeficiency virus promoter in feline and primate cell lines. *Microbes Infect* **7**, 233-239.
- Na H, Huisman W, Ellestad KK, Phillips TR, & Power C (2010). Domain- and nucleotide-specific rev response element regulation of feline immunodeficiency virus production. *Virology* **404**, 246-260.
- Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, & Bieniasz PD (2006). HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* **2**, e39.
- Neil SJ, Zang T, & Bieniasz PD (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 vpu. *Nature* **451**, 425-430.

- Niepmann M & Zheng J (2006). Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 3949-3951.
- Nisole S, Stoye JP, & Saib A (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* **3**, 799-808.
- Nitta T, Lee S, Ha D, Arias M, Kozak CA, & Fan H (2012). Moloney murine leukemia virus glyco-gag facilitates xenotropic murine leukemia virus-related virus replication through human APOBEC3-independent mechanisms. *Retrovirology* **9**:58.
- Okeoma CM, Lovsin N, Peterlin BM, & Ross SR (2007). APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature* **445**, 927-930.
- Olmsted RA, Hirsch VM, Purcell RH, & Johnson PR (1989). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8088-8092.
- Ono A, & Freed EO (1999). Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J Virol* **73**, 4136-4144.
- Patel CA, Mukhtar M, & Pomerantz RJ (2000). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis in human neuronal cells. *J Virol* **74**, 9717-9726.
- Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, & Yamamoto JK (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* **235**, 790-793.
- Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, & Hanse H (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* **21**, 111-129.
- Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden Haesevelde M, & Delaporte E (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* **15**, 493-498.
- Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Yang A, Cowan S, & Bieniasz PD (2005). Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J Virol* **79**, 8969-8978.

- Picker LJ (2006). Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* **18**, 399-405.
- Planelles V, Jowett JB, Li QX, Xie Y, Hahn B, & Chen IS (1996). Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol* **70**, 2516-2524.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, & Simon F (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**, 871-872.
- Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, & Yeager M (2009). X-ray structure of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* **137**, 1282-1292.
- Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, & Yeager M (2011). Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* **469**, 424-427.
- Purcell DF, & Martin MA (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**, 6365-6378.
- Rauidi ML, Mac Donald CL, Affranchino JL, & González SA (2011). Mapping of the self-interaction domains in the simian immunodeficiency virus Gag polyprotein. *AIDS Res Human Retroviruses* **27**, 303-316.
- Reggeti F, Ackerley C, & Bienzle D (2008). CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells. *J Gen Virol* **89**, 277-287.
- Richter S, Ping Y-H, & Rana TM (2002). TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7928-7933.
- Rideout BA, Lowensteine LJ, Hutson CA, Moore PF, & Pedersen NC (1992). Characterization of morphologic changes and lymphocyte subset distribution in lymph nodes from cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet Pathol* **29**, 391-399.
- Rihn SJ, Wilson SJ, Loman NJ, Alim M, Bakker SE, Bhella D, Gifford RJ, Rixon FJ, & Bieniasz PD (2013). Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog* **9**, e1003461.

- Romani B, Engelbrecht S, & Glashoff RH (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**, 1-12.
- Ruiz A, Guatelli JC, & Stephens EB (2010). The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation. *Curr HIV Res* **8**, 240-252.
- Saenz DT, Teo W, Olsen JC, & Poeschla E (2005). Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5 α proteins. *J Virol* **79**, 15175-15188.
- Salvi R, Garbuglia AR, Di CA, Pulciani S, Montella F, & Benedetto A (1998). Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* **72**, 3646-3657.
- Sasada A, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Kobayashi M, Abudu A, Hishizawa M, Imada K, Tanaka Y, & Uchiyama T (2005). APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2**:32.
- Schägger H, & von Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, & Bushman F (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-529.
- Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, & Heard JM (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**, 338-342.
- Schindler M, Würfl S, Benaroch P, Greenough TC, Daniels R, Easterbrook P, Brenner M, Münch J, & Kirchhoff F (2003). Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* **77**, 10548-10556.
- Serrière J, Fenel D, Schoehn G, Gouet P, & Guillon C (2013). Biophysical characterization of the feline immunodeficiency virus p24 capsid protein conformation and *in vitro* capsid assembly. *PLoS One* **8**:e56424.

- Sharova N, Wu Y, Zhu X, Stranska R, Kaushik R, Sharkey M, & Stevenson M (2008). Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction. *PLoS Pathog* **4**:e1000057.
- Sharp PM, Bailes E, Stevenson M, Emerman M, & Hahn BH (1996). Gene acquisition in HIV and SIV. *Nature* **383**, 586-587.
- Sharp PM, & Hahn BH (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**:a006841.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, & Malim MH (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650.
- Shibagaki Y, & Chow SA (1997). Central core domain of retroviral integrase is responsible for target site selection. *J Biol Chem* **272**, 8361-8369.
- Shimajima M, Miyazawa T, Ikeda Y, McMonagle EL, Haining H, Akashi H, Takeuchi Y, Hosie MJ, & Willett BJ (2004). Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* **303**, 1192-1195.
- Sloan RD, & Weinberg MA (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* **8**: 52.
- Srivastava S, Swanson SK, Manel N, Florens L, Washburn MP, & Skowronski J (2008). Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection. *PLoS Pathog* **4**:e1000059.
- Stewart SA, Poon B, Jowett JB, Xie Y, & Chen IS (1999). Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12039-12043.
- Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, & Greene WC (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**, 591-601.
- Sundquist WI, & Hill CP (2007). How to assemble a capsid. *Cell* **131**, 17-19.
- Sundquist WI, & Kräusslich HG (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006924.

- Swanstrom R, & Wills JW (1997). Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. En: *Retroviruses*, Coffin JM, Hughes SH, & Varmus HE (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 263-334.
- Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, & Pedersen NC (1989). Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5743-5747.
- Tang S, Murakami T, Agresta BE, Campbell S, Freed EO, & Levin JG (2001). Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants that exhibit aberrant core morphology and are blocked in initiation of reverse transcription in infected cells. *J Virol* **75**, 9357-9366.
- Tang C, Ndassa Y & Summers MF (2002). Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein. *Nat Struct Biol* **9**, 537-543.
- Tautz D, & Renz M (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem* **132**, 14-19.
- Telesnitsky A, & Goff SP (1997). Reverse transcription and the generation of retroviral DNA. En *Retroviruses*, Coffin JM, Hughes SH, & Varmus HE (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 121-160.
- Tokarev A, Shasko M, Fitzpatrick K, & Guatelli J (2009). Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin. *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**, 1197-1210.
- Tomonaga K, & Mikami T (1996). Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. *J Gen Virol* **77**, 1611-1621.
- Trinh T, Jesse J, Bloom F, & Hirsch V (1994). STBL2TM: an Escherichia coli strain for the stable propagation of retroviral clones and direct repeat sequences. *Focus* **16**, 78-80.
- Troyer JL, Vandewoude S, Pecon-Slattery J, McIntosh C, Franklin S, Antunes A, Johnson W, & O'Brien SJ (2008). FIV cross-species transmission: an evolutionary prospective. *Vet Immunol Immunopathol* **123**, 159-166.
- Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, & Trono D (2004). Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* **303**, 1829.

- Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembi N, Mbanya D, Kaptué L, Gürtler LG, McArthur CP, Devare SG, & Brennan CA (2010). Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**, 109-115.
- Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, & Guatelli J (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3**, 245-252.
- Van der Velden GJ, Vink MA, Berkhout B, & Das AT (2012). Tat has a dual role in simian immunodeficiency virus transcription. *J Gen Virol* **93**, 2279-2289.
- Vandewoude S, & Apetrei C (2006). Going wild: Lessons from T-lymphotropic naturally occurring lentiviruses. *Clin Microbiol Rev* **19**, 728-762.
- Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, & Peeters M (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164.
- Van Rompay KK (2010). Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. *Antiviral Res* **85**, 159-175.
- VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, & Carter CA (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55 (Gag). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7724-7729.
- von Schwedler UK, Stemmler TL, Klishko VY, Li S, Albertine KH, Davis DR, & Sundquist WI (1998). Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J* **17**, 1555-1568.
- von Schwedler UK, Stray KM, Garrus JE, & Sundquist WI (2003). Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol* **77**, 5439-5450.
- Wagaman PC, Hasselkus-Light CS, Henson M, Lerner DL, Phillips TR, & Elder JH (1993). Molecular cloning and characterization of deoxyuridine triphosphatase from feline immunodeficiency virus (FIV). *Virology* **196**, 451-457.

- Waters AK, de Parseval AP, Lerner DL, Neil JC, Thompson FJ, & Elder JH (1996). Influence of ORF2 on host cell tropism of feline immunodeficiency virus. *Virology* **215**, 10-16.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, & Jones KA (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, 451-462.
- Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, & Kappes JC (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1896-1905.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, & Wiley DC (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.
- Whitwam T, Peretz M, & Poeschla E (2001). Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J Virol* **75**, 9407-9414.
- Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Hass F, Welker R, Kräusslich HG, Boulanger P, & Fuller SD (2001). Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**, 759-771.
- Willett BJ, Flynn JN, & Hosie MJ (1997). FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. *Immunol Today* **18**, 182-189.
- Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, & Hope TJ (2006). Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7465-7470.
- Yao XJ, Mouland AJ, Subbramanian RA, Forget J, Rougeau N, Bergeron D, & Cohen EA (1998). Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. *J Virol* **72**, 4686-4693.
- Yu XF, Matsuda M, Essex M, & Lee TH (1990). Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J Virol* **64**, 5688-5693.

- Yu X, Yuan X, Matsuda Z, Lee TH, & Essex M (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* **66**, 4966-4971.
- Yuan X, Yu X, Lee TH, & Essex M (1993). Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol* **67**, 6387-6394.
- Zennou V, Pettit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, & Charneau P (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185.
- Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, Johnson MC, Munch J, Kirchhoff F, Bieniasz PD, & Hatzioannou T (2009). Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe* **6**, 54-67.
- Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, & Gao L (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-98.
- Zhang Y, & Barklis E (1997). Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J Virol* **71**, 6765-6776.
- Zhang Y, Qian H, Love Z, & Barklis E (1998). Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol* **72**, 1782-1789.
- Zhao G, Perilla JR, Yufenyuy EL, Meng X, Chen B, Ning J, Ahn J, Gronenborn AM, Schulten K, Aiken C, & Zhang P (2013). Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* **497**, 643-646.
- Zhou W, Parent L, Wills J, & Resh MD (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**, 2556-2569.