RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Abdusetir Cerfoglio, Juan Carlos

Caracterización de los dominios de interacción de la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia de felinos

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Abdusetir Cerfoglio, J. C. (2016). Caracterización de los dominios de interacción de la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia de felinos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/200

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Abdusetir Cerfoglio, Juan Carlos, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Marzo de 2016, 82 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Caracterización de los dominios de interacción de la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia de felinos

Juan Carlos Abdusetir Cerfoglio

jc_unq@yahoo.com.ar

Resumen

El virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV) es un lentivirus que induce en gatos domésticos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA causado por el virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV). FIV no sólo es un patógeno de importancia para la medicina veterinaria sino que también es un modelo ampliamente utilizado de las infecciones causadas por HIV en humanos. FIV se ensambla en la membrana plasmática de las células infectadas como consecuencia de la multimerización de la poliproteína viral Gag. Esta proteína posee toda la información necesaria para el ensamblado de viriones. En efecto, nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la expresión de Gag de FIV en células de mamífero resulta en la formación de partículas que son similares a los viriones inmaduros auténticos. Por otro lado, nuestro grupo ha establecido las condiciones que permiten que la proteína Gag de FIV producida en *Escherichia coli* se ensamble *in vitro* en partículas esféricas.

Los viriones de FIV son liberados al medio extracelular por brotación a partir de la membrana plasmática de las células infectadas. Inicialmente, los viriones liberados exhiben una morfología inmadura. Luego, durante la brotación, el precursor Gag es procesado por la proteasa viral para dar las proteínas del virión maduro: matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC), así como el péptido espaciador p1 y el péptido C- terminal p2. Es interesante destacar que los roles estructurales y funcionales de las proteínas MA, CA y NC en el virión maduro son diferentes a los que ejercen como dominios de la poliproteína Gag durante el proceso de ensamblado viral.

Nuestro laboratorio ha investigado previamente el rol de la MA y la NC en la morfogénesis de las partículas y en la infectividad viral. Sin embargo, nuestro conocimiento del ensamblado de FIV es aún limitado. En particular, las secuencias en el precursor Gag de FIV cuya interacción promueve la multimerización de esta proteína en partículas, no han sido todavía identificadas. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue entonces mapear las regiones de la proteína Gag de FIV responsables de las asociaciones homoméricas que conducen al ensamblado de viriones.

Para ello, generamos una serie de subdominios de Gag y estudiamos su habilidad para interactuar con moléculas de Gag de tamaño completo y ser reclutadas en partículas pseudovirales extracelulares. Al caracterizar el fenotipo de los distintos subdominios de Gag, encontramos que la deleción de los 37 residuos C-terminales de Gag así como la eliminación de las regiones amino y central de la NC atenúan pero no impiden la interacción con Gag salvaje. En cambio, un mutante de Gag que incluye a los dominios MA y CA exhibe un grado muy reducido de asociación con la proteína Gag de tamaño completo. La interacción con Gag es abolida al delecionar la mayor parte de la NC y los 40 aminoácidos N-terminales de la MA. Este

mutante, al carecer de los motivos “dedos de zinc” de la NC y de la región polibásica de la MA, se hallaría impedido de interactuar con el ARN viral. En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la asociación Gag-ARN viral es necesaria para el ensamblado de partículas tanto *in vivo* como *in vitro*. Al analizar el fenotipo de las proteínas maduras MA, CA y NC encontramos que ninguna de ellas se asocia con Gag salvaje. En cambio, cabe destacar que el subdominio CA-NC interactúa con Gag con gran eficiencia y es reclutado en partículas en una proporción cercana al 50 % de la masa proteica total de las partículas.

Resultó interesante el fenotipo observado tanto para la proteína Gag a la cual se le introdujo una mutación que impide su miristilación como para la proteína Gag a la que se le eliminó el péptido C-terminal p2 que media la brotación de las partículas al medio extracelular. Al coexpresar cada uno de estos mutantes con la proteína Gag completa, encontramos que ambos exhiben un efecto transdominante negativo sobre el ensamblado de Gag salvaje.

Finalmente, introdujimos una serie de deleciones internas en el dominio CA de Gag y encontramos regiones tanto en la porción amino como en la carboxilo que son necesarias para el ensamblado de las partículas virales.

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que la región CA-NC constituye el principal dominio de interacción Gag-Gag y que la capacidad de Gag de unir ARN viral es necesaria para su multimerización. Por otro lado, identificamos dominios en la CA de FIV cuya integridad es esencial para el ensamblado de Gag en partículas.

Las investigaciones aquí presentadas contribuyen a una mayor comprensión del proceso de ensamblado lentiviral, el cual es un blanco potencial al cual dirigir estrategias antivirales que resulten de utilidad tanto para la medicina veterinaria como para la humana.

Director: Dr. José Luis Affranchino

Codirectora: Dra. Silvia Adriana González

Consejero de posgrado: Dr. Pablo Daniel Ghiringhelli

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

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Esta Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes fue realizada en el Laboratorio de Virología, CONICET – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano, gracias a la obtención de una Beca de nivel inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al otorgamiento de una Beca de Finalización de Doctorado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

- **Abdusetir Cerfoglio, J.C., González, S.A. and Affranchino, J.L.** (2014) Structural elements in the Gag polyprotein of feline immunodeficiency virus involved in Gag self-association and assembly. Journal of General Virology 95, 2050-2059.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Agradecimientos

En primer lugar y principalmente quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. José Luis Affranchino y Dra. Silvia Adriana González por otorgarme una beca de nivel inicial de la ANPCyT e incorporarme a su grupo de investigación; por guiarme y ayudarme siempre, por escucharme y decirme; por su compañía, tiempo y paciencia durante el desarrollo de esta tesis, brindándome los recursos que me permitieron completar este trabajo.

A mis compañeros durante todos estos años: Dr. Juan Ignacio Falcón, Lic. María Jimena Esteva, Lic. Fiorella Spinelli, Dra. Mónica Paladino, Dra. María Rauddi, Lic. Raúl Arenas Carvajal, Julián Gallardo, Ignacio Giraudy y especialmente a la Lic. Cecilia Mac Donald por los ensayos en común que forman parte de esta Tesis.

También quiero agradecer a la ANPCyT y al CONICET por las becas que me permitieron transitar este camino.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. Descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)
2. Generalidades de FIV
    - *Lentivirus*
    - FIV
        - Distribución mundial
        - Transmisión
        - Patogénesis
        - Desarrollo de una vacuna dirigida a FIV
3. Ciclo de replicación de FIV
4. Estructura del virión
5. Organización genómica de FIV
6. Proteínas de FIV
    - Gag
    - Pol
    - 6.2.1. PR
    - 6.2.2. TR
    - 6.2.3. IN
    - 6.2.4. DU
    - Env
    - 6.3.1. SU
    - 6.3.2. TM
    - Proteínas regulatorias
        - Rev
        - Vif
        - ORF-A
        - Función regulatoria de la glicoproteína Env en FIV
7. Entrada viral
    - Unión de FIV a la superficie celular
    - Mecanismo de fusión de la membrana viral con la celular

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

8. Ensamblado
8.1. MA
8.2. CA
8.3. NC
8.4. p2
9. Brotación de los viriones
10. Resumen de las funciones de las proteínas de FIV

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células y virus
2. Sueros y anticuerpos para la detección de proteínas de FIV
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
4. Electroforesis de ADN
5. Reacciones de ligación
6. Transformación de bacterias competentes
7. Purificación de ADN plasmídico
8. Construcciones plasmídicas que expresan subdominios de la poliproteína Gag de FIV
9. Construcción de recombinantes del virus vaccinia
10. Expresión de subdominios de Gag de FIV en células de mamífero
11. Expresión en células de mamífero de las proteínas Gag de FIV con deleciones internas en el dominio CA
12. Preparacion de lisados celulares
13. Purificación de VLPs
14. Electroforesis de proteínas
15. Ensayos de *Western blot*
16. Rescate de los subdominios de Gag en partículas pseudovirales por asociación con Gag salvaje
17. Expresión en *E. coli* y purificación de los dominios de la poliproteína Gag de FIV
18. Transcripción *in vitro* de ARN biotinilado
19. Ensayo de *Northwestern blot*

RESULTADOS

1. Construcción de subdominios de la proteína Gag de FIV
2. Capacidad de los subdominios de Gag de FIV de interactuar *in vivo* con Gag salvaje
3. Capacidad de las proteínas maduras derivadas de la poliproteína Gag de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

asociarse a Gag salvaje
4. Análisis de la capacidad del mutante GagΔ1-40/Δ367-413 de unirse a Gag salvaje
5. Fenotipo dominante negativo de proteínas Gag de FIV careciendo del dominio p2 o del grupo miristato
6. Efecto sobre el ensamblado de partículas de deleciones internas en el dominio CA de Gag de FIV
7. Capacidad de la proteína MA de FIV de unir ARN viral

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las funciones de las proteínas de FIV

Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR las regiones del gen *gag* de FIV

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para los generar mutantes de la proteína Gag de FIV llevando deleciones internas en su dominio CA

Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR los genes que codifican para las proteínas MA, MAΔ1-40 y NC de FIV

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de replicación de FIV

Figura 2. Esquema de la estructura del virión lentiviral maduro

Figura 3. Esquema del genoma completo del clon molecular FIV-14 del aislamiento Petaluma

Figura 4. Esquema del gen *gag* de FIV

Figura 5. Estrategia para expresar la proteína Gag de FIV con una extensión de 45 aminoácidos en su extremo N-terminal.

Figura 6. Esquema del vector de transferencia de vaccinia pMJ601

Figura 7. Esquema del ensayo de rescate de subdominios de Gag en VLPs por interacción con Gag salvaje

Figura 8. Construcción de los subdominios de Gag de FIV

Figura 9. Análisis en cultivos celulares de la capacidad de interacción de diferentes subdominios de Gag de FIV con Gag salvaje

Figura 10. Cuantificación en las VLPs de la cantidad de cada subdominio de Gag

Figura 11. Análisis de la asociación de las proteínas MA, CA y NC con Gag salvaje

Figura 12. Interacción de los mutantes GagΔ1-40/Δ367-413 y GagΔ1-40 con Gag salvaje

Figura 13. Efecto de la expresión de Gag1-432 junto con Gag salvaje sobre la producción de partículas extracelulares

Figura 14. Efecto de la coexpresión de proteína Gag no miristilada con Gag salvaje sobre la formación de VLPs

Figura 15. Efecto de las deleciones internas en el dominio CA de Gag de FIV sobre la producción de VLPs

Figura 16. Sonda de ARN viral biotinilado utilizada en los ensayos de *Northwestern blot*

Figura 17. Análisis por *Northwestern blot* de la capacidad de interacción de la MA, MAΔ1-40, y NC con el ARN viral

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
β-gal	β-galactosidasa
BSA	seroalbúmina bovina
CA	proteína cápside
CTD	dominio C-terminal de la CA
C-terminal	carboxilo terminal
D-MEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DS	desviación estándar
DTT	ditiotreitol
DU	desoxiuridina trifosfatasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Env	glicoproteína viral de envoltura
et al.	y colaboradores
HIV	virus de la inmunodeficiencia de humanos
IN	integrasa
kb	mil pares de bases
kDa	mil daltons
LB	medio Luria-Bertani
LTR	regiones terminales largas
MA	proteína matriz
MAb	anticuerpo monoclonal
NC	proteína nucleocápside
nt	nucleótidos
NTD	dominio N-terminal de la CA
N-terminal	amino terminal
NW	*Northwestern blot*
p2	péptido C-terminal de Gag
PBS	solución salina de buffer fosfato
PBST	PBS – 0,1 % Tween 20

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PR	proteasa viral
RRE	elemento de respuesta a Rev
TR	transcriptasa reversa viral
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida - 0,1 % SDS SFB
	suero fetal bovino
SIV	virus de la inmunodeficiencia de simios
SU	subunidad de superficie de Env
TK	timidina kinasa
TM	subunidad de transmembrana de Env
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
VLPs	partículas pseudovirales
WB	*Western blot*
WT	salvaje
xg	múltiplo de la fuerza de gravedad
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Introducción

1. Descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV)

FIV fue aislado en 1986 por el Dr. Niels Pedersen a partir de gatos domésticos que exhibían un cuadro de inmunodeficiencia similar al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) de humanos causado por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Pedersen *et al.*, 1987). El análisis por microscopía electrónica de tejidos provenientes de los gatos con inmunodeficiencia mostró la presencia de partículas virales con la morfología típica de los lentivirus (Pedersen *et al.*, 1987). Por otro lado, el virus aislado de los gatos enfermos poseía actividad de retrotranscripción dependiente de magnesio (Mg+2), y no de manganeso (Mn+2) como en el caso de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia felina, lo que apoyaba que FIV pertenecía a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus* (Pedersen *et al.*, 1987).

2. Generalidades de FIV

Lentivirus

La familia *Retroviridae* comprende a un grupo de virus con un genoma compuesto por dos moléculas idénticas de ARN. Por acción de la transcriptasa viral, el ARN genómico es convertido en una molécula de ADN doble cadena, la cual se integra en los cromosomas de la célula hospedadora (Coffin, 1996). Dentro de esta familia se encuentra el género *Lentivirus* que incluye a retrovirus complejos, que se caracterizan por producir infecciones persistentes y enfermedades que progresan muy lentamente (Clements & Zink, 1996).

Los lentivirus se dividen en dos grupos (Clements & Zink, 1996). Por un lado, se encuentran los virus que causan inmunodeficiencia en sus hospedadores, tales como HIV, FIV y los virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y de bovinos (BIV). Estos lentivirus infectan a linfocitos T, monocitos y macrófagos, y producen un síndrome caracterizado por la pérdida progresiva de la capacidad inmunológica (Clements & Zink, 1996). El segundo grupo incluye a lentivirus que, si bien también infectan monocitos y macrófagos, causan enfermedades que afectan a diferentes órganos (Clements & Zink, 1996). A este grupo pertenecen el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la artritis y encefalitis caprina (CAEV) y el virus Maedi-Visna (Clements & Zink, 1996).

FIV

FIV es un lentivirus que causa en gatos domésticos una patología que es conocida en la medicina veterinaria como SIDA felino (Pedersen *et al.*, 1987; Sparger *et al.*, 1989). Resulta interesante mencionar que FIV también es capaz de infectar a felinos salvajes, pero llamativamente los animales infectados no desarrollan inmunodeficiencia (White *et al.*, 2011).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Se ha sugerido que la selección natural de felinos resistentes a FIV o la atenuación de FIV en felinos salvajes podrían explicar por qué estos animales salvajes no desarrollan SIDA (Pecon-Slattery *et al.*, 2008; White *et al.*, 2011).

Cabe destacar que FIV comparte características morfológicas y genéticas, y su estrategia de replicación con los lentivirus de primates HIV y SIV (Bendinelli *et al.*, 1995), por lo que FIV no sólo es un patógeno de importancia para la medicina veterinaria sino que también es reconocido internacionalmente como un modelo adecuado de las infecciones causadas por HIV en humanos (Elder *et al.*, 2010; Kenyon & Lever, 2011; Yamamoto *et al.*, 2010).

Distribución mundial

FIV se encuentra distribuido en todo el mundo e infecta a una gran cantidad de miembros de la familia *Felidae* (Courchamp & Pontier, 1994). La prevalencia de la infección de gatos domésticos varía entre un 2,5 % y un 25 % dependiendo de la localización geográfica, la edad y el sexo del animal, las condiciones de vida y los patrones de comportamiento, siendo menor en gatos mantenidos como mascotas que en gatos libres o callejeros (Hayward & Rodrigo, 2010).

Transmisión

FIV puede ser aislado de la sangre, la saliva, el semen, las secreciones vaginales y la leche materna de gatos infectados (Jordan *et al.*, 1998; Sellon *et al.*, 1994). Se ha demostrado experimentalmente que FIV puede ser transmitido verticalmente y que el porcentaje de crías que nacen infectadas depende de que la madre posea una carga viral elevada durante la gestación y/o en el momento del parto (Allison & Hoover, 2003; O'Neil *et al.*, 1995). Aunque ha sido demostrada experimentalmente, la transmisión sexual del virus parece ser poco frecuente (Jordan *et al.*, 1998). En la naturaleza, FIV se transmite principalmente por mordeduras (Matteucci *et al.*, 1993). En la saliva de gatos infectados hay células infectadas y virus libre que pueden ser transferidos a individuos sanos en peleas por territorio o durante el apareamiento (Matteucci *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1989).

Patogénesis

Basándose en observaciones clínicas, la progresión de la infección con FIV al SIDA felino puede ser dividida en etapas definidas (Ishida & Tomoda, 1990).

Poco tiempo después de la inoculación experimental de FIV en gatos sanos se observa el desarrollo de una infección aguda caracterizada por episodios febriles, linfoadenopatía, leucopenia, diarrea y deficiencia respiratoria. Estos síntomas clínicos no suelen extenderse

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

más allá de unas semanas o de unos pocos meses y coinciden con la detección en plasma de una carga viral alta (Beebe *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1989; Pedersen *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1988). Luego comienza una fase asintomática, la cual es acompañada por una recuperación del sistema inmune y niveles bajos de virus circulante (Pedersen *et al.*, 1989). Durante esta etapa, que suele extenderse por varios años, se observa una disminución gradual pero sostenida de los niveles normales de linfocitos T CD4+ (Torten *et al.*, 1991). Con el paso del tiempo, aunque el animal permanece aparentemente saludable, se establece un estado persistente de linfoadenopatía generalizada debido a que no se recuperan los niveles normales de linfocitos T CD4+ en circulación (Ishida & Tomoda, 1990). Si bien el blanco principal de FIV son los linfocitos T CD4+ activados, con el avance de la infección el tropismo celular del virus se amplía y puede infectar linfocitos B, linfocitos T CD8+, macrófagos y células de la microglía y astrocitos (Willett & Hosie, 2008). El debilitamiento del sistema inmune da nuevamente lugar a la aparición de signos clínicos, tales como pérdida de peso e infecciones oportunistas (English *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1989; Pedersen & Barlough, 1991). Los gatos que sobreviven los meses que dura esta etapa, desarrollan SIDA felino. A medida que se profundiza el daño inmunológico, aparecen manifestaciones neurológicas que incluyen alteraciones del ciclo del sueño y desórdenes auditivos y visuales (Phillips *et al.*, 1994, 1996; Prospero- Garcia *et al.*, 1994a, 1994b). Además, se agudiza la patogenia derivada de las infecciones oportunistas y suelen aparecer tumores malignos. Finalmente, los animales infectados mueren por fallas en diferentes órganos (Ishida & Tomoda, 1990; Yamamoto *et al.*, 1988, 1989).

Desarrollo de una vacuna dirigida a FIV

Existen cinco subtipos circulantes de FIV (A-E) alrededor del mundo. Si bien los subtipos A, B y C exhiben mayor prevalencia (Yamamoto *et al.*, 2007), también se detectan virus con subtipos combinados (Hayward & Rodrigo, 2008). El subtipo viral se halla determinado por regiones aminoacídicas variables en la glicoproteína de envoltura de FIV (Sodora *et al.*, 1994).

Se han ensayado vacunas contra FIV basadas en virus inactivados, proteínas virales recombinantes y ADN de genes virales, aunque ninguna de éstas generó niveles significativos de protección (Yamamoto *et al.*, 2010). Finalmente, en 2002 las autoridades sanitarias de los Estados Unidos aprobaron la comercialización de la vacuna FEL-O-VAX. Su formulación, que combina cepas inactivadas de los subtipos A y D junto con células infectadas con ambos subtipos del virus, demostró una efectividad de entre el 67 y el 87 % (Uhl *et al.*, 2008). Esta vacuna confiere protección no sólo frente a los virus que circulan en Estados Unidos sino también frente a virus hallados en otras partes del mundo. Actualmente, la vacuna contra FIV es utilizada en Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y Nueva Zelanda (Hayward & Rodrigo, 2010).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3. Ciclo de replicación de FIV

El ciclo de replicación de FIV (Figura 1) es similar al del resto de los lentivirus (Bendinelli *et al.*, 1995; Coffin, 1996; Kenyon & Lever, 2011). FIV posee una única glicoproteína viral de envoltura (Env) que reconoce receptores celulares específicos en la célula hospedadora y promueve la fusión de la membrana viral (derivada de la membrana plasmática de la célula progenitora) con la membrana de la célula blanco. Como consecuencia de esta fusión, se produce la entrada del virus a la célula. Luego se desarma la partícula, lo que resulta en el desnudamiento del *core* viral. A continuación, la transcriptasa reversa (TR) transportada en el virión, cataliza la síntesis de una molécula de ADN doble cadena utilizando como molde al ARN genómico viral. Para iniciar la síntesis del ADN, la TR emplea como cebador a una molécula de ARNtlisina que se halla unida cerca del extremo 5' del ARN genómico viral. Se sintetiza entonces un fragmento de ADN simple cadena de polaridad (-) el cual se trasloca para hibridar con la región 3' del ARN viral. Esto permite la síntesis del ADN copia de polaridad negativa. Luego, la actividad de RNasa H de la TR degrada al templado de ARN viral con excepción de un fragmento el cual sirve de molde para el comienzo de la síntesis de la cadena de ADN copia de polaridad (+). Finalmente, las cadenas de ADN (-) y (+) forman una estructura circular que permite que se complete la síntesis de la cadena (+). Una vez sintetizado, el ADN viral es transportado al interior del núcleo en la forma de un complejo de preintegración formado por las proteínas cápside (CA), matriz (MA) e integrasa (IN). Una vez dentro del núcleo, la IN media la incorporación del ADN viral a los cromosomas de la célula hospedadora. Al ADN viral integrado en el ADN celular se lo denomina provirus. A continuación, se sintetizan los ARN mensajeros (ARNm) virales utilizando la ARN polimerasa II celular. Los primeros ARNm que se sintetizan resultan del procesamiento o *splicing* de un ARN de tamaño genómico, el cual es el producto primario de la transcripción. Una de las primeras proteínas virales que se sintetiza es la proteína Rev, la cual ingresa al núcleo y se une al "elemento de respuesta a Rev" (RRE) presente en el ARN de tamaño genómico. Rev, por un lado, evita que este ARN sea procesado, y por otro, permite que sea transportado al citoplasma. El ARN de tamaño genómico es utilizado como genoma de las partículas virales y como mensajero para generar las proteínas Gag y Gag-Pol. La proteína Gag-Pol se produce como consecuencia de un corrimiento de -1 en la lectura mediada por el ribosoma de la región del ARN que codifica para el extremo 3' de *gag*. Este fenómeno ocurre con una frecuencia de 1 cada 10 eventos de lectura ribosomal. La proteína Gag se ensambla en partículas en la membrana plasmática de la célula infectada. Estas partículas en formación incorporan a Gag-Pol, al ARN genómico y a la glicoproteína Env. Esta última se halla anclada en la membrana plasmática de la célula infectada luego de ser sintetizada por ribosomas asociados al retículo endoplásmico y ser transportada por la vía secretoria celular. Una vez que los viriones se ensamblan, brotan al medio extracelular. Durante o luego de la brotación, se produce la activación de la proteasa

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

viral (PR) presente en Gag-Pol. La PR, además de clivar a Pol para liberarse a si misma y generar a las proteínas IN y TR, procesa al precursor Gag para formar las proteínas del virión maduro: MA, CA y nucleocápside (NC). De esta forma se generan partículas virales extracelulares con capacidad infectiva.

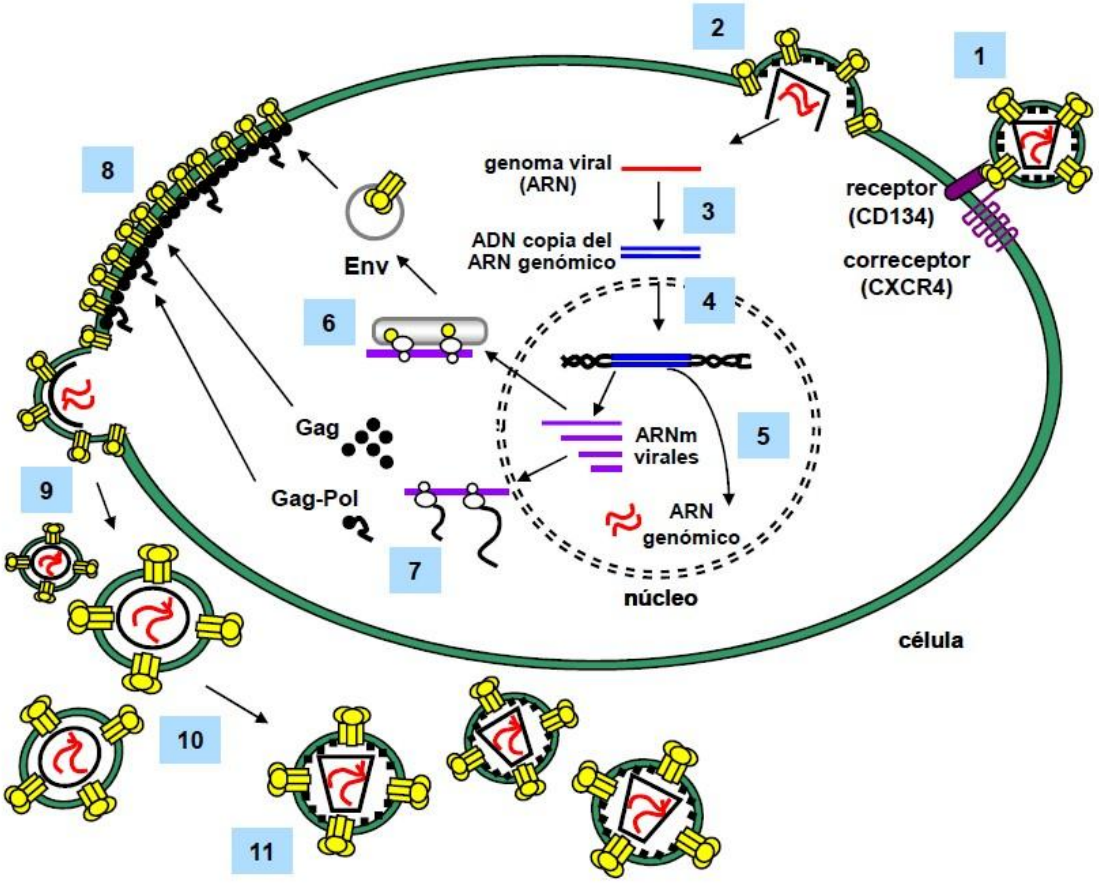


Figura 1. Esquema del ciclo de replicación de FIV. (1) Unión del virión a la superficie celular. La subunidad de superficie de la glicoproteína Env se asocia al receptor primario CD134 y al correceptor CXCR4; (2) Entrada de FIV a la célula. La subunidad de transmembrana de Env promueve la fusión de la membrana viral con la celular permitiendo así la entrada del virus al citoplasma; (3) Retrotranscripción. La TR sintetiza un ADN doble cadena utilizando como molde al ARN genómico viral; (4) Integración. La IN introduce el ADN viral en los cromosomas de la célula hospedadora. La forma integrada del ADN viral recibe el nombre de provirus; (5) Transcripción del ADN viral y síntesis de los ARNm que codifican a 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 y transporte 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 de FIV. Se liberan al medio extracelular viriones inmaduros; (11) Maduración. Se activa la PR, la cual procesa a las proteínas Gag y Gag-Pol. El procesamiento de Gag produce las proteínas MA, CA, NC, así

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

como el péptido espaciador p1 y el péptido C-terminal p2. El procesamiento de Pol genera las enzimas PR, TR e IN. Adaptado de Affranchino (2007).

4. Estructura del virión

Los viriones maduros de FIV (Figura 2) son partículas esféricas de alrededor de 100 nm de diámetro (Pedersen *et al.*, 1987). La envoltura viral proviene de la membrana plasmática de la célula infectada y en ella se inserta la glicoproteína Env. La estructura del virión maduro de los lentivirus ha sido investigada en HIV-1 por criomicroscopía electrónica (Briggs *et al.*, 2003). De acuerdo a estos estudios, por debajo de la envoltura se halla la MA que forma una cubierta proteica. En su interior, la CA se ensambla en una estructura con forma de cono, la cual constituye el *core* viral. En el interior del *core* se halla el genoma viral: dos moléculas idénticas de ARN de polaridad positiva y de aproximadamente 10 kb (Olmsted *et al.*, 1989a). El ARN genómico forma un complejo ribonucleoproteico por asociación con la NC, la TR y la IN (Briggs *et al.*, 2003).

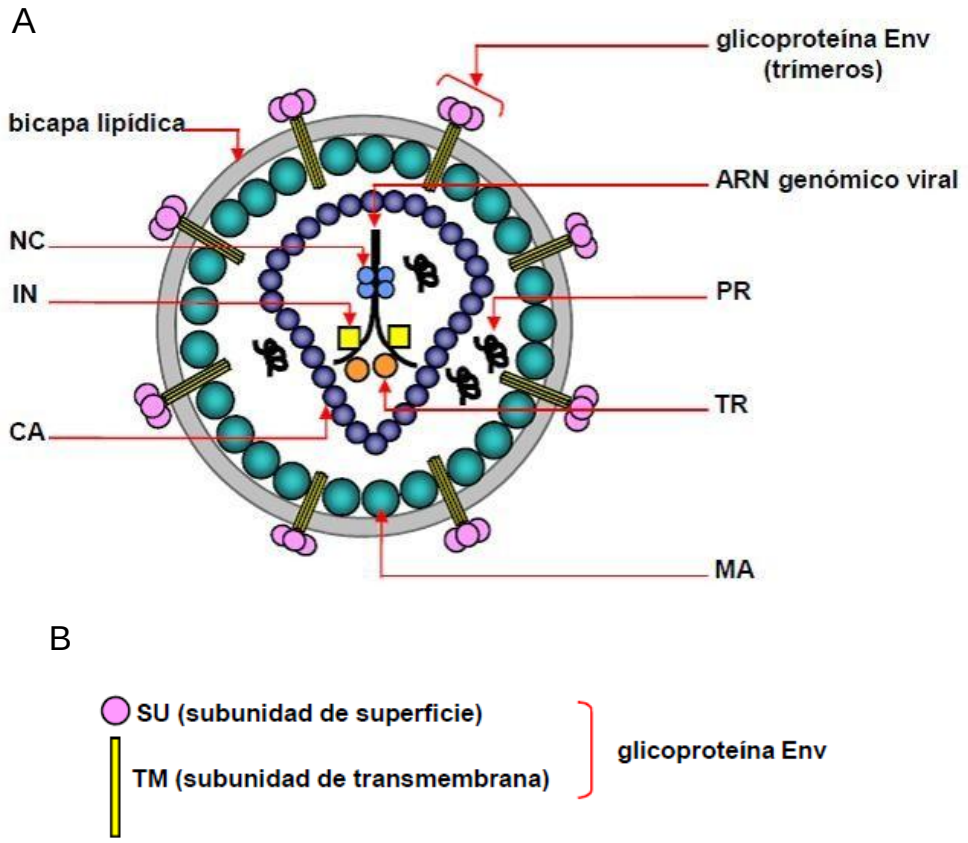


Figura 2. Esquema de la estructura del virión lentiviral maduro. A. Con flechas se indican los diferentes componentes de la partícula lentiviral madura. B. Se detallan las subunidades de la glicoproteína Env. Adaptado de Affranchino (2007).

5. Organización genómica de FIV

La organización genómica de FIV es similar en complejidad a la de otros lentivirus (Figura 3). Posee tres marcos abiertos de lectura que corresponden a los genes retrovirales típicos; *gag, pol* y *env*, dos regiones terminales largas (LTRs) localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, y otros genes que codifican para proteínas regulatorias (Olmsted *et al.*, 1989b; Talbott *et al.*, 1989).

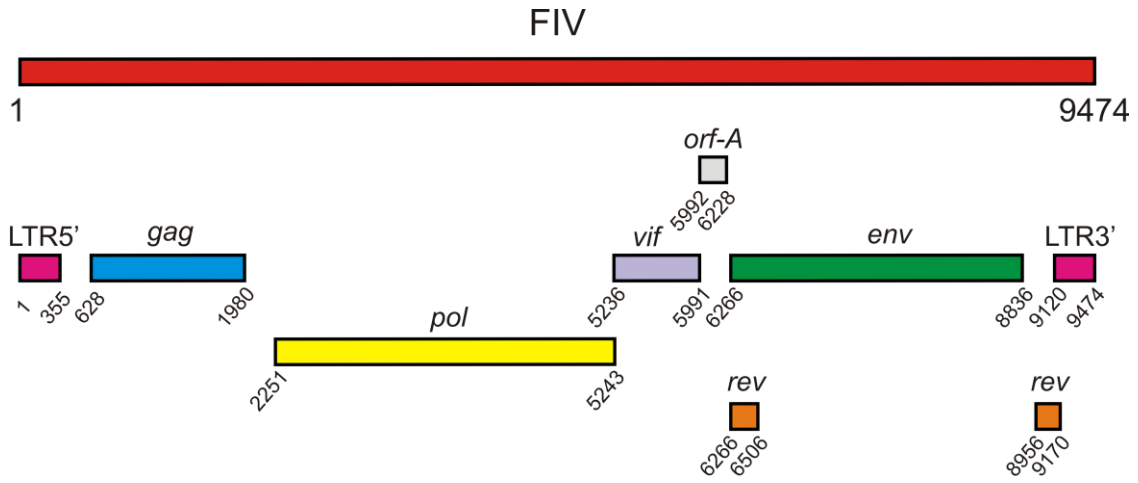


Figura 3. Esquema del genoma completo del clon molecular FIV-14 del aislamiento Petaluma. Se indican las LTR y los diferentes marcos abiertos de lectura junto con las posiciones nucleotídicas correspondientes. En el caso del gen regulatorio *rev* se muestran los dos exones que lo conforman.

6. Proteínas de FIV

Gag

Gag es una poliproteína que contiene toda la información necesaria y suficiente para dirigir el ensamblado y la brotación de los viriones. En efecto, nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión de Gag de FIV en células de mamífero en ausencia del resto de las proteínas virales resulta en la producción de partículas extracelulares que son morfológicamente indistinguibles de los viriones inmaduros auténticos (Manrique *et al.*, 2001). Además, nuestro grupo ha establecido las condiciones que permiten el ensamblado *in vitro* de Gag de FIV en partículas esféricas utilizando proteína Gag producida en *Escherichia coli* (Affranchino & González, 2010).

Al igual que en el resto de los lentivirus, la proteína Gag de FIV (Figura 4) se expresa como un precursor, el cual es clivado por la PR durante la brotación de los viriones al espacio extracelular, para dar las proteínas MA (135 aminoácidos), CA (222 aminoácidos) y NC (66 aminoácidos), el péptido espaciador p1 (9 aminoácidos) entre la CA y la NC, y el péptido C-terminal p2 (18 aminoácidos) (Elder *et al.*, 1993).

Figura 4. Esquema del gen *gag* de FIV. Se indican los diferentes marcos de lectura y sus posiciones nucleotídicas en el genoma del aislamiento Petaluma.

Pol

La poliproteína Pol se sintetiza a partir de un ARNm viral de tamaño completo que comprende la región *gag-pol* del genoma y que como consecuencia de un corrimiento del marco de lectura de -1 genera el precursor Gag-Pol (Morikawa & Bishop, 1992; Talbott *et al.*, 1989). Al igual que en HIV y SIV, el gen *pol* de FIV codifica para las enzimas PR, TR e IN, pero como ocurre con los lentivirus de animales ungulados, *pol* también codifica para una desoxiuridina trifosfatasa (DU) (Lerner *et al.*, 1995; Talbott *et al.*, 1989).

PR

La PR de FIV es una aspartato proteinasa cuya forma funcional es un homodímero (Laco *et al.*, 1997). Es la enzima responsable del procesamiento de los precursores Gag y Gag-Pol durante la maduración viral (Elder *et al.*, 1993), lo que resulta esencial para generar tanto las proteínas estructurales del virión maduro como las enzimas virales (Pettit *et al.*, 1998). Es por ello que la PR ha sido ampliamente estudiada con el propósito de encontrar compuestos que sean capaces de inhibir su actividad y bloquear de esta forma la infectividad (Swanstrom & Erona, 2000).

TR

La TR es la enzima responsable de sintetizar una molécula de ADN doble cadena utilizando como molde al ARN genómico viral (Telesnitsky & Goff, 1997). Para que la TR, la cual es un polipéptido de 67 kDa, sea enzimáticamente activa es necesario que algunas moléculas sean clivadas por la PR viral para generar especies de 54 kDa que forman heterodímeros con las subunidades de 67 kDa (Kenyon & Lever, 2011; North *et al.*, 1990).

La subunidad p67 exhibe un dominio N-terminal que posee actividad de polimerasa y un dominio C-terminal que presenta actividad de RNasa H, mientras que la presencia de la subunidad p54 en el heterodímero es necesaria para que el complejo sea estructuralmente estable y enzimáticamente activo (Beilhartz & Gotte, 2010; Telesnitsky & Goff, 1997). La TR de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

FIV utiliza Mg+2 como cofactor y es activa aún en presencia de niveles bajos de desoxirribonucleótidos trifosfato, como por ejemplo, en células que no se dividen. La poca fidelidad que muestra esta enzima durante la retrotranscripción del genoma del virus explicaría, al menos en parte, la diversidad de especies virales generadas postinfección (North *et al.*, 1990).

IN

El ADN doble cadena generado por la TR se integra en los cromosomas de la célula infectada en un proceso que es mediado por la IN. En FIV, como en el resto de los lentivirus, el proceso de integración involucra tres etapas. Primero, la IN elimina dos nucleótidos de los extremos 3' del ADN viral dejando extremos 5' simple cadena. A continuación, los grupos hidroxilo libres en los extremos 3' del ADN viral atacan a los enlaces fosfodiéster del ADN cromosomal quedando entonces el ADN viral ligado al ADN cromosomal a través de un proceso de transesterificación. Por último, se reparan las uniones ADN viral - ADN celular por acción de la maquinaria celular y por la TR y/o la IN. A través de este proceso se genera el provirus, es decir, el ADN viral integrado al genoma celular (Brown, 1990; Goff, 1992; Shibagaki *et al.*, 1997).

La IN de FIV forma multímeros a través de su dominio N-terminal (Shibagaki *et al.*, 1997). Estudios de mutagénesis dirigida de la IN de FIV han demostrado que esta proteína posee tres dominios: una región N-terminal que permite tanto la multimerización de la IN como su unión al ADN viral, un dominio central que contiene el sitio activo y una región C-terminal que contiene los elementos estructurales que median la interacción con el ADN celular (Shibagaki *et al.*, 1997).

DU

El gen que codifica para la DU se halla presente en el genoma de FIV y en el de los lentivirus de animales ungulados (Elder *et al.*, 1992; McClure *et al.*, 1988). Su función es catalizar la conversión de dUTP a dUMP, lo cual minimiza la incorporación de dUTP, en lugar de dTTP, al ADN viral durante la retrotranscripción lo que reduce la acumulación de mutaciones en el genoma de FIV (Elder *et al.*, 1992). La actividad antimutagénica de la DU codificada por FIV es esencial para la replicación viral en células que no se dividen activamente como en el caso de los macrófagos que exhiben niveles endógenos bajos de DU (Lerner *et al.*, 1995; Wagaman *et al.*, 1993). En cambio, mutantes de FIV con una DU defectiva son capaces de replicarse eficientemente en células que se dividen activamente y cuyos niveles endógenos de DU son elevados (Lerner *et al.*, 1995).

Env

La glicoproteína Env de FIV es sintetizada como un precursor altamente glicosilado de aproximadamente 150 kDa, del cual se elimina un péptido señal inusualmente largo de 174 aminoácidos, generándose una especie molecular de 130 kDa (Verschoor *et al.*, 1993). Este

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

precursor de 130 kDa es a su vez procesado en el trans-Golgi para generar las subunidades de superficie (SU; gp95) y de transmembrana (TM; gp40) las cuales permanecen asociadas a través de uniones no covalentes (Affranchino & González, 2014; Verschoor *et al.*, 1993). La subunidad SU de la proteína Env de FIV media la unión del virión al complejo receptor-correceptor celular (de Parseval & Elder, 2001) mientras que la TM promueve la fusión de la membrana viral con la membrana celular, permitiendo así la entrada de la partícula viral a la célula (Garg *et al.*, 2004; Giannecchini *et al.*, 2004). A pesar de que FIV infecta linfocitos T CD4+, utiliza a CD134 como receptor primario en lugar de CD4 (de Parseval *et al.*, 2004a; Shimojima *et al.*, 2004). Luego de interactuar con CD134, la SU de la proteína Env de FIV se asocia a CXCR4 que actúa como correceptor para la unión del virus a la superficie celular (Poeschla & Looney, 1998; Willett *et al.*, 1997a, 1997b).

SU

La SU de FIV se halla organizada en regiones constantes (C1-C6) y dominios variables (V1-V6) (Hu *et al.*, 2010). Tanto la variación antigénica de la SU como el elevado grado de glicosilación facilitan que FIV evada la respuesta inmune del hospedador (Hosie *et al.*, 2011). Entre los dominios variables de la SU de FIV se destaca el V3, ya que es la región más inmunogénica de esta proteína (de Ronde *et al.*, 1994; Lombardi *et al.*, 1993). Estudios de nuestro grupo y del laboratorio del Dr. Elder han demostrado que la deleción del dominio V3 de FIV inhibe por completo la unión de la SU a su correceptor CXCR4 (González *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2010; Sundstrom *et al.*, 2008). Por otro lado, nuestro grupo ha mostrado que si el dominio V3 de la SU de FIV es reemplazado por la región V3 de un aislamiento T-trópico de HIV-1, que también emplea a CXCR4 como correceptor, se obtiene una SU quimérica que no sólo se une eficientemente a CXCR4 sino que también es capaz de promover la fusión célula-célula dependiente de CXCR4 (González *et al.*, 2014).

TM

La TM de FIV conserva la organización estructural de las TM retrovirales: un dominio extracelular (ectodominio), una única región transmembrana y un dominio citoplasmático (Affranchino & González, 2014).

El dominio extracelular de la subunidad TM contiene el péptido de fusión, el cual junto a otros elementos estructurales de esta región median la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula infectada (Garg *et al.*, 2004).

El dominio citoplasmático de la subunidad TM de FIV es significativamente más corto (53 aminoácidos) que el del resto de las glicoproteínas Env lentivirales (100-200 aminoácidos) (Affranchino & González, 2014). Nuestro grupo ha demostrado que esta región modula tanto la capacidad fusogénica de Env como su incorporación a viriones (Celma *et al.*, 2007). Además, nuestro laboratorio también ha mostrado que las cuatro cisteínas que se hallan conservadas en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

el dominio citoplasmático de la TM de FIV son modificadas por la adición de ácido palmítico (González *et al.*, 2012). Resulta interesante destacar que la mutación de los dos residuos de cisteína más próximos a la región transmembrana de la TM anula la capacidad fusogénica de Env y su incorporación a viriones sin afectar la síntesis, el procesamiento o la expresión en la superficie celular de la proteína Env de FIV (González *et al.*, 2012).

Proteínas regulatorias

Los lentivirus poseen en su genoma además de los genes *gag*, *pol* y *env*, genes adicionales cuyos productos regulan diferentes etapas de la replicación viral. En el caso de FIV, se han descripto tres genes regulatorios: *rev* y *vif*, compartidos con el resto de los lentivirus, y *orf-A* el cual es específico de FIV.

Rev

Como resultado de la transcripción del provirus de FIV se generan tres clases de ARN_m: (i) uno no procesado de tamaño genómico; (ii) monoprocesados que sufren un único empalme de exones los cuales son empleados para la síntesis de las proteínas Env y Vif, y (iii) multiprocesados que dan lugar a las proteínas Rev y Orf-A (Tomonaga *et al.*, 1993). La proteína Rev cumple un rol esencial en la replicación viral ya que permite el transporte al citoplasma celular de los ARN_m virales monoprocesados y no procesados (Tomonaga & Mikami, 1996). Para ejercer su función, Rev ingresa al núcleo e interacciona con la región RRE presente en este tipo de transcriptos (Olsen *et al.*, 1990). Finalmente, el complejo Rev-ARN_m es transportado al citoplasma por interacción de Rev con la importina celular CRM1p (Neville *et al.*, 1997). Este proceso permite tanto la expresión de las proteínas Gag, Gag-Pol, Env y Vif, como la exportación al citoplasma del ARN genómico que será encapsidado por los viriones.

Vif

El rol desempeñado por la proteína Vif en el ciclo de replicación lentiviral ha sido extensamente estudiado en HIV-1. Se ha demostrado que la proteína celular APOBEC3G es una citidina desaminasa que, en ausencia de Vif, se incorpora a la partícula viral y en el siguiente ciclo de replicación produce la hipermutación del genoma del virus al convertir las citosinas en uracilos (Bishop *et al.*, 2004; Sheehy *et al.*, 2002). En células infectadas con HIV-1, Vif promueve la unión de la proteína celular APOBEC a la ubiquitina-ligasa, lo que conduce a la poliubiquitinación de APOBEC y a su degradación por el proteasoma (Yu *et al.*, 2003). Recientemente, se ha establecido que la proteína Vif de FIV cumple un rol similar al descripto para su equivalente en HIV-1 (Zielonka *et al.*, 2010).

ORF-A

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

El gen *orf-A* de FIV codifica un pequeño polipéptido de 77 aminoácidos. El primer estudio realizado sobre esta proteína viral le asignó el rol de factor transactivador de la transcripción del provirus, una función similar a la que cumple la proteína Tat de HIV y SIV (de Parseval & Elder, 1999). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que Orf-A no es una proteína transactivadora como lo es Tat sino que es necesaria para la producción de partículas virales infectivas (Gemeniano *et al.*, 2003). Además, se determinó que Orf-A exhibe localización nuclear y que promueve el arresto del ciclo celular en la fase G2, propiedad también exhibida por la proteína Vpr de HIV y SIV (Gemeniano *et al.*, 2004). Por otro lado, la proteína Orf-A reduce los niveles del receptor primario de FIV CD134 en la superficie de la célula infectada facilitando de esta forma la brotación de la progenie viral; un efecto similar al que ejercen sobre CD4 las proteínas Nef y Vpu de HIV-1 (Hong *et al.*, 2010).

Función regulatoria de la glicoproteína Env en FIV

La proteína celular *tetherin*, también conocida como BST-2, se localiza en la membrana plasmática e inhibe la brotación de los viriones lentivirales al medio extracelular (Jouvenet *et al.*, 2009; Le Tortorec *et al.*, 2011). Para contrarrestar la acción de este factor de restricción celular, HIV-1 utiliza a la proteína viral Vpu (Neil *et al.*, 2008; Van Damme *et al.*, 2008) mientras que algunos aislamientos de SIV emplean a Nef (Jia *et al.*, 2009). Cabe destacar que tanto en HIV-2 como en ciertos aislamientos de SIV es la glicoproteína Env la que se opone a la acción de BST-2 (Gupta *et al.*, 2009; Le Tortorec & Neil, 2009). En el caso de FIV, se observó una potente inhibición de la brotación de las partículas virales en células felinas transfectadas con un ADN proviral defectivo en el gen *env*. Esto demostró que la glicoproteína Env de FIV contrarresta la restricción impuesta en células felinas por BST-2 (Celestino *et al.*, 2012).

7. Entrada viral

Como ya se mencionó, la entrada de FIV a sus células blanco requiere de la unión de la subunidad SU de la glicoproteína Env a CD134 y a CXCR4. Como consecuencia de esta interacción, se produce un cambio conformacional en la glicoproteína Env que permite que la TM medie la fusión de las membranas viral y celular (Affranchino & González, 2014).

Unión de FIV a la superficie celular

FIV es capaz de infectar a una gran variedad de tipos celulares, como linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B y macrófagos (Brown *et al.*, 1991; Dean *et al.*, 1999).

A diferencia de HIV y SIV, FIV no utiliza como receptor primario a CD4 sino que emplea a CD134, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (de Parseval *et al.*, 2004a; Shimojima *et al.*, 2004). Sin embargo, comparte con los aislamientos de HIV-1 con

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

tropismo por células T el uso de CXCR4 como correceptor, un receptor de quimioquinas presente en muchos tipos celulares (Poeschla & Looney, 1998; Willett *et al.*, 1997a, 1997b).

La mayoría de los aislamientos de FIV utilizan a CD134 como receptor y a CXCR4 como correceptor. Sin embargo, se ha sugerido que en estadios avanzados de la infección surgen variantes virales independientes del receptor primario las cuales son capaces de ingresar a las células blanco interactuando únicamente con CXCR4, una característica que amplía el tropismo celular (de Parseval *et al.*, 2004c; Willett & Hosie, 2008).

Cabe mencionar que al igual que HIV-1, FIV se une a la molécula de adhesión DC-SIGN que se encuentra presente en la superficie de las células dendríticas lo que permite que el virus sea transferido desde allí a los linfocitos T (Bobardt *et al.*, 2003; de Parseval *et al.*, 2004b).

Mecanismo de fusión de la membrana viral con la celular

El proceso de fusión de la membrana de los lentivirus con la membrana plasmática también ha sido principalmente estudiado en HIV-1.

En primer lugar, la interacción de la proteína SU de Env con el complejo receptor-correceptor celular produce cambios conformacionales en el ectodominio de la subunidad TM que causan que el péptido de fusión se inserte en la membrana plasmática de la célula blanco (Hunter, 1997). Simultáneamente, se exponen dos dominios que contienen repeticiones periódicas de leucinas e isoleucinas, denominados heptarepeticiones N-terminales (HRN) y heptarepeticiones C-terminales (HRC) (Hunter, 1997). A continuación, y como la glicoproteína Env se halla en forma trimérica en la membrana viral, trímeros de las HRN son rodeados en forma antiparalela por trímeros de las HRC generando una estructura que promueve el acercamiento de las membranas viral y celular (Chan & Kim, 1998; Lu *et al.*, 1995). Finalmente, la región carboxilo del ectodominio rica en residuos de triptofano favorecería la mezcla de las dos bicapas lipídicas (Salzwedel *et al.*, 1999; Suarez *et al.*, 2000).

Con respecto a FIV, se ha reportado que la mutación de la región rica en triptofanos del ectodominio de la TM inhibe la entrada viral (Giannecchini *et al.*, 2004) mientras que péptidos análogos a secuencias del ectodominio inhiben la actividad fusogénica de la proteína Env de FIV y, en consecuencia, la replicación viral (Medinas *et al.*, 2002).

8. Ensamblado

La proteína Gag de los lentivirus es transportada a la cara interna de la membrana plasmática de las células infectadas donde se ensambla en viriones que luego brotan al espacio extracelular (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008; Sundquist & Kräusslich, 2012). Como ya se ha mencionado, nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión de la proteína Gag de FIV en células de mamífero en ausencia de otras proteínas virales es suficiente para la producción de partículas extracelulares morfológicamente indistinguibles de los viriones inmaduros auténticos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(Manrique *et al.*, 2001). Además, nuestro grupo ha mostrado que la proteína Gag de FIV expresada en *Escherichia coli* y purificada por cromatografía de afinidad se ensambla *in vitro* en partículas esféricas las cuales son, sin embargo, de menor tamaño (33 nm) que los viriones auténticos (120 nm) (Affranchino & González, 2010). Nuestro grupo ha reportado estudios similares de ensamblado en cultivos celulares e *in vitro* de la poliproteína Gag de SIV (González *et al.*, 1993; González & Affranchino, 1998; Rauddi *et al.*, 2011). En su conjunto, estos resultados demuestran que la proteína Gag de los retrovirus posee toda la información necesaria para el ensamblado viral y la producción de partículas extracelulares.

MA

La MA es el dominio N-terminal de la poliproteína Gag, el cual es modificado por la adición de ácido mirístico en la glicina en posición 2 luego de la eliminación de la metionina iniciadora (Bryant & Ratner, 1990). La miristilación del dominio MA de Gag es necesaria para el ensamblado de HIV-1 (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008). Nuestro grupo ha demostrado, tanto para SIV como para FIV, que la sustitución de la glicina en posición 2 por alanina impide la miristilación de Gag y evita su asociación con la membrana plasmática, lo que resulta en la inhibición de la producción de partículas extracelulares (González *et al.*, 1993; Manrique *et al.*, 2001). Sin embargo, la miristilación de Gag es necesaria pero no suficiente para que esta poliproteína sea transportada a la superficie celular. Experimentos de nuestro laboratorio han mostrado que el transporte de la poliproteína Gag de SIV a la membrana requiere, además del ácido mirístico, de una región polibásica en el extremo amino de la MA y de la presencia de los residuos valina 7 y leucina 8 (González *et al.*, 1993; González & Affranchino, 1998). La región polibásica de la MA establecería interacciones de tipo electroestático con los fosfolípidos acídicos presentes en el lado interno de la membrana plasmática favoreciendo de este modo la asociación de Gag con dicha membrana (González & Affranchino, 1998).

Resulta interesante mencionar que en HIV-1 se ha sugerido que la unión de Gag a la membrana plasmática se halla regulada por un mecanismo por el cual la interacción de la región polibásica de la MA con los grupos de fosfatidilinositol-(4,5)- bifosfato (PI[4,5]P2) de la membrana plasmática promueve la exposición del ácido mirístico y su inserción en la membrana (Saad *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha propuesto que la región polibásica de la MA de HIV-1 se une a ARN lo que evita que Gag se asocie prematuramente a membranas intracelulares y que al alcanzar la membrana plasmática, el dominio MA que exhibe mayor afinidad por el PI[4,5]P2 que por el ARN, se una al fosfolípido y el ácido mirístico se inserte en la membrana estableciendo la asociación de Gag a la superficie celular (Chukkapalli *et al.*, 2010).

Además de mediar el transporte y la interacción de Gag con la membrana plasmática de la célula infectada, la MA cumple una función esencial en el ciclo de replicación viral. En efecto, investigaciones de nuestro grupo en SIV junto con las de otros investigadores en HIV-1 han

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

demostrado que la región amino de la MA media la incorporación de la glicoproteína Env a los viriones a través de una interacción con el dominio citoplasmático de Env (Celma *et al.*, 2001; Freed & Martin, 1996; González *et al.*, 1996; Manrique *et al.*, 2003, 2008; Murakami & Freed, 2000). De hecho nuestro laboratorio ha demostrado *in vitro* la interacción entre la MA y el dominio citoplasmático de la proteína Env de SIV (Manrique *et al.*, 2008). Para una revisión del tema se sugiere consultar Affranchino & González (2014).

Nuestro grupo ha estudiado la relación estructural y funcional entre los dominios MA de FIV y SIV mediante la construcción y caracterización fenotípica de virus quiméricos (Manrique *et al.*, 2004a). Resultó interesante observar que al reemplazar en la poliproteína Gag de SIV la MA de este virus por la región equivalente de FIV, el virus quimérico resultante (SIVFIVMA) es incapaz de formar partículas debido a un defecto en la interacción de Gag con la membrana plasmática. En cambio, el virus quimérico FIVSIVMA no sólo se ensambla eficientemente en viriones sino que se replica en células linfoideas felinas con una cinética similar a la de FIV salvaje (Manrique *et al.*, 2004a).

CA

La CA constituye el dominio central de la poliproteína Gag y cumple dos roles diferentes en la morfogénesis retroviral. Como dominio de Gag participa de las interacciones proteína-proteína que conducen al ensamblado de Gag en partículas, como ha demostrado nuestro grupo en SIV (Rauddi *et al.*, 2011) y otros investigadores en HIV-1 (Briggs *et al.*, 2009; von Schwedler *et al.*, 2003). En cambio, en el virión maduro, la CA forma una estructura con forma de cono (*core*) que protege a los componentes virales necesarios para el siguiente ciclo de replicación tales como el ARN genómico viral, la NC y las enzimas TR e IN (Forshey *et al.*, 2002).

Los dominios CA de las poliproteínas Gag de los retrovirus exhiben escasa homología a excepción de un motivo de 20 aminoácidos de longitud conocido como la “región de principal homología” (MHR) (Wills & Craven, 1991). Sin embargo, las CA retrovirales muestran una organización similar que consiste en la presencia de dos regiones ricas en α-hélices que se pliegan independientemente una de la otra: el dominio N-terminal (CA-NTD) y el dominio C-terminal (CA-CTD) (Sundquist & Kräusslich, 2012). Por otro lado, estudios de crioelectromicroscopía de viriones de HIV-1 y de cristalografía de rayos X de la CA de este virus muestran que en la partícula madura la CA se organiza en hexámeros del NTD unidos por dímeros del CTD (Pornillos *et al.*, 2009).

Nuestro grupo ha demostrado que el dominio CA de SIV juega un rol importante en la multimerización de Gag y, en consecuencia, en el ensamblado de las partículas virales (Rauddi *et al.*, 2011). Para ello, se emplearon dos estrategias. Por un lado, se realizaron ensayos *in vitro* de captura de proteínas para establecer la capacidad de diferentes subdominios de Gag de SIV, expresados en *E. coli*, de interactuar con Gag salvaje expresada como proteína de fusión con la glutatión S-33 transferasa de *Schistosoma japonicum* y acoplada a una resina de glutatión

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(Rauddi *et al.*, 2011). Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de rescate de subdominios de Gag en partículas extracelulares por interacción con Gag salvaje. Los resultados de estos ensayos sugieren que en SIV la región que comprende el CTD de la CA y el dominio NC constituye la principal región responsable de la multimerización de Gag (Rauddi *et al.*, 2011).

Recientemente, nuestro laboratorio construyó y caracterizó una serie de virus quiméricos en los que se reemplazó total o parcialmente la CA de la proteína Gag de SIV por regiones equivalentes de la CA de FIV (Esteva *et al.*, 2014). De los estudios realizados, cabe destacar que la construcción de SIV que lleva la CA y la región N- terminal de la NC de FIV produce viriones con un *core* estable, incorpora eficientemente a la glicoproteína Env y empaqueta niveles de ARN genómico y de TR similares a los encontrados en virus salvajes (Esteva *et al.*, 2014). Sin embargo, este virus quimérico no es infeccioso debido a un defecto en etapas tempranas de la replicación viral (Esteva *et al.*, 2014). En esta misma investigación se analizó el fenotipo de ensamblado de quimeras en las que se reemplazó el NTD o el CTD de la CA de SIV por los dominios correspondientes de la CA de FIV. Los virus quiméricos resultantes exhibieron fenotipos diferentes. En efecto, mientras que la presencia en Gag de SIV del NTD de la CA de FIV inhibe el ensamblado, la proteína Gag de SIV llevando el CTD de la CA de FIV es capaz de producir viriones extracelulares (Esteva *et al.*, 2014). Esto indica que el CTD de la CA exhibe mayor plasticidad funcional que el NTD.

Nuestro laboratorio ha demostrado que tanto la CA de SIV como la de FIV expresadas en *E. coli* forman *in vitro* multímeros de alto peso molecular (Esteva *et al.*, 2014; Rauddi *et al.*, 2011). En este sentido, se ha reportado recientemente que la CA de FIV se ensambla en estructuras esféricas que se visualizan al microscopio electrónico (Serrière *et al.*, 2013). Es más, el CTD de la CA de FIV dimeriza en solución y es capaz de formar estructuras de alto peso molecular, indicando que los dímeros del CTD constituirían uno de los intermediarios tempranos en el ensamblado de la CA para formar el *core* viral (Esteva *et al.*, 2014).

NC

Las proteínas NC de los lentivirus poseen un alto contenido de aminoácidos básicos y dos copias de un motivo llamado “dedo de zinc”, con la secuencia Cisteína- X2-Cisteína-X4-Histidina-X4-Cisteína (Jewell & Mansky, 2000). La principal función de la NC es mediar la asociación de Gag con el ARN genómico viral de manera que este último sea empaquetado en los viriones (Jewell & Mansky, 2000).

Nuestro grupo ha estudiado en detalle la NC de FIV, demostrando que el “dedo de zinc” proximal es funcionalmente más importante que el motivo distal (Manrique *et al.*, 2004b). Mediante ensayos de *Northwestern blot*, se mostró que la mutación de la primera cisteína del “dedo de zinc” N-terminal es suficiente para bloquear la unión del ARN genómico viral a la proteína NC (Manrique *et al.*, 2004b). El mismo resultado se obtuvo al cambiar el caracter básico de los aminoácidos que conectan a los dos “dedos de zinc” (Manrique *et al.*, 2004b). En cambio,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

la mutación del dedo de zinc C- terminal no afectó la capacidad de unión de la NC al ARN viral. Resultó interesante encontrar que las mutaciones que inhiben la interacción entre la NC y el ARN viral, interfieren también con el ensamblado de Gag en viriones (Manrique *et al.*, 2004b). Estos resultados sugieren que el ARN genómico viral cumple también un rol en el ensamblado ya que actuaría reclutando moléculas de Gag promoviendo así su multimerización.

p2

El procesamiento de Gag de FIV mediado por la PR viral genera un péptido C- terminal de 18 aminoácidos denominado p2 (Elder *et al.*, 1993). Nuestro laboratorio ha demostrado que p2 contiene los motivos aminoacídicos PSAP y LLDL, los cuales son esenciales para la producción de partículas extracelulares (Manrique *et al.*, 2004b). Teniendo en cuenta que la presencia del motivo PS/TAP en la proteína Gag es necesaria para la brotación de los viriones (Bieniasz, 2006), los resultados de nuestro grupo indican que el péptido p2 de FIV es funcionalmente equivalente al dominio C- terminal p6 de Gag de HIV-1 y SIV, el cual contiene también el motivo aminoacídico arriba mencionado (Manrique *et al.*, 2004b).

9. Brotación de los viriones

El mecanismo a través del cual los lentivirus brotan al medio extracelular ha sido estudiado con profundidad y revisado en HIV-1 (Bieniasz, 2006; Meng & Lever, 2013). Los lentivirus emplean componentes celulares del complejo ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) para liberar a la progenie viral a través de la membrana plasmática de la célula infectada. En primer lugar, el motivo aminoacídico PS/TAP presente en la porción carboxilo de Gag se asocia a la proteína TSG101, reclutando de esta forma al complejo ESCRT-I al sitio de brotación. Luego, el factor celular ALIX se une al motivo aminoacídico de Gag YP(X)nL (HIV-1 y virus de la anemia infecciosa equina) o a la NC (el resto de los lentivirus), lo que resulta en la asociación de Gag con el complejo ESCRT-III. Se ha sugerido que una ubiquitina ligasa similar a NEDD4 facilitaría la unión de Gag el complejo ESCRT-III. A continuación, el complejo ESCRT-III se activa y polimeriza formando una estructura que facilita el proceso de brotación de los viriones a través de un mecanismo que no se halla totalmente esclarecido. Una vez que las partículas, las partículas virales se escinden de la membrana, la proteína celular VPS4 desorganiza la estructura multimérica formada por ESCRT-III de manera de que sus componentes se reciclen.

Nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que el péptido p2 de la proteína Gag de FIV exhibe el motivo PSAP que interviene en el proceso de brotación viral (Manrique *et al.*, 2004b). Esto fue luego confirmado por otros (Luttge *et al.*, 2008). Resulta interesante destacar que HIV, además de poseer en p6 el motivo PT/SAP que une a TSG101, contiene también el motivo YP(X)nL el cual se asocia a la proteína ALIX (Strack *et al.*, 2003). El virus de la anemia

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

infecciosa equina también posee el dominio YP(X)nL (Strack *et al.*, 2003). El proceso de brotación de los lentivirus es un buen ejemplo de cómo estos virus aprovechan mecanismos celulares para su replicación.

10. Resumen de las funciones de las proteínas de FIV

La Tabla 1 enumera las proteínas de FIV e indica la función principal de cada una de ellas durante el ciclo de replicación viral.

Tabla 1. Resumen de las funciones de las proteínas de FIV.

Poliproteína precursora	Proteína funcional	Función principal
Gag	**MA**	Proteína estructural. Rol en el ensamblado viral
	CA	Proteína estructural. Rol en el ensamblado viral
	NC	Unión e incorporación del ARN genómico a la partícula viral. Rol en el ensamblado viral
Pol	**PR**	Clivaje de los precursores durante la maduración viral
	RT	Transcripción reversa del ARN genómico en el ADN proviral
	IN	Integración del ADN proviral en el cromosoma del hospedador
	DU	Inhibición de la incorporación de uracilo durante el proceso de transcripción reversa
Env	**SU**	Reconocimiento y unión al receptor celular
	TM	Media la entrada a la célula hospedadora. Promueve la fusión de membranas
Rev		Transporte de los ARN_m virales no procesados y monoprocesados al citoplasma celular
Vif		Contrarresta la acción de factores de restricción del hospedador
ORF-A		Roles en producción de partículas infectivas y diseminación viral

Objetivos

A pesar de la información disponible sobre las propiedades biológicas de los diferentes dominios de Gag de FIV, nuestro conocimiento del proceso de ensamblado de este virus es todavía limitado. En este sentido, las secuencias de la proteína Gag que participan en las interacciones homoméricas que conducen al ensamblado de los viriones no han sido aún identificadas.

Con el objeto de mapear los dominios de Gag cuya interacción promueve la multimerización de esta proteína y su ensamblado en viriones nos propusimos:

- Generar una serie de subdominios de la poliproteína Gag de FIV por mutagénesis dirigida.

- Estudiar en cultivos celulares la capacidad de cada subdominio de Gag de asociarse a Gag salvaje y ser reclutado en partículas extracelulares.

- Establecer a través de los experimentos mencionados en el punto anterior cuáles son los dominios de interacción Gag-Gag, contribuyendo a un mayor conocimiento del proceso de ensamblado de FIV.

- Comenzar con la identificación en la CA de los dominios esenciales para el ensamblado de las partículas de FIV.

- Estudiar si el dominio MA de Gag de FIV es capaz de unir ARN viral, estableciendo si contribuye a las interacciones Gag-ARN viral que parecen iniciar el proceso de multimerización y ensamblado de esta poliproteína.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Materiales y métodos

Células y virus

Las líneas celulares de riñón de mono verde africano COS-7 y de embrión de rata Rat-2, defectivas en timidina kinasa (empleadas para la selección de los recombinantes de vaccinia), fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, GIBCO) suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB, HyClone), aminoácidos no esenciales y solución de antibiótico-antimicótico conteniendo penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (250 ng/ml).

Las secuencias del gen *gag* de FIV utilizadas en este trabajo derivan del clon molecular FIV-14 del aislamiento Petaluma (número de acceso en GenBank M25381) (Olmsted *et al.*, 1989a). El virus vaccinia utilizado para generar los virus recombinantes fue el de la cepa parental WR (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, NIH). El virus recombinante de vaccinia vTF7-3 que expresa la ARN polimerasa del fago T7 fue cedido por el Dr. B. Moss (NIH).

1. Sueros y anticuerpos para la detección de proteínas de FIV

Para la detección de la proteína Gag de FIV, así como de los diferentes subdominios derivados de ella, se utilizó el anticuerpo monoclonal (MAb) PAK3-2C1 dirigido contra la CA de FIV (NIH *AIDS Reference and Reagent Program*). Para la detección de las proteínas MA y NC se emplearon sueros policlonales de ratón preparados en nuestro laboratorio utilizando la metodología que ya hemos descripto (Manrique *et al.*, 2008).

Como anticuerpo secundario para los ensayos de *Western blot* se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa (Promega).

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de las secuencias de ADN de FIV se utilizó la enzima Elongasa (*Elongase High Fidelity Enzyme Mix*, Invitrogen) la cual posee capacidad correctora (*proof-reading*). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 µl conteniendo 60 mM Tris-SO4 (pH 9,1 a 25 °C); 18 mM (NH4)2SO4; 1,6 mM MgSO4; 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP); 0,4 µM de los oligonucleótidos sentido y antisentido; 100 ng de templado y 2 µl de Elongasa.

Luego de una etapa inicial a 94 ºC durante 5 minutos, las mezclas de reacción fueron sometidas a treinta ciclos compuestos por una etapa de desnaturalización a 94 ºC durante 30 segundos, una de hibridación a 55 ºC durante 60 segundos y una de elongación a 68 ºC

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

durante 60 segundos por cada kilobase de producto a amplificar. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *MiniCycler* (MJ Research Inc.). Los productos de la amplificación se incubaron con proteinasa K (100 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C y luego, 15 minutos a 68 °C para la inactivación de esta proteasa. Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

3. Electroforesis de AND

Los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TBE (90 mM Tris-Borato [pH 8,3]; 2 mM EDTA). Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y las bandas de ADN se visualizaron por transiluminación con luz ultravioleta. Como marcadores de peso molecular se emplearon el *1 Kb ladder* (Invitrogen) y el *100 pb ladder* (Invitrogen).

4. Reacciones de ligación

Las ligaciones de los fragmentos de ADN a los vectores plasmídicos se realizaron en un volumen final de 10 µl conteniendo 0,5 unidades de la ADN ligasa del fago T4 (Invitrogen); 50 mM Tris-HCl (pH 7,6); 10 mM MgCl2; 1 mM ditiotreitol (DTT); 1 mM ATP; 5 % (p/v) polietilénglicol 8000; 20 ng de vector y 20-60 ng de inserto. Las reacciones se incubaron a 16 °C o 25 °C durante toda la noche.

5. Transformación de bacterias competentes

Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5α (F- Φ80*lac*ZΔM15 Δ[*lacZYA-arg*F] U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 [rk-, mk] *pho*A *sup*E44 λ *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1) (Invitrogen); *E. coli* Stbl2 (F *mcr*A Δ[*mcr*BC- *hsd*RMS-*mrr*] *rec*A1 *end*A1 *lon gyr*A96 *thi sup*E44 *rel*A1 λ- Δ[*lac-pro*AB]) (Invitrogen) o *E. coli* BL21 (DE3) (F- *dcm omp*T *hsd*S(rB- mB-) *gal* λ(DE3) (Stratagene). Las bacterias competentes fueron preparadas siguiendo el protocolo de Hanahan (1983), y se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización. La cepa Stbl2 de *E. coli* fue desarrollada para clonar insertos de ADN que exhiben una elevada inestabilidad tales como los genomas retrovirales (Trinh *et al.*, 1994).

Para su transformación con el ADN plasmídico, las bacterias competentes se descongelaron y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se agregaron 50 µl de las bacterias a las reacciones de ligación y las mezclas se incubaron por 30 minutos en hielo. Luego se realizó una incubación a 42 °C por 90 segundos y en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron a la mezcla 200 µl de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

incubó a 37 °C por 60 minutos (DH5α o BL21) o durante 90 minutos a 30 °C (Stbl2). Finalmente, para la selección de las bacterias recombinantes, las reacciones de transformación se plaquearon en LB conteniendo 1,5 % (p/v) agar y 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C (DH5α o BL21) o a 30 °C (Stbl2) durante toda la noche.

6. Purificación de ADN plasmídico

Para la identificación de los clones recombinantes, los plásmidos se purificaron a partir de cultivos bacterianos utilizando el método de lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981). Para ello, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 16.000 xg durante 2 minutos y las bacterias se resuspendieron en 100 µl de buffer TELT (50 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 62,5 mM EDTA; 0,4 % Tritón X-100; 2,5 M LiCl; 100 µg/ml lisozima). Los lisados bacterianos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se calentaron a 100 °C por 1 minuto para finalmente enfriarlos en hielo durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 16.000 xg durante 10 minutos y el ADN plasmídico presente en los sobrenadantes se precipitó agregando un volumen de isopropanol e incubando la muestra a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, el ADN plasmídico se sedimentó por centrifugación a 16.000 xg durante 20 minutos y se resuspendió en agua bidestilada.

Para los ensayos de transfección de líneas celulares, el ADN plasmídico se purificó utilizando el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN).

7. Construcciones plasmídicas que expresan subdominios de la poliproteína Gag de FIV

El gen *gag* de FIV, así como diferentes subdominios del mismo, se amplificaron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos conteniendo sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Tabla 2). Las secuencias del gen *gag* amplificadas se clonaron en el vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen) bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. Como templado para las reacciones de PCR se utilizó el plásmido pSV-FIV14, generado en nuestro laboratorio, que contiene el genoma de FIV clonado en el vector pSV-SPORT1 (Manrique *et al.*, 2004a; 2004b).

Para generar los subdominios de la poliproteína Gag de FIV truncados desde el extremo N-terminal, se emplearon oligonucleótidos sentido conteniendo el codón de iniciación de la traducción (ATG) ubicado inmediatamente antes de la región de *gag* a amplificar. En el caso de las construcciones truncadas desde el extremo C-terminal de Gag, el oligonucleótido antisentido utilizado en las reacciones de amplificación incluía un codón de terminación en el sitio donde se deseaba que terminara el subdominio. Para introducir en la proteína Gag de FIV la deleción interna que elimina los aminoácidos 367-413 se aplicó la siguiente estrategia. Primero, se amplificó por PCR la región de *gag* desde el codón de iniciación hasta el codón

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

correspondiente al aminoácido 366. Por otro lado, se obtuvo por PCR el fragmento del gen *gag* que codifica para la región carboxilo de la proteína (aminoácidos 414-450). Finalmente, los fragmentos de ADN 5' y 3' que flanquean la secuencia a delecionar se ligaron generando así una construcción que exhibe una deleción interna que afecta a los residuos 367-413 de la proteína Gag.

Los fragmentos del gen *gag* de FIV, generados por PCR, se digirieron con las enzimas de restricción *Nhe*I y *Bam*HI y se clonaron en el vector pcDNA3.1(+) digerido con las mismas enzimas. En el caso de las construcciones GagΔ1-40 y GagΔ1-40/Δ367-413 para las cuales se utilizaron oligonucleótidos iniciadores llevando ambos el sitio de reconocimiento para *Bam*HI, se verificó que la orientación del gen fuera la correcta mediante mapeo con enzimas de restricción.

Para expresar una versión no miristilada de Gag de FIV que exhibiera menor movilidad electroforética que Gag salvaje (Figura 5), se amplificó el gen *gag* y se clonó primero en los sitios *Eco*RV y *Sal*I del plásmido pET-30b(+) (Novagen) de manera de producir una proteína Gag de FIV con una etiqueta N-terminal de seis histidinas. Este clon de *gag* en pET se linealizó con *Nde*I, se trató con la T4 ADN polimerasa para generar extremos romos y luego se digirió con *Sal*I. El fragmento liberado así del vector pET se clonó en los sitios *Nhe*I (extremo convertido a romo) y *Xho*I (compatible con *Sal*I) del vector pcDNA3.1(+). La construcción resultante, denominada pcDNA- HisFIV*gag*, dirige la expresión de una versión no miristilada de Gag de FIV con una extensión N-terminal de 45 aminoácidos que incluye a la etiqueta de 6 histidinas.

Todas las construcciones descriptas en esta sección fueron secuenciadas utilizando el servicio de secuenciación que ofrece la empresa Macrogen Inc. (Corea).

Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR las regiones del gen *gag* de FIV.

	Secuencia	Posición nucleotídica en el genoma de FIV	Polipéptido codificado por la construcción resultante
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	Gag_{1-450}
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	Gag_{1-432}
Antisentido	5' TACGGATCCTTACATTTGATTCACTGG 3'	1923 – 1909	
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	Gag_{1-413}
Antisentido	5' GAAGGATCCTAATTTCCTTGCCAACA 3'	1866 – 1852	

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

	Fragmento 5'		
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-TTGAACTTTTGTAAGAGCTTC 3'	1725 – 1705	**$Gag_{\Delta 367\text{-}413}$**
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-AGAAAGAATTCGGGAAACTGG 3'	1867 – 1887	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	**$Gag_{1\text{-}366}$**
Antisentido	5' TGAGGATCCTTATTGAACTTTTGTAAG 3'	1725 – 1711	
Sentido	5' GCCGGATCCATGGCTAATGTATCTACA 3'	748 – 765	**$Gag_{\Delta 1\text{-}40}$**
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' GCCGGATCCATGGCTAATGTATCTACA 3'	748 – 765	**$Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$***
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' CAGGCTAGCATGCCTATTCAAACAGTA 3'	1033 – 1047	**$Gag_{136\text{-}450}$**
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' TACGCTAGCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	**$Gag_{1\text{-}135}$**
Antisentido	5' TGTGGATCCTTAATATGCCTGTGGAGG 3'	1032 – 1018	
Sentido	5' CAGGCTAGCATGCCTATTCAAACAGTA 3'	1033 – 1047	**$Gag_{136\text{-}366}$**
Antisentido	5' TGAGGATCCTTATTGAACTTTTGTAAG 3'	1725 – 1711	
Sentido	5' AAAGCTAGCATGGTAGTGCAATCAAAA 3'	1726 – 1740	**$Gag_{367\text{-}450}$**
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	

Se indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para generar las construcciones del gen *gag* de FIV. **P** indica los grupos fosfato presentes en los extremos 5' de los oligonucleótidos utilizados para generar las construcciones codificando $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ y $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$. Se resaltan las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Nhe*I y *Bam*HI utilizadas para clonar los fragmentos de ADN amplificados en el vector pcDNA3.1(+). El molde utilizado para las reacciones de PCR fue el genoma de FIV-14. En asterisco indica que para la construcción $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ se usó como templado $gag_{\Delta 367\text{-}413}$.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

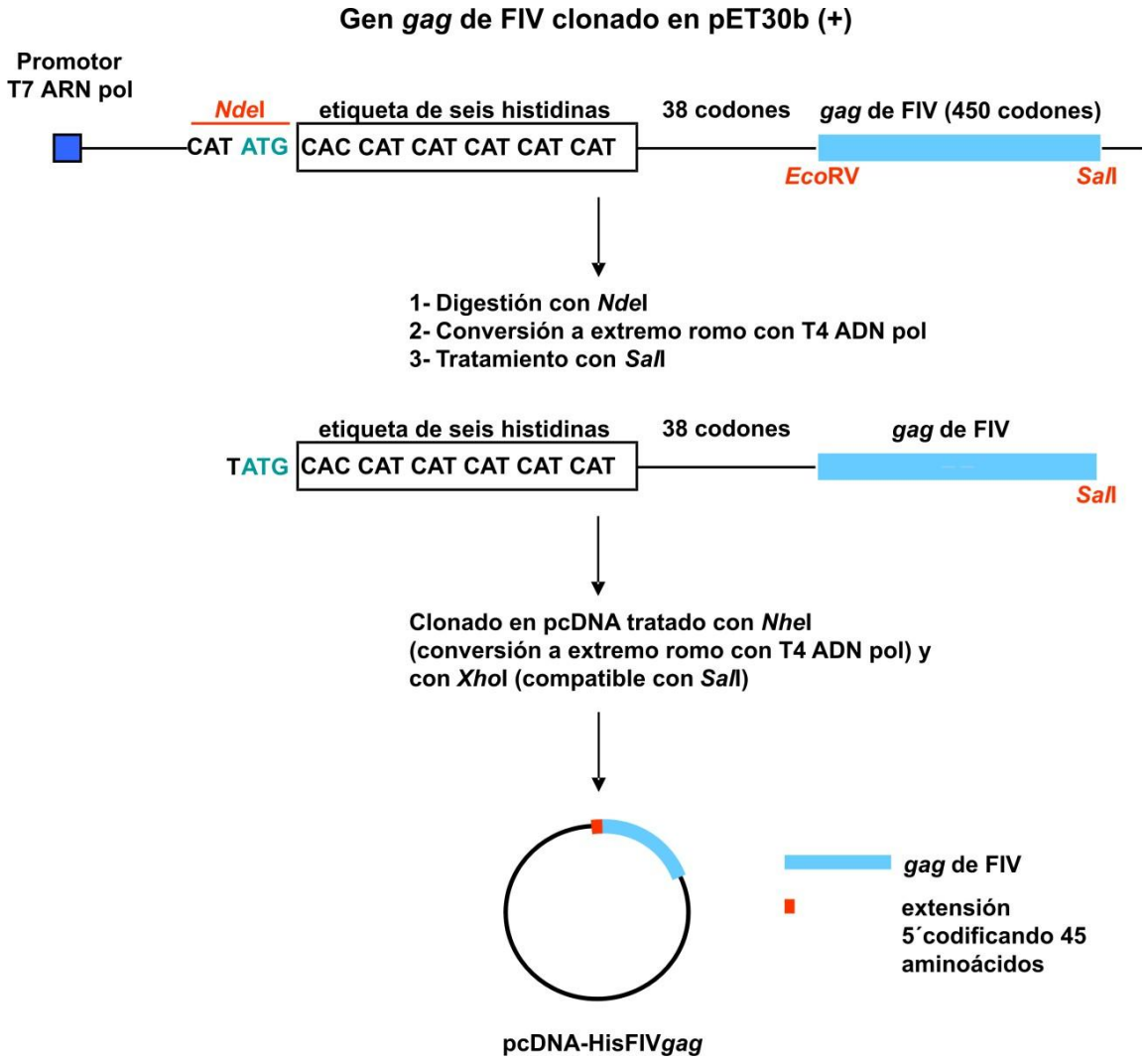


Figura 5. Estrategia para expresar la proteína Gag de FIV con una extensión de 45 aminoácidos en su extremo N-terminal.

8. Construcción de recombinantes del virus vaccinia

La generación de un recombinante de vaccinia que expresa la poliproteína Gag salvaje de FIV ya ha sido descripta por nuestro grupo (Manrique *et al.*, 2001).

La construcción del mutante no miristilado de Gag de FIV (Mir- Gag) ha sido reportada previamente por nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2001). Este recombinante de vaccinia expresa una proteína Gag de FIV en la cual se reemplazó la glicina en posición 2 por un residuo de alanina, inhibiendo de esta forma la miristilación de esta proteína.

Para introducir seis deleciones internas en el marco abierto de lectura del gen *gag* de FIV que codifica para el dominio CA, utilizamos una estrategia mediante la cual amplificamos por PCR dos fragmentos utilizando el clon de *gag* en pcDNA como templado y los oligonucleótidos descriptos en la Tabla 3. Para cada construcción, uno de los fragmentos amplificados se extiende desde el codón de iniciación de *gag* hasta el correspondiente al aminoácido localizado inmediatamente antes del comienzo de la deleción. El segundo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

fragmento de *gag* amplificado corresponde a la región que comienza en el primer codón luego del extremo 3' de la deleción y termina en el codón de terminación del gen *gag.* Los fragmentos 5' y 3' de ADN amplificados se ligaron aprovechando que el oligonucleótido antisentido utilizado en la amplificación de la secuencia 5', así como el oligonucleótido sentido empleado para amplificar la secuencia 3', se hallaban fosforilados.

Las construcciones de *gag* de FIV con deleciones internas en la región que codifica para la CA se clonaron en el vector de transferencia pMJ601 (Figura 6; Davison & Moss, 1990) digerido con *Sal*I y *Bam*HI. La obtención, selección y purificación de los recombinantes del virus vaccinia se realizó como ya hemos descripto (González *et al.*, 1993). Brevemente, células COS-7 crecidas en botellas de 25 cm^2 de superficie fueron infectadas con el virus vaccinia parental (WR) a una multiplicidad de 0,05 durante 2 horas. Luego, el inóculo fue eliminado y la monocapa se lavó dos veces con D-MEM. Posteriormente, las células fueron transfectadas con 5 µg de las distintas construcciones en pMJ601 utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). A las células infectadas/transfectadas, luego de ser incubadas durante 5 horas a 37 °C en atmósfera conteniendo 5 % de CO_2, se les reemplazó el medio de transfección por D-MEM-6 % SFB. Pasadas 48 horas, las células se lisaron sometiéndolas a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. Estos lisados fueron utilizados como stocks virales para la selección de los virus recombinantes.

La progenie viral resultante de la infección/transfección fue seleccionada en células Rat-2 (deficientes en actividad de timidina kinasa; TK^-) en presencia de 5- bromo-desoxiuridina y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido) como sustrato cromogénico de la enzima β-galactosidasa. Durante la infección/transfección de las células COS-7 se produce la recombinación homóloga entre la secuencia de la TK presente en el virus vaccinia WR y la secuencias TK que flanquean al gen *gag* en el vector pMJ601. Los virus resultantes de la recombinación exhiben un fenotipo TK^- y pueden ser seleccionados en células Rat-2 por resistencia a 5-bromo-desoxiuridina, el cual es un agente antiviral que debe ser fosforilado por la TK para ser activo. Por otro lado, los virus recombinantes de vaccinia expresan la β-galactosidasa (Figura 6) lo que permite la visualización directa de las placas de lisis que éstos causan por tinción con X-Gal. Las células Rat-2 fueron infectadas con distintas diluciones de los stocks de los virus vaccinia recombinantes. Una hora postinfección se retiró el inóculo y se agregó una capa 1 % (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión preparada en D-MEM conteniendo 2 % SFB y 25 µg/ml de 5-bromo-desoxiuridina. A las 48 horas, se agregó una segunda capa de agarosa con 300 µg/ml de X-Gal. Al cabo de 16 horas, los virus recombinantes fueron seleccionados por su capacidad de formar placas de lisis azules. Las placas de lisis de los virus recombinantes se recogieron en 1 ml de D- MEM y fueron sometidas a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los virus recombinantes de vaccinia obtenidos en cada caso fueron sometidos a dos ciclos adicionales de selección en células Rat-2 en presencia de 25 µg/ml de 5-bromo- desoxiuridina. Para cada uno de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mutantes de deleción de Gag se analizaron varios virus vaccinia recombinantes independientes con el objeto de asegurar que las proteínas Gag expresadas por estos virus exhibieran el mismo fenotipo.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para los generar mutantes de la proteína Gag de FIV llevando deleciones internas en su dominio CA.

	Secuencia	Posición nucleotídica en el genoma de FIV	Polipéptido codificado por cada construcción
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	**Gag Salvaje**
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
Sentido	5' TACGTCGACATGGCGAATGGAC 3'	628 – 640	**Mir- Gag**
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
	Fragmento 5'		**GagΔC1**
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-GTCAAGTGCTACATATTGTGG 3'	1077 – 1057	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-CAACTATGGTTTACTGCCTTC 3'	1138 – 1158	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
	Fragmento 5'		**GagΔC2**
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-TTTATCTGCAGCGCACCCTGG 3'	1227 – 1207	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-GATGCTCCCAGACCATTACCC 3'	1288 – 1308	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
	Fragmento 5'		**GagΔC3**
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-TGGTGCAAATCTTGCTTCTGC 3'	1380 – 1360	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-GCTAAGTCTCCTCGAGCTGTG 3'	1441 – 1461	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
	Fragmento 5'		**GagΔMHR**
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-CTGCACAGCTCGAGGAGACTT 3'	1464 – 1444	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-GATCAAGAACAAAATACAGCT 3'	1525 – 1545	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	
	Fragmento 5'		**GagΔC4**
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	
Antisentido	5' **P**-ATTTTGTTCTTGATCTATTTGGGC 3'	1539 – 1516	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-TGTAAAAAGGCAATGAGCCAC 3'	1600 – 1620	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para generar los mutantes de la proteína Gag de FIV llevando deleciones internas en su dominio CA (Continuación).

	Fragmento 5'		
Sentido	5' TACGTCGACATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	**GagΔC5**
Antisentido	5' **P**-ACAGTCTGCATTAGCATTAGC 3'	1602 – 1582	
	Fragmento 3'		
Sentido	5' **P**-CAAGAAATAGCCTCACCAGGA 3'	1663 – 1683	
Antisentido	5' TATGGATCCTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	

P indica que el oligonucleótido se halla fosforilado en su extremo 5'. Se resaltan los sitios de restricción *Sal*I y *Bam*HI empleados para clonar el producto de la ligación de los fragmentos 5' y 3' en el vector pMJ601. Se indica el nucleótido de citidina (C) en posición 2 que causa la mutación de la glicina en posición 2 de Gag por alanina (mutación G2A) para generar la proteína Mir- Gag.

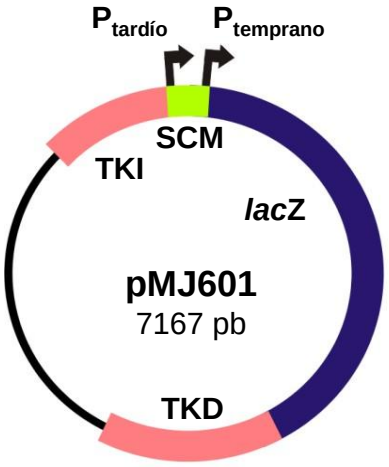


Figura 6. Esquema del vector de transferencia de vaccinia pMJ601. Las regiones flanqueantes del gen de la timidina kinasa TK izquierda (TKI) y TK derecha (TKD) promueven la recombinación homóloga del vector con el genoma del virus vaccinia salvaje permitiendo de esta forma la inserción de genes heterólogos que se expresan bajo el control de un promotor sintético tardío ($P_{tardío}$). Se indica el sitio de clonado múltiple (SCM) donde se clona el gen de interés y también el marco abierto de lectura que codifica para la β-galactosidasa (*lac*Z) bajo el control de un promotor sintético temprano ($P_{temprano}$).

9. Expresión de subdominios de Gag de FIV en células de mamífero

La expresión del gen *gag* salvaje y de los subdominios del mismo, clonados en pcDNA bajo el control del promotor T7, se llevó a cabo utilizando el sistema de expresión del virus vaccinia que expresa la ARN polimerasa del fago T7 (Fuerst *et al.*, 1986). Para ello, monocapas confluentes de células COS-7 (en placas de 35 mm de diámetro) fueron infectadas con el virus vaccinia recombinante vTF7-3 a una multiplicidad de infección de 10 durante 1 hora a 37 °C como hemos descripto previamente (Rauddi *et al.*, 2011). Luego de lavar las células dos veces con D-MEM se transfectaron con las construcciones plasmídicas

que dirigen la expresión de *gag* salvaje o de cada uno de sus subdominios. Además, se realizaron experimentos de cotransfección para analizar la expresión simultánea de Gag y de sus subdominios. A las 30 horas postinfección se prepararon lisados de las células transfectadas y se purificaron las partículas pseudovirales extracelulares (VLPs) como se describe en los puntos 12 y 13 de esta sección.

10. Expresión en células de mamífero de las proteínas Gag de FIV con deleciones internas en el dominio CA

Se infectaron monocapas confluentes de células COS-7 con los virus vaccinia recombinantes a una multiplicidad de infección de 5, como ha descripto nuestro grupo previamente (Manrique *et al.*, 2001). A las 24 horas postinfección, se prepararon lisados celulares y se purificaron las VLPs.

11. Preparación de lisados celulares

Monocapas de células COS-7 que expresan Gag salvaje, subdominios de Gag o mutantes de la CA se lavaron dos veces con solución salina de buffer fosfato (PBS) frío y se lisaron por incubación en una solución conteniendo 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 metil-fenil-sulfonilo y 10 µg/ml de aprotinina durante 20 minutos a 4 °C. Los lisados se clarificaron por centrifugación a 16.000 xg por 5 minutos y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

12. Purificación de VLPs

Los medios de cultivo de las células que expresan los diferentes subdominios de Gag y de aquellas infectadas con los recombinantes de vaccinia se clarificaron por filtración a través de membranas de 0,45 µm de poro. A partir de los sobrenadantes clarificados se purificaron las VLPs mediante ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa 20 % (p/v) en PBS como ya hemos descripto (Manrique *et al.*, 2001, 2004b). Las VLPs purificadas se resuspendieron en buffer de muestra Laemmli (Laemmli, 1970) y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

13. Electroforesis de proteínas

La expresión de las proteínas virales se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). La

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

composición del gel concentrador (*stacking*) fue una solución 3,9 % de acrilamida/bisacrilamida en relación 37,5:1; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) y 0,1 % (p/v) de SDS mientras que el gel separador (*resolving*) consistió en una solución 10 % acrilamida/bisacrilamida (37,5:1); 375 mM Tris-HCl (pH 8,8) y 0,1 % (p/v) SDS. Como buffer de siembra se utilizó una solución de 62 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2 % (p/v) SDS; 50 mM DTT; 10 % (v/v) glicerol; 0,01 % (p/v) azul de bromofenol. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante utilizando un buffer de composición 25 mM Tris base (pH 8,3), 250 mM glicina y 0,1 % (p/v) SDS. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Life Sciences) y el *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

14. Ensayos de *Western blot*

Las proteínas Gag salvaje y mutantes resueltas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (*HyBond ECL*; GE Life Sciences) a 15 V durante 1 hora utilizando el equipo *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc). Para la electrotransferencia se utilizó un buffer conteniendo 25 mM Tris base; 192 mM glicina; 20 % (v/v) metanol. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante toda la noche a 4 °C con PBS-0,1 % Tween 20 (PBST) conteniendo 5 % (p/v) de seroalbumina bovina (BSA). Al día siguiente, las membranas se lavaron con PBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en PBST-3 % BSA. Luego de dos lavados breves con PBST, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:1000–1:5000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a peroxidasa (Promega) en PBST-3 % BSA. Las membranas se lavaron con PBST y se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia *Western Lightning ECL Pro* (PerkinElmer). La detección se llevó a cabo mediante la exposición de las membranas a películas *Hyperfilm ECL* (GE Life Sciences). La cuantificación de las señales obtenidas se realizó como ya hemos descripto (Manrique *et al.*, 2008).

15. Rescate de los subdominios de Gag en partículas pseudovirales por asociación con Gag salvaje

La coexpresión en células de mamífero de Gag salvaje de FIV con cada uno de los subdominios de esta proteína se llevó a cabo utilizando el sistema del virus vaccinia T7 como se describe en el punto 10 de Materiales y Métodos. Células COS-7 infectadas con el vaccinia vTF7-3 se cotransfectaron con el plásmido que dirige la síntesis de Gag salvaje y con cada una de las diferentes construcciones que expresan los subdominios de Gag. En paralelo, se analizaron células expresando solamente Gag salvaje o cada uno de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

subdominios de Gag.

Como se esquematiza en la Figura 7, luego de la coexpresión de Gag salvaje con sus diferentes subdominios, las proteínas presentes en los lisados celulares y en las VLPs se resolvieron por SDS-PAGE y se sometieron a *Western blot*. La proporción en VLPs de cada subdominio de Gag respecto de la masa proteica total (Gag salvaje + subdominio de Gag) se determinó cuantificando las señales obtenidas por *Western blot*.

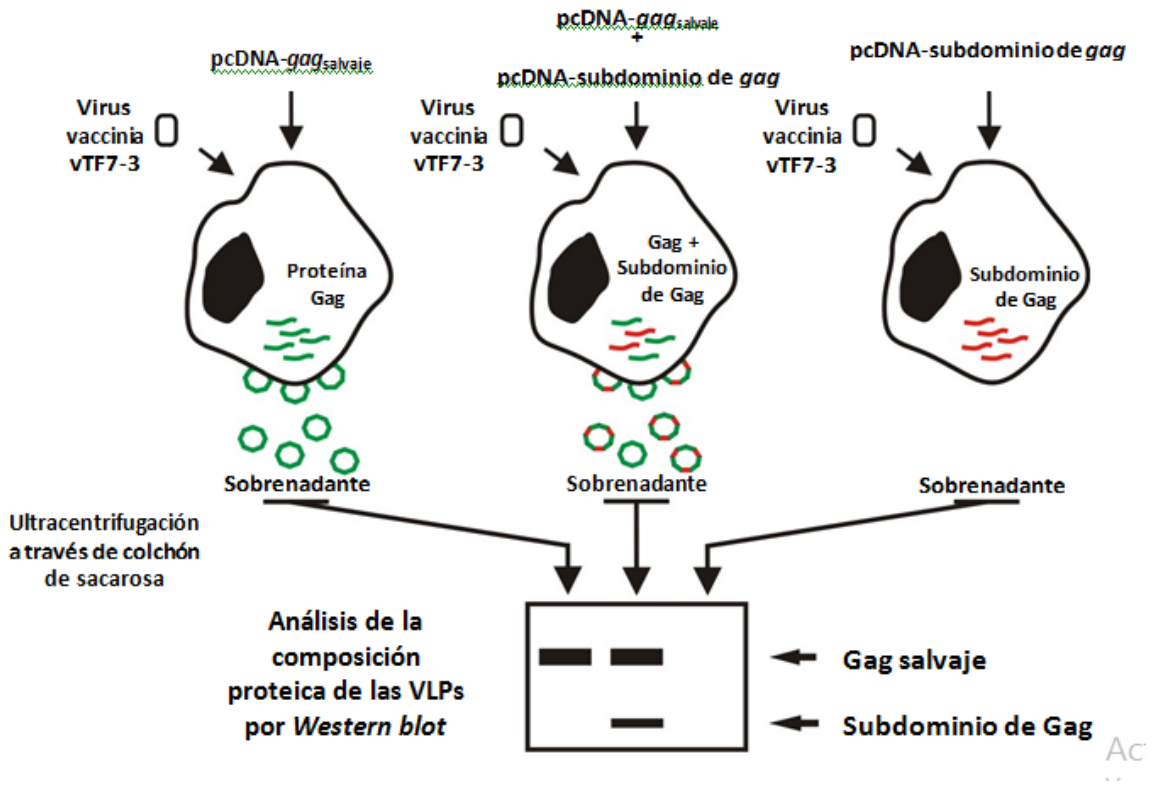


Figura 7. Esquema del ensayo de rescate de subdominios de Gag en VLPs por interacción con Gag salvaje. Células COS-7 infectadas con el virus vaccinia recombinante vTF7-3 se transfectaron con plásmidos que expresan Gag salvaje o cada uno de los subdominios de Gag. En paralelo, se cotransfectaron con Gag salvaje cada uno de los subdominios de Gag. Treinta horas postinfección, se purificaron las VLPs y se analizó por *Western blot* la composición proteica de las partículas.

16. Expresión en *E. coli* y purificación de los dominios de la poliproteína Gag de FIV

Las regiones que codifican para la MA y para una versión de esta proteína con una deleción de sus 40 aminoácidos N-terminales ($MA_{\Delta 1-40}$) se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4 y se clonaron en los sitios *Bam*HI y *Sma*I del vector pGEX-2T (GE Life Sciences). Estas construcciones permiten la expresión de la MA y de la $MA_{\Delta 1-40}$ como proteínas de fusión con la glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST). La GST-NC de FIV ya había sido expresada previamente por nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2004b). Bacterias

E. coli BL21 fueron transformadas con las construcciones pGEX-NC, pGEX-MA, pGEX-$MA_{\Delta 1-40}$ y pGEX-2T sin inserto. Para la expresión de las proteínas recombinantes, cultivos de *E. coli* crecidos durante 16 horas a 37 ºC, se diluyeron 1/30 con medio fresco y luego de 2 horas de incubación con agitación a 37 °C, se indujo la expresión de las proteínas de fusión agregando 1 mM isopropil-β-D-1- tiogalactopiranósido (IPTG). A las 5 horas postinducción, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5.000 xg y se resuspendieron en PBS conteniendo DNasa I (50 µg/ml, Promega) y lisozima (100 µg/ml). Luego de incubar durante 10 minutos a 4 °C, las bacterias se lisaron por sonicación en hielo aplicando 12 ciclos de 10 segundos cada uno y, luego de eliminar la fracción insoluble por centrifugación a 16.000 xg durante 20 minutos, se recogieron los sobrenadantes conteniendo las proteínas recombinantes.

Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR los genes que codifican para las proteínas MA, $MA_{\Delta 1-40}$ y NC de FIV.

	Secuencia	Posición nucleotídica en el genoma de FIV	Proteína expresada en *E. coli*
Sentido	5' TACGGATCCATGGGGAATGGAC 3'	628 – 640	**GST-MA**
Antisentido	5' TGTCCCGGGTTAATATGCCTGTGGAGG 3'	1032 – 1018	
Sentido	5' GCCGGATCCATGGCTAATGTATCTACA 3'	748 – 765	**GST-$MA_{\Delta 1-40}$**
Antisentido	5' TGTCCCGGGTTAATATGCCTGTGGAGG 3'	1032 – 1018	
Sentido	5' AAAGGATCCATGGTAGTGCAATCAAAA 3'	1726 – 1740	**GST-NC**
Antisentido	5' TATCCCGGGTTATAAATCCAATAGTTTC 3'	1980 – 1962	

Se indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los dominios de *gag* de FIV que fueron luego clonados en el vector pGEX-2T. Se indican los sitios *Bam*HI y *Sma*I utilizados para el clonado.

Para la purificación de las proteínas GST, GST-MA, GST-$MA_{\Delta 1-40}$ y GST-NC, se incubaron los lisados bacterianos obtenidos por sonicación con 0,5 % de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) durante 30 minutos a 4 °C. Luego de centrifugar las muestras 20 minutos a 16.000 xg, los sobrenadantes se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con una suspensión 50 % (v/v en PBS) de la resina

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de glutatión-Sepharosa 4B (GE Life Sciences). A continuación, se lavó la resina tres veces utilizando 10 volúmenes de PBS, respecto del volumen original de resina utilizado. Finalmente, la resina conteniendo las proteínas recombinantes se resuspendió en buffer Laemmli de siembra y se analizó la expresión de las proteínas de fusión por SDS-PAGE. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos durante 60 minutos con una solución conteniendo 10 % (p/v) (NH4)2SO4; 3 % (v/v) de H3PO4; 0,1 % (p/v) azul brillante de Coomassie G 250 y 20 % (v/v) de etanol absoluto.

17. Transcripción *in vitro* de ARN biotinilado

Para la transcripción *in vitro* de la región del ARN de FIV que contiene la señal de empaquetamiento del genoma viral (Kemler *et al.*, 2002), se utilizó una construcción creada previamente por nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2004b). Brevemente, se amplificó por PCR el fragmento correspondiente a los nt 216-947 del genoma de FIV y se lo clonó en los sitios *Apa*I y *Sal*I del vector pGEM-5Zf (Promega) (Manrique *et al.*, 2004b). Este fragmento del genoma de FIV comprende las regiones R y U5 de la LTR 5' junto con los primeros 320 nt del gen *gag* (Manrique *et al.*, 2004b). El plásmido se linealizó por digestión con *Sal*I y se utilizó como molde para la síntesis *in vitro* del ARN viral biotinilado. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl utilizando 20 U de la ARN polimerasa del fago T7 (Promega); 1 µg del plásmido linealizado; 40 mM Tris-HCl (pH 7,9); 6 mM MgCl2; 2 mM espermidina; 10 mM NaCl; 10 mM DTT; 40 U RNasin (inhibidor de ribonucleasas; Promega); 0,5 mM de ATP, GTP y CTP; 0,3 mM de UTP y 0,2 mM de UTP-11-Biotina (PerkinElmer). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C y luego, para eliminar el molde de ADN, se trató con 1 U de DNasa I libre de RNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C. La mezcla de reacción se extrajo dos veces con fenol/cloroformo y luego el ARN sintetizado se precipitó con etanol absoluto. Finalmente, el ARN viral biotinilado se sedimentó por centrifugación a 16.000 xg durante 20 minutos, se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada y se conservó a -80 ºC hasta su utilización.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

18. Ensayo de *Northwestern blot*

Las proteínas GST, GST-MA, GST-$MA_{\Delta 1-40}$ y GST-NC se resolvieron por SDS- PAGE y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron en buffer de *Northwestern blot* (NW) conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tritón X-100; 0,02 % (p/v) BSA; 0,02 % (p/v) Ficoll 400 y 0,02 % (p/v) polivinilpirrolidona durante toda la noche a 4 ºC para renaturalizar *in situ* las proteínas. Al día siguiente, se prolongó la incubación en buffer NW fresco a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de dos lavados con buffer NW, se agregó a la membrana 1 µl de la sonda de ARN biotinilado en el mismo buffer y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos con buffer NW y se incubó la membrana durante 30 minutos con una dilución 1:10.000 en buffer NW de un stock 1 mg/ml de estreptavidina conjugada a peroxidasa (US Biological). Posteriormente, se realizó un lavado con buffer NW durante 15 minutos más otros 4 lavados de 5 minutos cada uno. Finalmente, se desarrolló la reacción de quimioluminiscencia y se visualizó la unión de la sonda de ARN biotinilada a las proteínas recombinantes por exposición a películas radiográficas *Hyperfilm ECL* (GE Life Sciences). En paralelo, cantidades equivalentes de las proteínas GST, GST-MA, GST-$MA_{\Delta 1-40}$ y GST-NC se resolvieron por SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con azul de coomasie coloidal como se describe en el punto 17 de esta sección.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Resultados

1. Construcción de subdominios de la proteína Gag de FIV

Con el propósito de mapear los dominios en la poliproteína Gag que promueven su multimerización y ensamblado en partículas, generamos un panel de mutantes del gen *gag* de FIV codificando para: (i) proteínas Gag truncadas desde su extremo amino o carboxilo; (ii) dos mutantes de Gag en los cuales las regiones amino y central del dominio NC se delecionaron solas o en combinación con la eliminación de los primeros 40 aminoácidos de Gag; (iii) las proteínas maduras derivadas de Gag: MA, CA y NC (Figura 8).

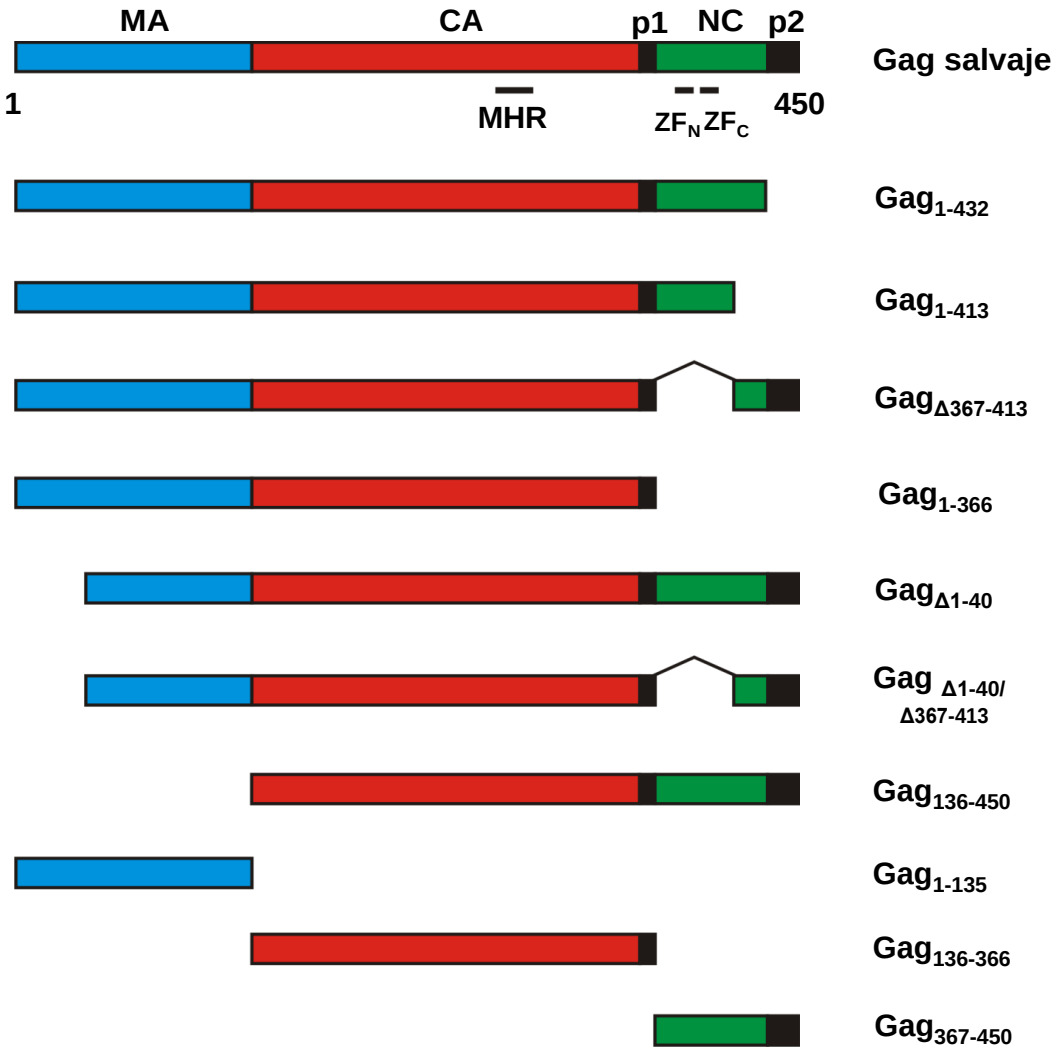


Figura 8. Construcción de los subdominios de Gag de FIV. El diagrama muestra los diferentes dominios de la poliproteína Gag de FIV y los mutantes de Gag que fueron estudiados. Se indican la región de principal homología (MHR) en la CA y los motivos dedos de zinc N-terminal (ZF_N) y C-terminal (ZF_C) en la NC. La denominación de los mutantes indica las posiciones aminoacídicas que abarca cada subdominio considerando a la metionina iniciadora de la poliproteína Gag como aminoácido 1.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2. Capacidad de los subdominios de Gag de FIV de interactuar *in vivo* con Gag salvaje

En primer lugar, se comparó la capacidad de los diferentes subdominios de Gag de FIV de asociarse con Gag salvaje y ser rescatados en VLPs extracelulares. Nuestro laboratorio ha utilizado previamente esta estrategia para estudiar si proteínas Gag quiméricas SIV-FIV o subdominios de Gag de SIV eran capaces de establecer interacciones moleculares con Gag salvaje (Manrique *et al.*, 2004a; Rauddi *et al.*, 2011). Cabe destacar que la multimerización de la proteína Gag comienza previamente a su transporte a la membrana plasmática (Lee & Yu, 1998; Manrique *et al.*, 2004a; Ono *et al.*, 2000).

Como se describe en Materiales y Métodos, células COS-7 infectadas con el virus vaccinia recombinante que expresa la ARN polimerasa del fago T7 se cotransfectaron con plásmidos que dirigen la expresión de Gag salvaje de FIV y de cada uno de los subdominios de esta proteína. En paralelo, se analizaron células expresando solamente Gag salvaje o cada uno de los dominios de Gag. Tanto los lisados celulares como las VLPs purificadas del medio de cultivo clarificado se resolvieron por SDS-PAGE y fueron sometidas a *Western blotting* utilizando el MAb dirigido contra el dominio CA de FIV.

Como muestra la Figura 9 A, la deleción del péptido p2 y de los 19 residuos C-terminales de la NC (Gag_{1-413}) no evita que este subdominio se asocie a Gag salvaje y sea rescatado en VLPs. Resultados similares se obtuvieron al analizar el fenotipo de interacción con Gag salvaje del mutante que carece de las regiones N-terminal y central de la NC ($Gag_{\Delta 367-413}$), así como de la proteína $Gag_{136-450}$, que comprende a los dominios CA y NC de Gag (Figura 9 B y D). En cambio, al analizar las VLPs purificadas de la coexpresión de Gag salvaje con Gag_{1-366} se detectaron bajos niveles de esta proteína truncada formada por la MA y la CA (Figura 9 C).

La cuantificación en las VLPs de los niveles relativos de Gag salvaje y de los mutantes de deleción de esta proteína reveló que los subdominios Gag_{1-413} y $Gag_{\Delta 367-413}$ representaban el 38 % y 35 %, respectivamente, de la cantidad total de proteína, mientras que el mutante comprendido por los dominios MA y CA (Gag_{1-366}) contribuyó solamente con un 20 % a la masa total de proteína en partículas (Figura 11). Resulta interesante destacar que la región CA-NC de Gag de FIV ($Gag_{136-450}$) representa el 47% de la composición proteica de las VLPs (Figura 10).

Es necesario mencionar que ninguno de los subdominios de Gag estudiados es capaz de ensamblarse en VLPs extracelulares. Los mutantes Gag_{1-413} y Gag_{1-366} carecen del péptido C-terminal p2 que contiene el motivo de brotación PSAP (Manrique *et al.*, 2004b), mientras que la deleción de la MA en el mutante $Gag_{136-450}$ elimina el grupo miristato y la región polibásica N-terminal que, como ha demostrado nuestro laboratorio, median la interacción de Gag con la membrana plasmática (Manrique *et al.*, 2001). Llamativamente,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cuando analizamos la fracción particulada del sobrenadante de células que expresan el subdominio $Gag_{\Delta 367-413}$, siempre detectamos trazas de esta proteína mutante (Figura 9 B). Este resultado sugiere que $Gag_{\Delta 367-413}$ podría conservar cierta capacidad de formar VLPs. De hecho, este subdominio contiene los dominios MA y p2 responsables de la asociación con la membrana y de la brotación de las partículas, respectivamente (Manrique *et al.*, 2001; Manrique *et al.*, 2004b), pero carece de la región de la NC responsable del empaquetamiento del ARN viral (Manrique *et al.*, 2004b). Se podría entonces especular que mientras que $Gag_{\Delta 367-413}$ es capaz de asociarse a la membrana plasmática y brotar al medio extracelular, es incapaz de interactuar con el ARN, lo que impediría que este mutante de Gag se ensamble eficientemente en partículas. Este tema fue estudiado con mayor profundidad al analizar el fenotipo de otro mutante, $Gag_{\Delta 1-40/\Delta 367-413}$ (ver más adelante).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

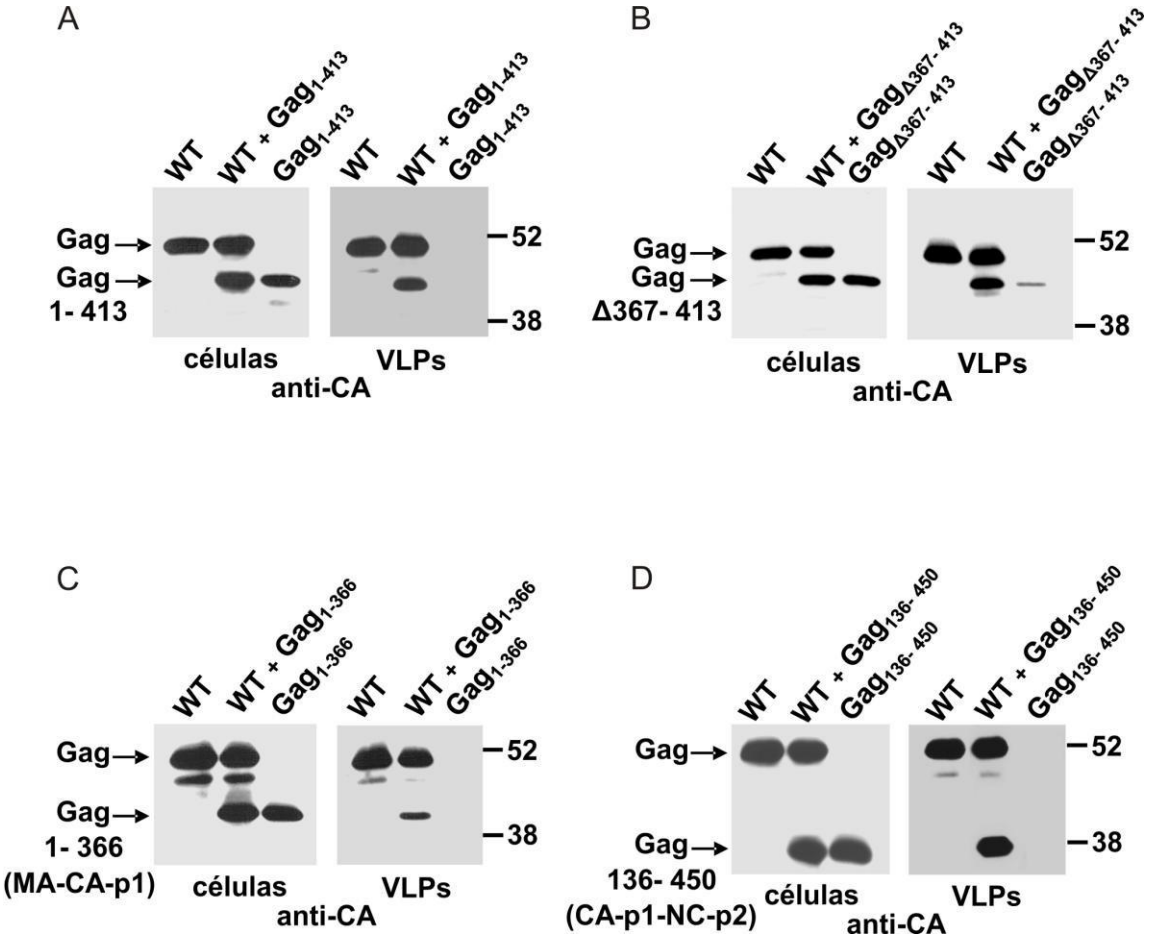


Figura 9. Análisis en cultivos celulares de la capacidad de interacción de diferentes subdominios de Gag de FIV con Gag salvaje. Se infectaron células COS-7 con el virus vaccinia recombinante vTF7-3 y a continuación fueron transfectadas con plásmidos que expresan Gag salvaje de FIV (WT) o cada uno de los siguientes subdominios: Gag_{1-413} (A), $Gag_{\Delta 367-413}$ (B), Gag_{1-366} (C) o $Gag_{136-450}$ (D). En paralelo se transfectaron células con Gag salvaje (WT) y Gag_{1-413} (A), $Gag_{\Delta 367-413}$ (B), Gag_{1-366} (C) o $Gag_{136-450}$ (D). Treinta horas postransfección se cosecharon las células y se purificaron las VLPs de los sobrenadantes de cultivo como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas Gag fueron detectadas por *Western blot* utilizando el MAb anti-CA. Se muestra la movilidad de Gag salvaje y de los subdominios derivados de esta proteína así como la posición de los marcadores de peso molecular (kDa).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

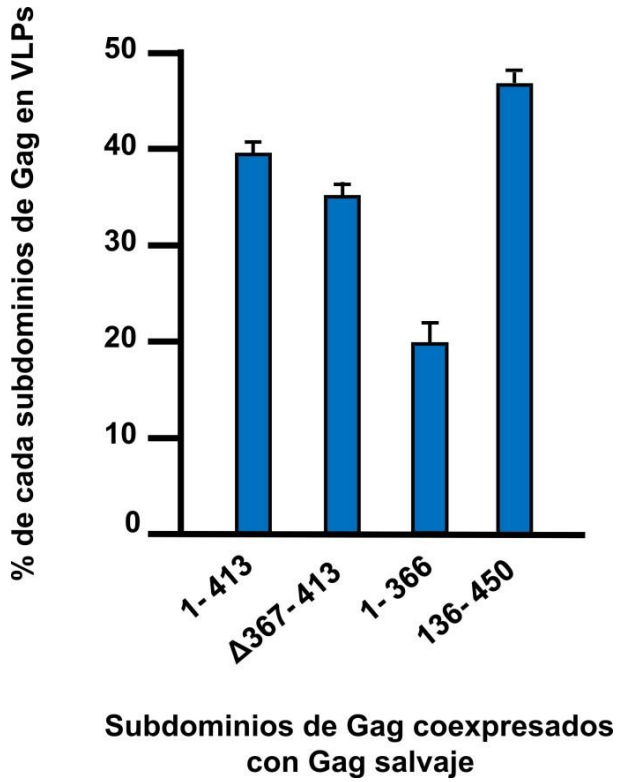


Figura 10. Cuantificación en las VLPs de la cantidad de cada subdominio de Gag. Se calculó la contribución de cada subdominio a la composición de las VLPs respecto de la masa total de proteína relacionada a Gag: [subdominio de Gag/(Gag salvaje + subdominio de Gag)]. Los datos presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

3. Capacidad de las proteínas maduras derivadas de la poliproteína Gag de asociarse a Gag salvaje

A continuación examinamos si las proteínas MA, CA y NC eran capaces de interactuar con la poliproteína Gag. A pesar que estos polipéptidos se expresaron eficientemente en los ensayos de cotransfección, ninguno de ellos fue detectado en las VLPs (Figura 11). Esto indica que las proteínas MA, CA y NC no son capaces de interaccionar con Gag salvaje y, por lo tanto, no son incorporadas a las partículas extracelulares. Solamente trazas de la proteína CA fueron detectadas en la fracción particulada del sobrenadante de las células que coexpresan esta proteína junto con Gag salvaje (Figura 11 B).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

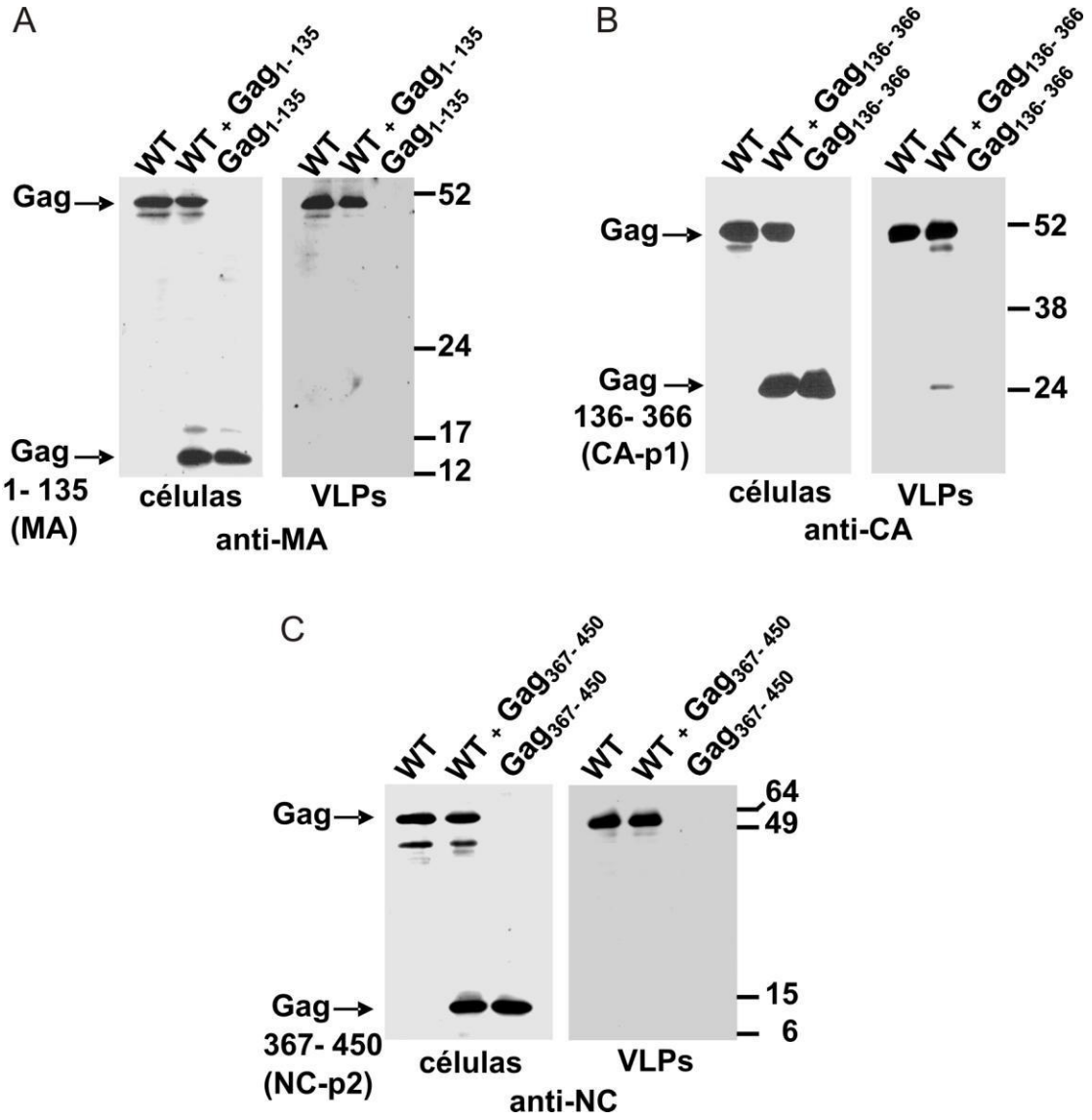


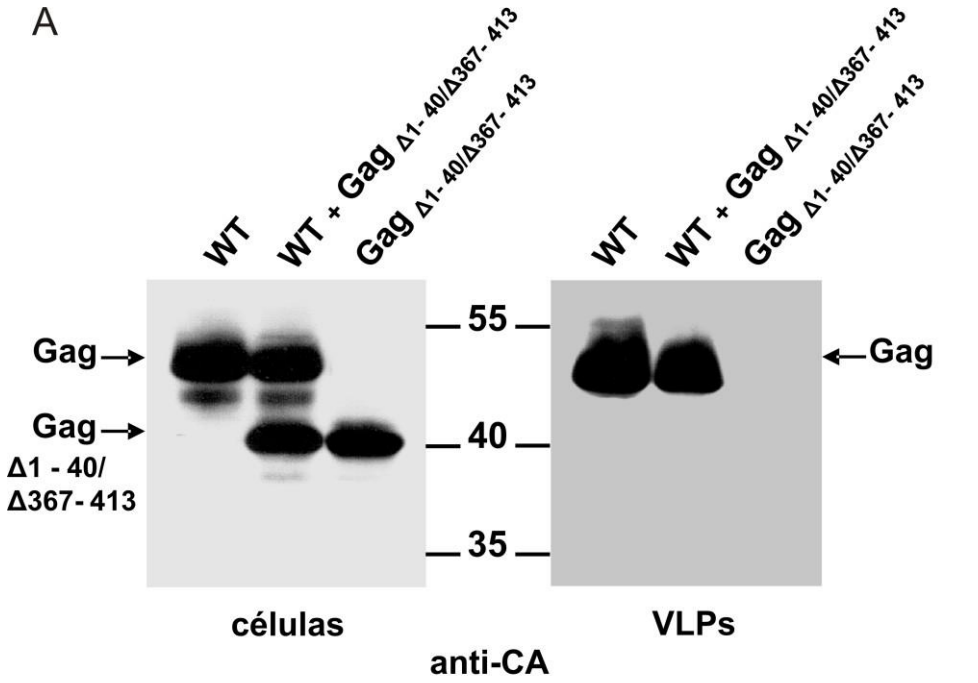
Figura 11. Análisis de la asociación de las proteínas MA, CA y NC con Gag salvaje. Células COS-7 infectadas con el virus vaccinia vTF7-3 fueron transfectadas con los plásmidos que dirigen la expresión de Gag salvaje (WT), MA (Gag_{1-135}) (A), CA ($Gag_{136-366}$) (B) o NC ($Gag_{367-450}$) (C). En paralelo, se cotransfectaron células COS-7 con las construcciones que dirigen la expresión de Gag salvaje (WT) y MA (A), CA (B) o NC (C). Se analizaron los lisados celulares y las VLPs por *Western blot* utilizando el suero policlonal anti-MA de FIV (A), el MAb anti-CA (B) o el suero anti-NC (C). Se indica la movilidad electroforética del precursor Gag de FIV y de las proteínas MA, CA y NC, así como la de los marcadores de peso molecular en kDa.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4. Análisis de la capacidad del mutante $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ de unirse a Gag salvaje

En la Figura 9 B mostramos que el subdominio $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$, que carece de las regiones N-terminal y central del dominio NC, interactúa con Gag salvaje y es reclutado en VLPs. Basándonos en que resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que tanto el ensamblado *in vivo* como *in vitro* de Gag de FIV requiere de la interacción de esta proteína con el ARN genómico viral (Affranchino & González, 2010; Manrique *et al.*, 2004b), especulamos que en el mutante $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ la región polibásica N-terminal del dominio MA podría interactuar de manera inespecífica con el ARN viral permitiendo así la interacción de este mutante de deleción con Gag salvaje. Para testear esta hipótesis, eliminamos del mutante $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ los primeros 40 aminoácidos del dominio MA, los cuales incluyen a la región polibásica (Manrique *et al.*, 2001). Como se observa en la Figura 12 A, el nuevo mutante generado $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ fue incapaz de interaccionar con Gag salvaje y, por lo tanto, no fue rescatado en VLPs. En cambio, el mutante $Gag_{\Delta 1\text{-}40}$ utilizado como control se asoció con Gag salvaje y fue reclutado en las VLPs en una proporción del 37,5 ± 5,5 % (promedio de 3 experimentos ± desviación estándar) respecto del total de la masa proteica de las partículas extracelulares (Figura 12 B).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



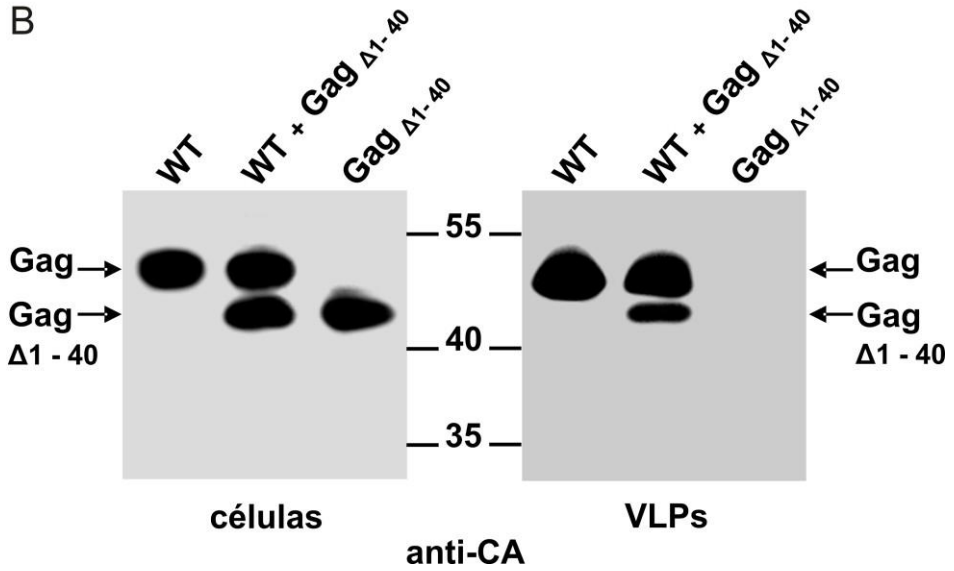


Figura 12. Interacción de los mutantes $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ y $Gag_{\Delta 1\text{-}40}$ con Gag salvaje. Células COS-7 infectadas con el virus vaccinia vTF7-3 fueron transfectadas con los plásmidos que dirigen la expresión de Gag salvaje (WT), $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ (A) o $Gag_{\Delta 1\text{-}40}$ (B). En paralelo, las células fueron cotransfectadas con las construcciones que codifican para Gag salvaje (WT) y $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ (A) o Gag salvaje (WT) y $Gag_{\Delta 1\text{-}40}$ (B). Los lisados celulares y las VLPs fueron analizados por *Western blot* utilizando el MAb anti-CA. Se muestra la movilidad de la proteína Gag salvaje y la de los mutantes de deleción. También se indica la posición del marcador de peso molecular en kDa.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

5. Fenotipo dominante negativo de proteínas Gag de FIV careciendo del dominio p2 o del grupo miristato

Además de los subdominios de Gag ya descriptos, generamos la construcción Gag_{1-432} que codifica para una proteína que carece del péptido C-terminal p2 (Figura 8). Como cabía esperar, este mutante es incapaz de formar partículas extracelulares debido a que la deleción elimina el motivo PSAP necesario para iniciar el proceso de brotación viral (Figura 13). Al coexpresar Gag_{1-432} con Gag salvaje resultó interesante observar que Gag_{1-432} reduce drásticamente la capacidad de Gag salvaje de producir VLPs (Figura 13). En efecto, los niveles de Gag salvaje presentes en las partículas purificadas del medio de cultivo de las células que coexpresan ambas proteínas representan un 15 ± 3 % (media ± desviación estándar; 3 experimentos) de los detectados en las VLPs de cultivos de células expresando solamente Gag salvaje (Figura 13).

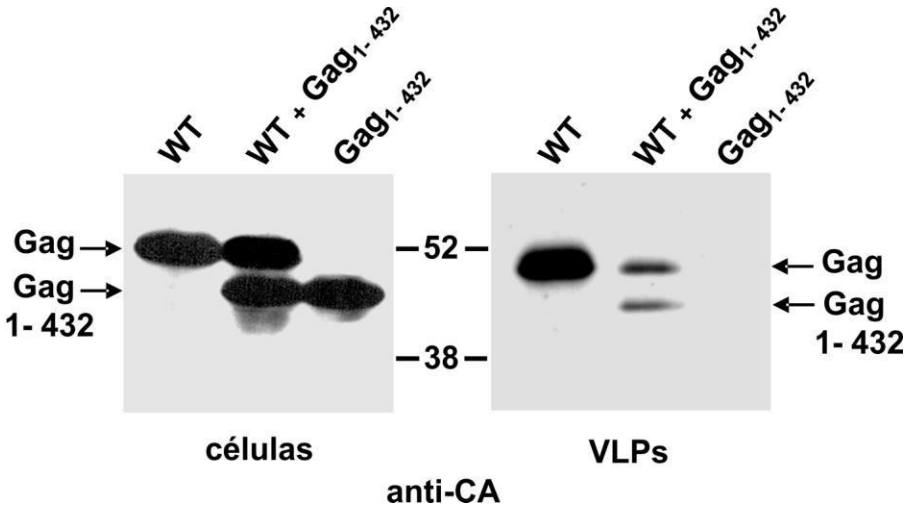


Figura 13. Efecto de la expresión de Gag_{1-432} junto con Gag salvaje sobre la producción de partículas extracelulares. Células COS-7 infectadas con el virus vaccinia vTF7-3 fueron transfectadas con los plásmidos que dirigen la expresión de Gag salvaje (WT) o el mutante Gag_{1-432}, o cotransfectadas con ambos plásmidos. Las proteínas Gag salvaje y mutante fueron detectadas por *Western blot* utilizando el MAb anti-CA. Se indica la movilidad de las proteínas Gag salvaje y Gag_{1-432}.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otro lado, creamos una versión no miristilada de Gag de FIV que lleva en su extremo N-terminal una extensión de 45 aminoácidos que incluye una etiqueta de seis histidinas (His-Gag) (Figura 5), la cual puede discriminarse fácilmente de la proteína Gag salvaje por SDS-PAGE debido a que exhibe menor movilidad electroforética. Debe mencionarse que esta proteína His-Gag es capaz de ensamblarse *in vitro* en partículas esféricas (resultados no mostrados) empleando las condiciones que hemos establecido previamente (Affranchino & González, 2010). Investigamos entonces la capacidad de la proteína His-Gag de interactuar con Gag salvaje. Como se muestra en la Figura 14 A, ambas proteínas alcanzan niveles similares al coexpresarse en células COS-7. Sin embargo, al analizar la fracción particulada a partir del medio de cultivo del experimento de coexpresión y compararla con la purificada del sobrenadante de células expresando solamente Gag salvaje, encontramos que His-Gag inhibe la producción de VLPs extracelulares (Figura 14 A).

Para confirmar esta observación, coinfectamos células COS-7 con dos virus vaccinia recombinantes que expresan Gag salvaje de FIV y una versión no miristilada de esta proteína (Mir- Gag), la cual lleva la sustitución aminoacídica G2A que, como hemos demostrado previamente (Manrique *et al.*, 2001), inhibe la adición de ácido mirístico al extremo amino de Gag y la formación de partículas extracelulares. Confirmando los resultados obtenidos con His-Gag, la coexpresión de Mir- Gag con Gag salvaje reduce drásticamente la producción de VLPs (Figura 14 B). En efecto, los niveles de VLPs purificadas del medio de cultivo de las células expresando Mir- Gag y Gag salvaje representa solamente 13,0 ± 1,6 % (media de 3 experimentos ± desviación estándar) de la cantidad de partículas obtenida al expresar Gag salvaje de FIV (Figura 14 B).

En su conjunto, estos resultados indican que el subdominio Gag_{1-432} y la versión no miristilada de Gag se comportan como mutantes dominantes negativos que reducen drásticamente la capacidad de Gag salvaje de ensamblarse y producir partículas extracelulares.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

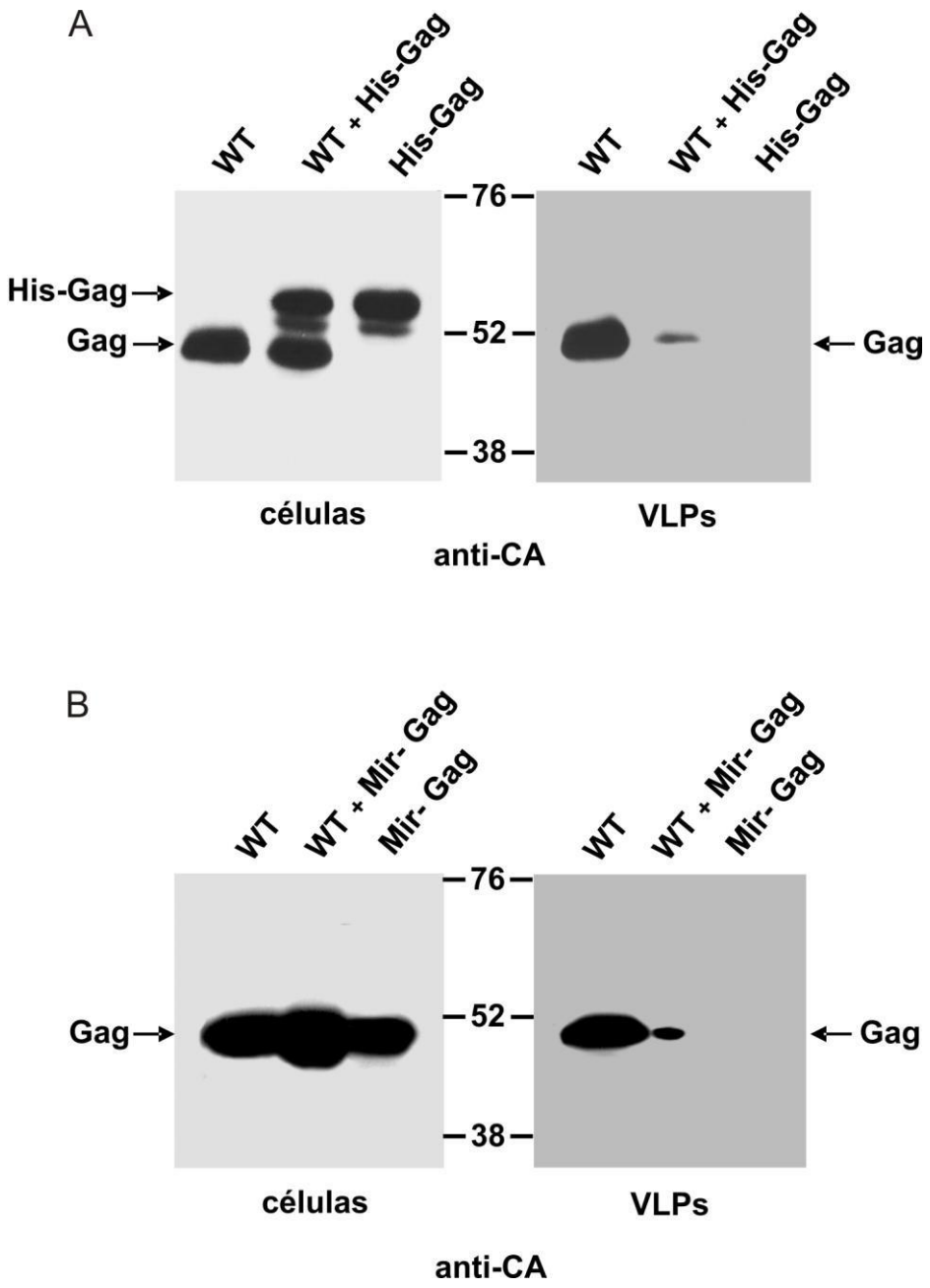


Figura 14. Efecto de la coexpresión de proteína Gag no miristilada con Gag salvaje sobre la formación de VLPs. (A) Células COS-7 infectadas con el virus vaccinia vTF7-3 fueron transfectadas con los plásmidos que dirigen la expresión de Gag salvaje (WT) o del mutante His-Gag. En paralelo se cotransfectaron células COS-7 con ambos plásmidos. (B) Se infectaron células COS-7 con los virus vaccinia recombinantes que expresan Gag salvaje de FIV (WT) o el mutante Mir- Gag. En paralelo se coinfectaron células COS-7 con ambos virus recombinantes. Los lisados celulares y las VLPs fueron analizadas por *Western blot* utilizando el MAb anti-CA. Se indica la movilidad de las proteínas Gag salvaje y de los mutantes así como de los marcadores de peso molecular (en kDa).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

6. Efecto sobre el ensamblado de partículas de deleciones internas en el dominio CA de Gag de FIV

Los resultados obtenidos hasta este punto indicaban que el mutante $Gag_{136-450}$, que comprende a los dominios CA y NC de la poliproteína Gag de FIV, interacciona eficientemente con Gag salvaje (Figuras 9 y 10). Dado que nuestro grupo ha identificado previamente elementos estructurales en los dominios MA y NC cuya mutación inhibe el ensamblado de Gag de FIV en partículas (Manrique *et al.*, 2001, 2004b), nos propusimos investigar el rol de la CA en la multimerización de Gag. Para ello, introdujimos seis deleciones internas en el dominio CA de la poliproteína Gag de FIV (Figura 15 A).

Al alinear la secuencia aminoacídica de la CA de FIV con la de HIV-1 se observa que estas proteínas exhiben un 36 % de identidad y un 59 % de similitud (Figura 15 A). Las regiones de la CA de FIV que fueron blanco de nuestro estudio de mutagénesis fueron seleccionadas sobre la base de su conservación al comparar diferentes aislamientos de FIV y considerando su homología con las α-hélices presentes en la estructura cristalina de la CA de HIV-1 (Gamble *et al.*, 1997; Momany *et al.*, 1996).

Las construcciones del gen *gag* de FIV llevando diferentes deleciones en la región que codifica para la CA se utilizaron para generar recombinantes de vaccinia como se describe en Materiales y Métodos. Estos mutantes de deleción se expresaron en ausencia de procesamiento por la proteasa viral con la finalidad de analizar solamente las funciones que cumple la CA como dominio de Gag. Brevemente, se infectaron células COS-7 con los recombinantes de vaccinia, se prepararon lisados celulares y se purificaron las VLPs del medio de cultivo. Las proteínas Gag salvaje y mutantes fueron detectadas por *Western blot* utilizando el suero policlonal dirigido contra la proteína MA de FIV. Como muestra la Figura 15 B, todos los mutantes de deleción de la CA se expresaron tan eficientemente como Gag salvaje. Al comparar las fracciones particuladas de los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas se observó que las mutaciones ΔC1, ΔC2, ΔMHR and ΔC5 inhiben por completo el ensamblado de Gag en partículas (Figura 15 B). En cambio, las proteínas Gag ΔC3 y ΔC4 fueron capaces de producir VLPs aunque en niveles inferiores a los de Gag salvaje (Figura 15 B).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

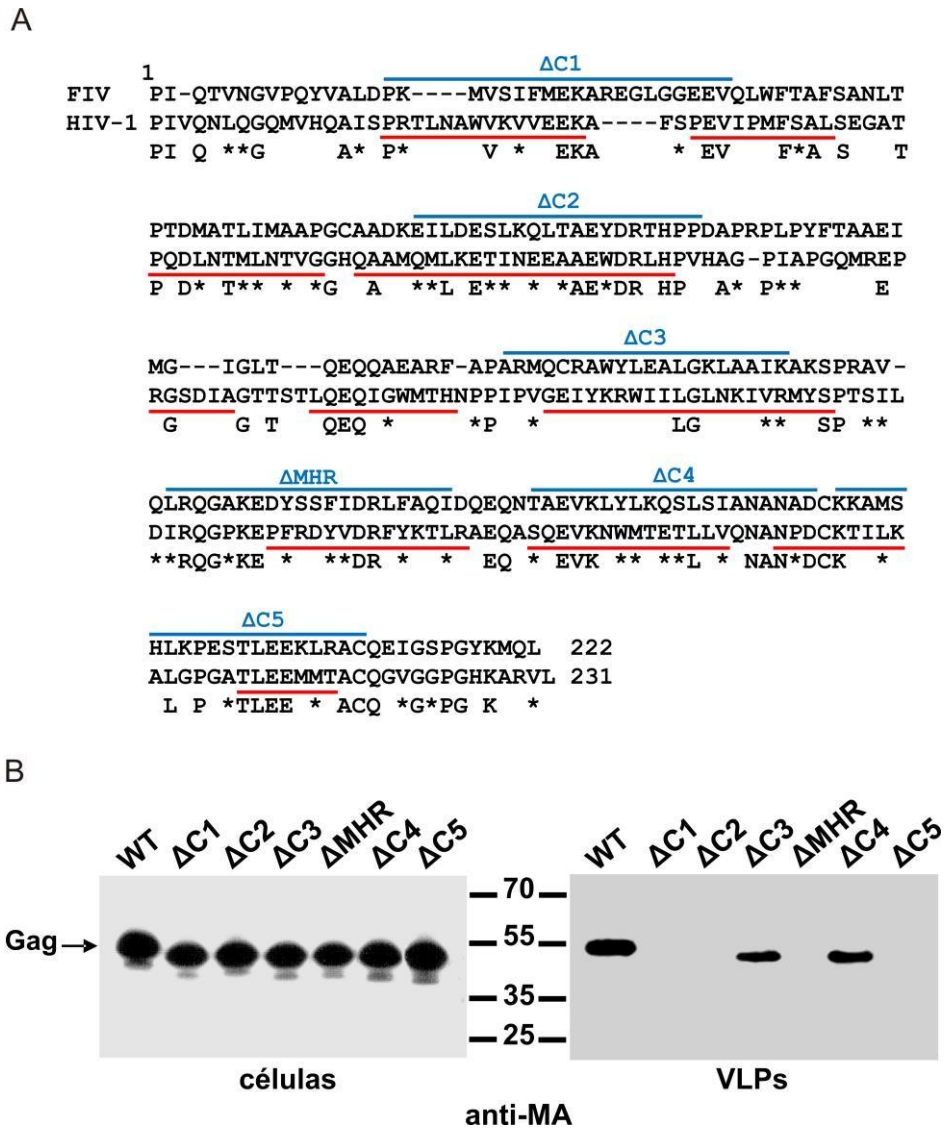


Figura 15. Efecto de las deleciones internas en el dominio CA de Gag de FIV sobre la producción de VLPs. (A) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas CA de FIV (aislamiento Petaluma) y de HIV-1 (cepa NL4-3). Los residuos se hallan numerados de acuerdo a su posición relativa respecto del primer aminoácido de cada CA. Las deleciones internas introducidas en la CA de FIV se indican en color azul sobre la secuencia de la proteína: ΔC1 (residuos 16–35), ΔC2 (residuos 66–85), ΔC3 (residuos 117–136), ΔMHR (residuos 145–164), ΔC4 (residuos 170–189) y ΔC5 (residuos 191–210). En rojo se muestran las once α-hélices presentes en la CA de HIV-1. Los aminoácidos idénticos se indican debajo del alineamiento. Los asteriscos muestran las sustituciones aminoacídicas conservativas. (B) Se infectaron células COS-7 con los recombinantes de vaccinia que expresan los diferentes mutantes de Gag de FIV. Las proteínas Gag salvaje (WT) y mutantes fueron detectadas en lisados celulares y en VLPs por *Western blot* utilizando el suero policlonal dirigido contra la MA de FIV. Se indica la movilidad electroforética de los marcadores de peso molecular (en kDa).

7. Capacidad de la proteína MA de FIV de unir ARN viral

Nuestro laboratorio ha demostrado que la interacción de la proteína Gag con el ARN genómico viral es necesaria para la multimerización de Gag y su ensamblado en viriones. En efecto, la sustitución por serina de la primera cisteína del “dedo de zinc” N-terminal de la NC es suficiente para bloquear tanto la asociación de la NC con el ARN genómico viral como el ensamblado de las partículas (Manrique *et al.*, 2004b). Por otro lado, hemos demostrado que el ensamblado *in vitro* de la proteína Gag recombinante de FIV requiere de la presencia de ARN viral (Affranchino & González, 2010). En base a estos antecedentes, resultó interesante encontrar que el subdominio $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ que carece de los motivos “dedos de zinc” de la NC (Figura 8) interactúa con Gag salvaje y es reclutado en partículas extracelulares (Figura 9 B). Planteamos entonces que, en ausencia del dominio NC, la región básica presente en la porción N- terminal del dominio MA establecería interacciones con el ARN viral permitiendo así que $Gag^{\Delta 367\text{-}413}$ se asocie a Gag salvaje. Para dar sustento a esta hipótesis generamos el doble mutante $Gag_{\Delta 1–40/\Delta 367–413}$ y analizamos su fenotipo de interacción con Gag salvaje. Como esperábamos, $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ resultó incapaz de interactuar con Gag salvaje (Figura 12 A).

El siguiente paso fue establecer si la MA de FIV es efectivamente capaz de unir ARN viral. Para ello, realizamos ensayos de *Northwestern blot* como los empleados previamente por nuestro laboratorio para caracterizar los dominios de interacción con el ARN genómico presentes en la NC de FIV (Manrique *et al.*, 2004b). En este sentido, nuestro laboratorio demostró que un ARN conteniendo la señal de empaquetamiento del genoma de FIV se une específicamente a la proteína NC expresada en *E. coli* e inmovilizada en membranas de nitrocelulosa (Manrique *et al.*, 2004b). Expresamos entonces en *E. coli* la MA y la NC de FIV como proteínas de fusión con GST y, mediante ensayos de *Northwestern blot*, analizamos la capacidad de unión de estas proteínas purificadas a una sonda de ARN viral biotinilada (Figura 16). Como controles, expresamos en *E. coli* y purificamos la GST y la $GST\text{-}MA_{\Delta 1\text{-}40}$ que carece de la región polibásica N-terminal característica de la MA.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

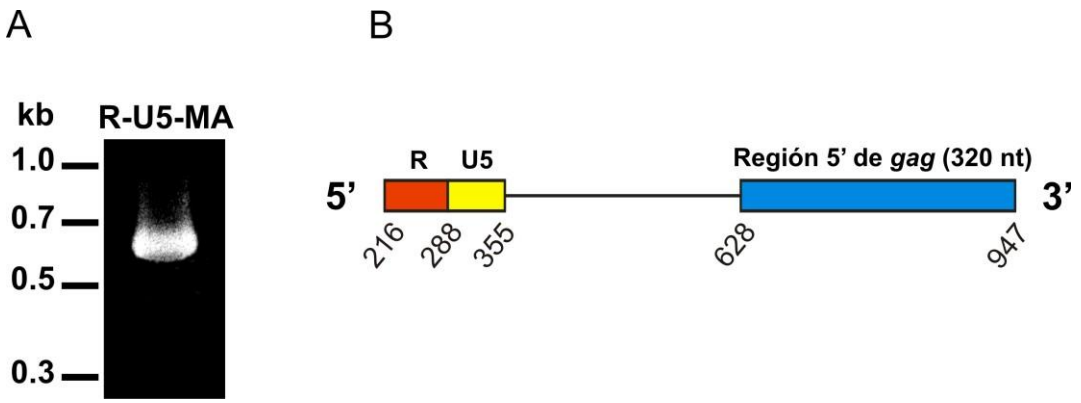


Figura 16. Sonda de ARN viral biotinilado utilizada en los ensayos de *Northwestern blot*. (A) Electroforesis en gel de agarosa del ARN transcripto *in vitro* utilizado como sonda biotinilada en los ensayos de *Northwestern blot*. (B) La sonda empleada contiene la señal de encapsidación del genoma de FIV (nt 216–947) que comprende a las regiones R y U5 de la LTR 5' y a los primeros 320 nucleótidos del gen *gag* (Manrique *et al.*, 2004b).

Al analizar mediante SDS-PAGE y tinción con azul de coomasie coloidal las proteínas recombinantes purificadas observamos que todas se expresaron en niveles similares (Figura 17 A). Los ensayos de *Northwestern blot* realizados (Figura 17 B) mostraron que la proteína NC une ARN viral eficientemente, lo que era esperable de acuerdo a estudios previos de nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2004b). La proteína MA también interactúa con la sonda de ARN aunque con menor eficiencia que la NC (Figura 17 B). Sin embargo, la deleción de la región básica de la MA (mutante $MA_{\Delta 1\text{-}40}$) elimina la capacidad de unión *in vitro* de la MA al ARN viral (Figura 17 B).

La cuantificación de los niveles de ARN viral unido a las proteínas MA y NC reveló que la cantidad de sonda asociada a la MA representa un 17 ± 2 % (media ± desviación estándar; 3 ensayos) de lo que se detecta unido a la NC considerado como 100 % (Figura 17 C). Estos resultados indican que el dominio MA de Gag exhibe cierta capacidad de unión al ARN viral, la cual es eliminada al delecionar la porción básica amino terminal de esta proteína.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

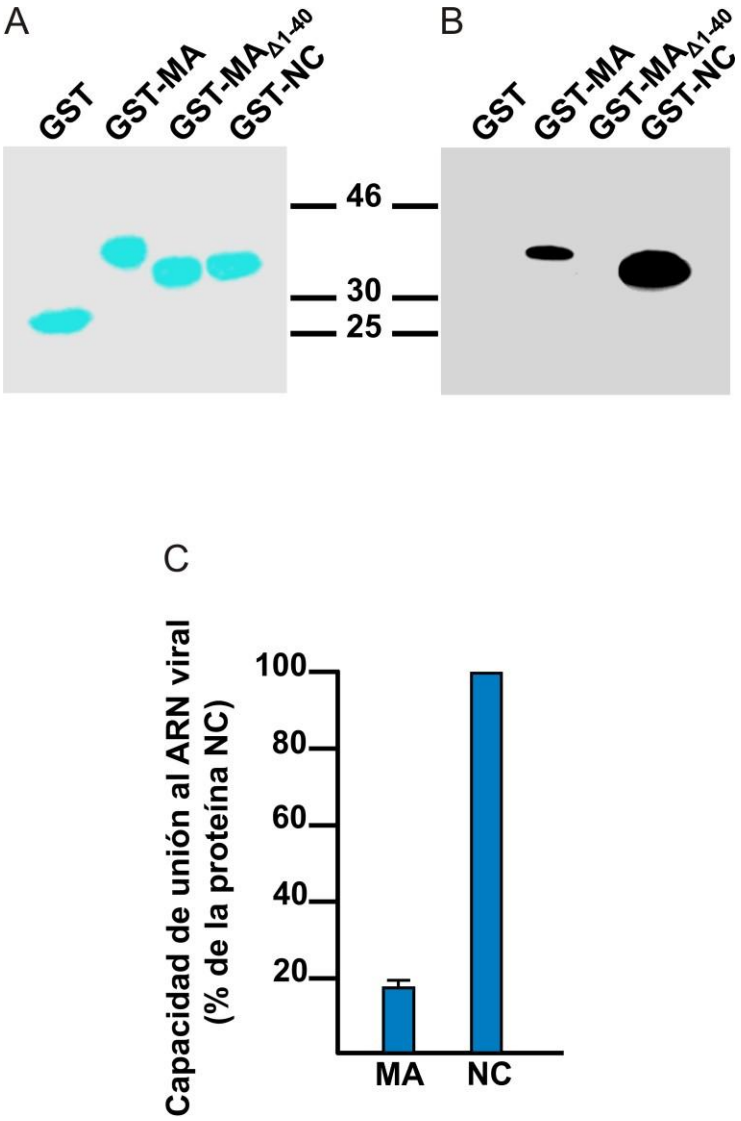


Figura 17. Análisis por *Northwestern blot* de la capacidad de interacción de la MA, MA$_{\Delta 1-40}$, y NC con el ARN viral. (A) Los dominios MA, MA$_{\Delta 1-40}$, y NC fueron expresados como proteínas de fusión con GST, purificados por cromatografía de afinidad, sometidos a SDS-PAGE y teñidos con Coomassie G-250 coloidal o (B) transferidos a membranas de nitrocelulosa para ensayos de *Northwestern blot*. Las membranas fueron incubadas con una sonda biotinilada de ARN viral como se describe en Materiales y Métodos. (C) Cuantificación de los niveles de ARN biotinilado unido a las proteínas recombinantes. La actividad de unión al ARN de la MA fue referido al obtenido con la NC, considerado como 100 %.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Discusión

Si bien numerosos estudios han contribuido al conocimiento del ensamblado de los retrovirus, aún no se habían identificado los dominios en la proteína Gag de FIV que median su multimerización y ensamblado en viriones. Con el propósito de identificar dichas regiones, generamos una serie de subdominios de Gag de FIV que coexpresamos con Gag salvaje en cultivos celulares y determinamos si estas regiones eran capaces de asociarse a la poliproteína viral completa y ser reclutadas en VLPs. Utilizando esta estrategia, determinamos que los mutantes de Gag llevando deleciones de los 37 aminoácidos C-terminales (Gag_{1-413}) o de las regiones N-terminal y central del dominio NC ($Gag_{\Delta 367-413}$), todavía son capaces de interactuar con Gag salvaje y contribuyen a la composición de las partículas extracelulares en una proporción cercana al 40 % del total de su masa proteica. En cambio, el subdominio MA-CA (Gag_{1-366}) se asocia de manera ineficiente a Gag salvaje representando solamente un 20 % del total de la masa proteica relacionada a Gag de las VLPs. Cabe destacar que la región CA-NC ($Gag_{136-450}$) se une a Gag salvaje con mayor eficiencia que el resto de los subdominios estudiados. En este sentido, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el polipéptido CA-NC de SIV interactúa *in vitro* con GST-$Gag_{\Delta p6}$ de SIV con mayor eficiencia que la proteína Gag salvaje de SIV (Rauddi *et al.*, 2011). Incluso, el subdominio formado por el tercio C-terminal de la CA y la NC completa se une a GST-$Gag_{\Delta p6}$ en ensayos *in vitro* de captura de proteínas (*pull down assays*) con una eficiencia similar a la de Gag salvaje siendo además reclutado *in vivo* en VLPs por Gag de SIV (Rauddi *et al.*, 2011). Los resultados presentados en esta Tesis indican que los dominios CA y NC de la poliproteína Gag de FIV son tan esenciales para las interacciones Gag-Gag como los dominios equivalentes de los lentivirus de primates.

Cuando analizamos en cultivos celulares la capacidad de unión a Gag de FIV de las proteínas maduras MA, CA y NC observamos que ninguna de ellas interactúa con la poliproteína completa. Utilizando la misma metodología para SIV nuestro laboratorio tampoco detectó asociación entre la CA y Gag salvaje (Rauddi *et al.*, 2011). Sin embargo, sí demostramos interacción *in vitro* entre GST-SIVGagΔp6 y la proteína MA de SIV (20 % respecto de Gag salvaje) así como con la proteína NC de SIV (40 % del valor obtenido con Gag salvaje) (Rauddi *et al.*, 2011). Por su parte, la incapacidad de la proteína CA de FIV de interactuar en cultivos celulares con la poliproteína Gag puede explicarse por el rol que esta cumple en el virión maduro luego del procesamiento de Gag por la proteasa viral. En la partícula madura, la CA se autoensambla para formar el *core* viral que encierra al complejo NC-ARN genómico viral (Briggs *et al.*, 2003). Basándonos en resultados recientes de nuestro grupo que muestran que la CA de FIV, expresada en *E. coli*, se ensambla *in vitro* formando un complejo multimérico (Esteva *et al.*, 2014), podemos especular que la CA madura al ser expresada en cultivos celulares junto con Gag salvaje exhibe una mayor tendencia a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

autoensamblarse en lugar de asociarse a Gag y ser reclutada en partículas.

Resulta interesante comparar el fenotipo del subdominio $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ que carece de las regiones N-terminal y central de la NC con el de $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$, el cual, además de exhibir la deleción interna de la NC, presenta una MA con su extremo amino truncado. Encontramos que mientras $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ interactúa con Gag salvaje, el mutante $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ es incapaz de hacerlo. Una posible explicación para el comportamiento diferencial observado para estos mutantes es que la incapacidad de $Gag_{\Delta 367\text{-}413}$ de unir ARN (debido a la ausencia de la NC) es compensada por la habilidad de la región básica de la MA de asociar ARN. Es por ello, que la eliminación simultánea de la NC y de la región básica de la MA impide que $Gag_{\Delta 1\text{-}40/\Delta 367\text{-}413}$ una ARN y, en consecuencia, no pueda interactuar con Gag salvaje. En este sentido, los resultados de los ensayos de *Northwestern blot* aquí presentados demuestran que la MA de FIV exhibe cierto grado de asociación con el ARN viral aunque con menor eficiencia que la NC. Cabe destacar que la deleción de la región básica de la MA anula su capacidad de unir ARN.

En apoyo del rol que cumple el ARN como promotor de la multimerización de la poliproteína Gag de FIV, nuestro grupo ha mostrado previamente que: (i) la mutación de la primera cisteína en el “dedo de zinc” N-terminal del dominio NC es suficiente para bloquear tanto la encapsidación del ARN viral como la producción de viriones (Manrique *et al.*, 2004b), y (ii) el ensamblado *in vitro* de la proteína Gag de FIV es estrictamente dependiente de la presencia de ARN viral en la mezcla de reacción (Affranchino & González, 2010). Por otro lado, en otros retrovirus como HIV-1, el virus del sarcoma de Rous y el virus de la leucemia murina, se han realizado estudios que favorecen el concepto de que la interacción entre la NC y el ARN cumple un rol central en el inicio del proceso de ensamblado de Gag en partículas (Alfadhli *et al.*, 2005; Cimarelli *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Muriaux *et al.*, 2001; Zhang & Barklis, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

Un hallazgo interesante de nuestros estudios es la observación de que la sola eliminación del péptido C-terminal p2 es suficiente para generar un mutante dominante negativo de Gag (Gag1-432) que interactúa con Gag salvaje para formar multímeros proteicos no funcionales que son incapaces de brotar al medio extracelular. Dado que el mutante Gag1-432 ejerce un efecto de dominancia negativa tan potente sobre la liberación de Gag, es muy probable que Gag1-432 se asocie con gran eficiencia a Gag salvaje y, por lo tanto, contribuya en gran proporción a la composición de los complejos multiméricos no funcionales Gag-Gag1-432. Las estructuras que resultan de esta interacción deben contener posiblemente un número significativamente menor de motivos de reclutamiento del complejo ESCRT que el estrictamente requerido para la brotación eficiente de VLPs. A diferencia del mutante Gag1-432 de FIV nuestro grupo ha demostrado previamente que la proteína GagΔp6 de SIV no sólo es reclutada en VLPs por Gag salvaje sino que también es capaz de ensamblarse *in vitro* en partículas esféricas (Rauddi *et al.*, 2011).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En esta Tesis Doctoral también mostramos que al igual que Gag1-432, la versión no miristilada de Gag de FIV se comporta como un mutante dominante negativo al ser coexpresado con Gag salvaje. Teniendo en cuenta que nuestro grupo demostró previamente que Mir- Gag se ensambla en partículas intracelulares (Manrique *et al.*, 2001), es posible que el mutante no miristilado de Gag secuestre a Gag salvaje en estas estructuras en lugar de ser reclutado por Gag en VLPs extracelulares.

En el presente estudio comenzamos con la identificación de los dominios de ensamblado de la CA de FIV mediante la caracterización fenotípica de una serie de mutantes de la proteína Gag llevando deleciones internas en su dominio CA. Solamente las deleciones ΔC3 y ΔC4 localizadas en el dominio N-terminal y C-terminal de la CA, respectivamente, no afectan el ensamblado de Gag en VLPs lo que indica que estas regiones de la CA no son esenciales para la multimerización de Gag. En cambio, las mutaciones ΔC1, ΔC2, ΔMHR y ΔC5 inhiben completamente la producción de partículas extracelulares. El fenotipo exhibido por el mutante ΔMHR fue el esperado ya que resultados de nuestro grupo y de otros investigadores han demostrado que mutaciones afectando el dominio MHR de la CA de HIV-1 y de SIV bloquean el ensamblado viral (Mammano *et al.*, 1994; Rauddi *et al.*, 2011). El hecho de que regiones presentes en los dominios amino y carboxilo de la CA sean importantes para el ensamblado de FIV está de acuerdo con los resultados de estudios de mutagénesis dirigida de la CA de HIV-1 (von Schwedler *et al.*, 2003) y con las conclusiones obtenidas de la crio-electrotomografía de partículas inmaduras de HIV-1 (Briggs *et al.*, 2009). En efecto, se ha propuesto que en HIV-1 los dominios amino y carboxilo de la CA contribuyen a la formación en los viriones inmaduros de una red continua de hexámeros de moléculas de Gag (Briggs *et al.*, 2009). En esta estructura hexamérica de Gag, los residuos 153-159 (IRQGPKE) de una molécula de la CA interactúan con los aminoácidos 212-219 (EEMMTACQ) de la molécula CA contigua (Briggs *et al.*, 2009). Es muy destacable entonces que las mutaciones ΔMHR y ΔC5 introducidas en la CA de FIV que bloquean el ensamblado de Gag, eliminen motivos (LRQGAKE y EEKLRACQ, respectivamente) que son homólogos de las secuencias identificadas por Briggs *et al.* (2009). Estudios adicionales nos permitirán identificar en la CA de FIV los residuos específicos que son necesarios para las interacciones homoméricas de Gag que conducen a su ensamblado en viriones.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos identificar en la poliproteína Gag de FIV los dominios cuya interacción promueven la multimerización y ensamblado de Gag en partículas. Para ello, generamos una serie de subdominios de esta proteína para luego estudiar su capacidad de asociarse con Gag salvaje y ser reclutados en partículas pseudovirales extracelulares. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

- La deleción de 37 aminoácidos del extremo carboxilo de Gag, así como la eliminación de las regiones amino y central de la NC, atenúan pero no inhiben por completo la interacción con Gag salvaje. En cambio, un mutante de Gag constituido por los dominios MA y CA exhibe una capacidad muy reducida de asociación con Gag salvaje.

- Las proteínas maduras derivadas de Gag: MA, CA y NC no interaccionan con Gag salvaje de FIV y, por lo tanto, no son rescatadas en VLPs.

- La asociación con Gag salvaje fue completamente bloqueada al delecionar la mayor parte de la NC junto con los primeros 40 aminoácidos de la MA. Este fenotipo podría explicarse por la incapacidad de este mutante de unir ARN viral.

- El subdominio CA-NC se asocia a Gag con un alto grado de eficiencia y al ser rescatado en VLPs representa cerca del 50 % de la composición de las partículas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- El fenotipo de ensamblado de mutantes de Gag conteniendo pequeñas deleciones internas en la CA demuestra que tanto regiones de la porción amino como de la carboxilo de este dominio de Gag son necesarias para el ensamblado de VLPs.

- Tanto la proteína Gag careciendo del péptido C-terminal p2 como la proteína Gag no miristilada ejercen un efecto dominante negativo sobre el ensamblado de Gag salvaje en partículas.

- Mediante ensayos de *Northwestern blot* demostramos que la MA de FIV exhibe cierta capacidad de unir ARN viral. Esta interacción es seguramente mediada por la región polibásica N-terminal de la MA ya que la proteína MAΔ1-40 es incapaz de asociarse con el ARN viral.

- El hecho de que la MA de FIV una ARN viral permite explicar el fenotipo del mutante GagΔ367-413 el cual, a pesar de carecer de la mayor parte de la NC, es capaz de interactuar con Gag salvaje y ser reclutado en VLPs.

En síntesis, hemos demostrado que la región CA-NC de Gag de FIV es el principal dominio responsable de las interacciones Gag-Gag que conducen a la multimerización de esta proteína. Por otro lado, la asociación de Gag con el ARN viral también es necesaria para promover las interacciones homoméricas que conducen al ensamblado de partículas ya que al eliminar los dominios de Gag con capacidad de unir ARN (los motivos “dedos de zinc” de la NC y la región básica de la MA), se inhibe completamente la asociación con Gag salvaje.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Referencias

Affranchino JL (2007). El virus de la inmunodeficiencia humana. Ciencia Hoy 17, 20-25.

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.

Alfadhli A, Dhenub TC, Still A, Barklis E (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. J Virol 79, 14498-14506.

Allison RW & Hoover EA (2003). Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. AIDS Res Hum Retroviruses 19, 421-434.

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.

Beilhartz GL & Gotte M (2010). HIV-1 ribonuclease H: structure, catalytic mechanism and inhibitors. Viruses 2, 900-926.

Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvaldi G, Tozzini F (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. Clin Microbiol Rev 8, 87-112.

Bieniasz PD (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. Virology 344, 55-63.

Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. Curr Biol 14, 1392-1396.

Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B, Zhang Z, David G, Gallay PA (2003). Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. Immunity 18, 27-39.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Briggs JA, Wilk T, Welker R, Kräusslich HG, Fuller SD (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. EMBO J 22, 1707-1715.

Briggs JA, Riches JD, Glass B, Bartonova V, Zanetti G, Kräusslich HG (2009). Structure and assembly of immature HIV. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 11090-11095.

Brown PO (1990). Integration of retroviral DNA. Curr Top Microbiol Immunol 157, 19- 48.

Brown WC, Bissey L, Logan KS, Pedersen NC, Elder JH, Collisson EW (1991). Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. J Virol 65, 3359-3364.

Bryant M & Ratner L (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 523-527.

Celestino M, Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Chiuppesi F, Pistello M, Borsetti A, Palu 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, Affranchino JL, Hunter E, González SA (2001). Domains in the simian immunodeficiency virus gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into particles. Virology 283, 253-261.

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.

Cimarelli A, Sandin S, Hoglund 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.

Clements JE & Zink MC (1996). Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. Clin Microbiol Rev 9, 100-117.

Coffin JM (1996). Retroviridae and their replication. En: *Virology* (Ed. B. N. Fields *et al.*).

Raven Press, New York, p.p. 1767-1848.

Courchamp F & Pontier D (1994). Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. C R Acad Sci III 317, 1123-1134.

Chan DC & Kim PS (1998). HIV entry and its inhibition. Cell 93, 681-684.

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 U S A 107, 1600-1605.

Davison AJ & Moss B (1990). New vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. Nucleic Acids Res 18, 4285-4286.

de Parseval A & Elder JH (1999). Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity. J Virol 73, 608-617.

de Parseval A & Elder JH (2001). Binding of recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoprotein to feline cells: role of CXCR4, cell-surface heparans, and an unidentified non-CXCR4 receptor. J Virol 75, 4528-4539.

de Parseval A, Chatterji U, Sun P, Elder JH (2004a). Feline immunodeficiency virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 13044-13049.

de Parseval A, Ngo S, Sun P, Elder JH (2004b). Factors that increase the effective concentration of CXCR4 dictate feline immunodeficiency virus tropism and kinetics of replication. J Virol 78, 9132-9143.

de Parseval A, Su SV, Elder JH, Lee B (2004c). Specific interaction of feline immunodeficiency virus surface glycoprotein with human DC-SIGN. J Virol 78, 2597-2600.

de Ronde A, Stam JG, Boers P, Langedijk H, Meloen R, Hesselink W, Keldermans LC, van Vliet A, Verschoor EJ, Horzinek MC, et al. (1994). Antibody response in cats to

the envelope proteins of feline immunodeficiency virus: identification of an immunodominant neutralization domain. Virology 198, 257-264.

Dean GA, Himathongkham S, Sparger EE (1999). Differential cell tropism of feline immunodeficiency virus molecular clones in vivo. J Virol 73, 2596-2603.

Elder JH, Lerner DL, Hasselkus-Light CS, Fontenot DJ, Hunter E, Luciw PA, Montelaro RC, Phillips TR (1992). Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. J Virol 66, 1791-1794.

Elder JH, Schnolzer M, Hasselkus-Light CS, Henson M, Lerner DA, Phillips TR, Wagaman PC, Kent SB (1993). Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyproteins of feline immunodeficiency virus. J Virol 67, 1869-1876.

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.

English RV, Nelson P, Johnson CM, Nasisse M, Tompkins WA, Tompkins MB (1994). Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. J Infect Dis 170, 543-552.

Esteva MJ, Affranchino JL, González SA (2014). Lentiviral Gag assembly analyzed through the functional characterization of chimeric simian immunodeficiency viruses expressing different domains of the feline immunodeficiency virus capsid protein. PLoS One 9, e114299.

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.

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.

Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 8122-8126.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

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, Yeager M, Sundquist WI (2008). The structural biology of HIV assembly. Curr Opin Struct Biol 18, 203-217.

Garg H, Fuller FJ, Tompkins WA (2004). Mechanism of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated fusion. Virology 321, 274-286.

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.

Giannecchini S, Bonci F, Pistello M, Matteucci D, Sichi O, Rovero P, Bendinelli M (2004). The membrane-proximal tryptophan-rich region in the transmembrane glycoprotein ectodomain of feline immunodeficiency virus is important for cell entry. Virology 320, 156-166.

Goff SP (1992). Genetics of retroviral integration. Annu Rev Genet 26, 527-544.

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

González 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.

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.

Gupta RK, Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, Petit SJ, Mattiuzzo G, Pillay D, Takeuchi Y, Marsh M, Towers GJ (2009). Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 20889-20894.

Hanahan D (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166, 557-580.

Hayward JJ & Rodrigo AG (2008). Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. Virol J 5, 76.

Hayward JJ & Rodrigo AG (2010). Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (Felis catus). Vet Immunol Immunopathol 134, 68-74.

Holmes DS & Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem 114, 193-197.

Hong Y, Fink E, Hu QY, Kiosses WB, Elder JH (2010). OrfA downregulates feline immunodeficiency virus primary receptor CD134 on the host cell surface and is important in viral infection. J Virol 84, 7225-7232.

Hosie MJ, Pajek D, Samman A, Willett BJ (2011). Feline immunodeficiency virus (FIV) neutralization: a review. Viruses 3, 1870-1890.

Hu QY, Fink E, Hong Y, Wang C, Grant CK, Elder JH (2010). Fine definition of the CXCR4-binding region on the V3 loop of feline immunodeficiency virus surface glycoprotein. PLoS One 5, e10689.

Hunter E (1997). Viral Entry and Receptors. En: *Retroviruses* (Ed. J. M. Coffin *et al.*). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), p.p. 71-120.

Ishida T, Washizu T, Toriyabe K, Motoyoshi S, Tomoda I, Pedersen NC (1989). Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. J Am Vet Med Assoc 194, 221-225.

Ishida T & Tomoda I (1990). Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. Nihon Juigaku Zasshi 52, 645-648.

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.

Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, Fofana IB, Johnson WE, Westmoreland S, Evans DT (2009). Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. PLoS Pathog 5, e1000429.

Johnson MC, Scobie HM, Ma YM, Vogt VM (2002). Nucleic acid-independent retrovirus assembly can be driven by dimerization. J Virol 76, 11177-11185.

Jordan HL, Howard JG, Bucci JG, Butterworth JL, English R, Kennedy-Stoskopf S, Tompkins MB, Tompkins WA (1998). Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. J Reprod Immunol 41, 341- 357.

Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y, McNatt M, Hatziioannou T, Bieniasz PD (2009). Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. J Virol 83, 1837-1844.

Kemler I, Barraza R, Poeschla EM (2002). Mapping the encapsidation determinants of feline immunodeficiency virus. J Virol 76, 11889-11903.

Kenyon JC & Lever AM (2011). The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). Viruses 3, 2192-2213.

Laco GS, Fitzgerald MC, Morris GM, Olson AJ, Kent SB, Elder JH (1997). Molecular

analysis of the feline immunodeficiency virus protease: generation of a novel form of the protease by autoproteolysis and construction of cleavage-resistant proteases. J Virol 71, 5505-5511.

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

Le Tortorec A & Neil SJ (2009). Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. J Virol 83, 11966-11978.

Le Tortorec A, Willey S, Neil SJ (2011). Antiviral inhibition of enveloped virus release by tetherin/BST-2: action and counteraction. Viruses 3, 520-540.

Lee YM & Yu XF (1998). Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD4+ T cells. Virology 243, 78-93.

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 U S A 92, 7480-7484.

Lombardi S, Garzelli C, La Rosa C, Zaccaro L, Specter S, Malvaldi G, Tozzini F, Esposito F, Bendinelli M (1993). Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the feline immunodeficiency virus envelope. J Virol 67, 4742- 4749.

Lu M, Blacklow SC, Kim PS (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. Nat Struct Biol 2, 1075-1082.

Luttge BG, Shehu-Xhilaga M, Demirov DG, Adamson CS, Soheilian F, Nagashima K, Stephen AG, Fisher RJ, Freed EO (2008). Molecular characterization of feline immunodeficiency virus budding. J Virol 82, 2106-2119.

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

Manrique JM, Celma CC, 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 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 ML, Celma CC, 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.

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.

McClure MA, Johnson MS, Feng DF, Doolittle RF (1988). Sequence comparisons of retroviral proteins: relative rates of change and general phylogeny. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 2469-2473.

Medinas RJ, Lambert DM, Tompkins WA (2002). C-Terminal gp40 peptide analogs inhibit feline immunodeficiency virus: cell fusion and virus spread. J Virol 76, 9079- 9086.

Meng B & Lever AM (2013). Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. Retrovirology 10, 5.

Momany C, Kovari LC, Prongay AJ, Keller W, Gitti RK, Lee BM, Gorbalenya AE, Tong L, McClure J, Ehrlich LS, Summers MF, Carter C, Rossmann MG (1996). Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. Nat Struct Biol 3, 763-770.

Morikawa S & Bishop DH (1992). Identification and analysis of the gag-pol ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. Virology 186, 389-397.

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 U S A 98, 5246-5251.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature 451, 425-430.

Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. Curr Biol 7, 767-775.

North TW, Cronn RC, Remington KM, Tandberg RT, Judd RC (1990). Characterization of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus. J Biol Chem 265, 5121-5128.

O'Neil LL, Burkhard MJ, Diehl LJ, Hoover EA (1995). Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. Semin Vet Med Surg (Small Anim) 10, 266-278.

Olmsted RA, Barnes AK, Yamamoto JK, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR (1989a). Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 2448- 2452.

Olmsted RA, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR (1989b). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 8088-8092.

Olsen HS, Nelbock P, Cochrane AW, Rosen CA (1990). Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA. Science 247, 845-848.

Ono A, Orenstein JM, Freed EO (2000). Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. J Virol 74, 2855-2866.

Pecon-Slattery J, Troyer JL, Johnson WE, O'Brien SJ (2008). Evolution of feline

immunodeficiency virus in Felidae: implications for human health and wildlife ecology. Vet Immunol Immunopathol 123, 32-44.

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, Hansen H (1989). Feline immunodeficiency virus infection. Vet Immunol Immunopathol 21, 111-129.

Pedersen NC & Barlough JE (1991). Clinical overview of feline immunodeficiency virus. J Am Vet Med Assoc 199, 1298-1305.

Pettit SC, Sheng N, Tritch R, Erickson-Viitanen S, Swanstrom R (1998). The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. Adv Exp Med Biol 436, 15-25.

Phillips TR, Prospero-Garcia O, Puaoi DL, Lerner DL, Fox HS, Olmsted RA, Bloom FE, Henriksen SJ, Elder JH (1994). Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection. J Gen Virol 75, 979-987.

Phillips TR, Prospero-Garcia O, Wheeler DW, Wagaman PC, Lerner DL, Fox HS, Whalen LR, Bloom FE, Elder JH, Henriksen SJ (1996). Neurologic dysfunctions caused by a molecular clone of feline immunodeficiency virus, FIV-PPR. J Neurovirol 2, 388- 396.

Poeschla EM & Looney DJ (1998). CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. J Virol 72, 6858-6866.

Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, Yeager M (2009). X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. Cell 137, 1282-1292.

Prospero-Garcia O, Herold N, Phillips TR, Elder JH, Bloom FE, Henriksen SJ (1994a). Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 12947-12951.

Prospero-Garcia O, Herold N, Waters AK, Phillips TR, Elder JH, Henriksen SJ (1994b). Intraventricular administration of a FIV-envelope protein induces sleep architecture changes in rats. Brain Res 659, 254-258.

Rauddi ML, Mac Donald CL, Affranchino JL, González SA (2011). Mapping of the self-interaction domains in the simian immunodeficiency virus Gag polyprotein. AIDS Res Hum Retroviruses 27, 303-316.

Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11364-11369.

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

Sellon RK, Jordan HL, Kennedy-Stoskopf S, Tompkins MB, Tompkins WA (1994). Feline immunodeficiency virus can be experimentally transmitted via milk during acute maternal infection. J Virol 68, 3380-3385.

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.

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, Holmes ML, Appa RS, Chow SA (1997). Characterization of feline immunodeficiency virus integrase and analysis of functional domains. Virology 230, 1-10.

Shimojima 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.

Sodora DL, Shpaer EG, Kitchell BE, Dow SW, Hoover EA, Mullins JI (1994). Identification

of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. J Virol 68, 2230-2238.

Sparger EE, Luciw PA, Elder JH, Yamamoto JK, Lowenstine LJ, Pedersen NC (1989). Feline immunodeficiency virus is a lentivirus associated with an AIDS-like disease in cats. AIDS 3 Suppl 1, S43-49.

Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. Cell 114, 689-699.

Suarez T, Nir S, Goni FM, Saez-Cirion A, Nieva JL (2000). The pre-transmembrane region of the human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein: a novel fusogenic sequence. FEBS Lett 477, 145-149.

Sundquist WI & Kräusslich HG (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a006924.

Sundstrom M, White RL, de Parseval A, Sastry KJ, Morris G, Grant CK, Elder JH (2008). Mapping of the CXCR4 binding site within variable region 3 of the feline immunodeficiency virus surface glycoprotein. J Virol 82, 9134-9142.

Swanstrom R & Erona J (2000). Human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors: therapeutic successes and failures, suppression and resistance. Pharmacol Ther 86, 145-170.

Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, Pedersen NC, Luciw PA, Elder JH (1989). Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 5743-5747.

Telesnitsky A & Goff SP (1997). Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. En: *Retroviruses* (Ed. J. M. Coffin *et al.*). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), p.p. 121-160.

Tomonaga K, Shin YS, Fukasawa M, Miyazawa T, Adachi A, Mikami T (1993). Feline immunodeficiency virus gene expression: analysis of the RNA splicing pattern and the monocistronic rev mRNA. J Gen Virol 74, 2409-2417.

Tomonaga K & Mikami T (1996). Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. J Gen Virol 77, 1611-1621.

Torten M, Franchini M, Barlough JE, George JW, Mozes E, Lutz H, Pedersen NC (1991). Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. J Virol 65, 2225-2230.

Trinh T, Jesse J, Bloom F, Hirsch V (1994). STBL2^{TM}: an Escherichia coli strain for the stable propagation of retroviral clones and direct repeat sequences. Focus 16, 78-80.

Uhl EW, Martin M, Coleman JK, Yamamoto JK (2008). Advances in FIV vaccine technology. Vet Immunol Immunopathol 123, 65-80.

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.

Verschoor EJ, Hulskotte EG, Ederveen J, Koolen MJ, Horzinek MC, Rottier PJ (1993). Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. Virology 193, 433-438.

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.

White J, Stickney A, Norris JM (2011). Feline immunodeficiency virus: disease association versus causation in domestic and nondomestic felids. Vet Clin North Am Small Anim Pract 41, 1197-1208.

Willett BJ, Hosie MJ, Neil JC, Turner JD, Hoxie JA (1997a). Common mechanism of infection by lentiviruses. Nature 385, 587.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Willett BJ, Picard L, Hosie MJ, Turner JD, Adema K, Clapham PR (1997b). Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. J Virol 71, 6407-6415.

Willett BJ & Hosie MJ (2008). Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. Vet Immunol Immunopathol 123, 56-64.

Wills JW & Craven RC (1991). Form, function, and use of retroviral gag proteins. AIDS 5, 639-654.

Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O'Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC (1988). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. Am J Vet Res 49, 1246-1258.

Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM, Pedersen NC (1989). Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. J Am Vet Med Assoc 194, 213-220.

Yamamoto JK, Pu R, Sato E, Hohdatsu T (2007). Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. AIDS 21, 547-563.

Yamamoto JK, Sanou MP, Abbott JR, Coleman JK (2010). Feline immunodeficiency virus model for designing HIV/AIDS vaccines. Curr HIV Res 8, 14-25.

Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. Science 302, 1056-1060.

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.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Zielonka J, Marino D, Hofmann H, Yuhki N, Lochelt M, Munk C (2010). Vif of feline immunodeficiency virus from domestic cats protects against APOBEC3 restriction factors from many felids. J Virol 84, 7312-7324.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes