



Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

TESIS DOCTORAL

“Nuevas estrategias terapéuticas frente a la infección por el VIH-1”

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica

Marta Martínez Bonet

para optar al grado de

Doctora en Biología Molecular y Celular

Directores de Tesis:

Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Dr. Ricardo Madrid González

Lugar de realización:

**Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Madrid, 2014**

Esta Memoria ha sido realizada en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid bajo la dirección de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández y el Dr. Ricardo Madrid González. El trabajo de investigación que constituye esta Memoria ha sido realizado gracias a la financiación concedida por el “Fondo de Investigaciones Sanitarias” del Instituto de Salud Carlos III con número de expediente: FI10/00141 en concepto de “Ayudas predoctorales de iniciación a la investigación”.

La Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández, Jefa de Sección del Servicio de Inmunología, Jefa del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular y Directora del Biobanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y el Dr. Ricardo Madrid González, investigador del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,

CERTIFICAN QUE,

el trabajo de investigación y la redacción de la Tesis Doctoral titulada: “Nuevas estrategias terapéuticas frente a la infección por el VIH-1” ha sido realizado por Marta Martínez Bonet, bajo su dirección. Revisado el trabajo, los que suscriben consideran el trabajo como satisfactorio y autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor.

Madrid, 2 de Junio de 2014.

Fdo. Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández

Fdo. Dr. Ricardo Madrid González

Agradecimientos



Nunca imaginé que, tras haber realizado todo el trabajo que implica una Tesis doctoral, fuera tan difícil escribir los agradecimientos. Y es que, los que me conocéis, sabéis que no tengo don de palabra, incluso a veces diciendo cosas buenas parece que estoy regañando. Una cosa es cierta: diga lo que diga (o escriba lo que escriba), lo hago de todo corazón. Como se dice habitualmente, “un gesto vale más que mil palabras” así que, aunque espero ser capaz de reflejar mi agradecimiento a todos vosotros en estas líneas, confío en que durante estos años os lo haya sabido transmitir día a día.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial y sincera a mis Directores de Tesis, M^a Ángeles Muñoz Fernández y Ricardo Madrid González. Sin vosotros esta Tesis no hubiera sido posible.

Gracias M^a Ángeles, porque desde el primer momento confiaste en mi y accediste a acogerme en tu grupo. Desde el principio me impresionó tu capacidad de dirigir un equipo tan grande, con todo lo que eso conlleva: tiempo, trabajo, dedicación y esfuerzo. Gracias por apoyarme y permitirme crecer, por tus opiniones y tus ideas. Gracias por los ánimos en los momentos que lo necesité porque, como me has dicho alguna vez, “cuando hablamos las cosas son menos difíciles de lo que parecen”.

Gracias Ricardo, por ser la llave que me permitió entrar en este laboratorio. Gracias por tantas horas de poyata que has compartido conmigo, por tus charlas en el ámbito científico y en el personal y por tu paciencia para enseñarme mucho de lo que ahora sé.

Gracias al Dr. Javier Martínez-Picado, por haberme permitido realizar mi estancia en su laboratorio, y a todo su equipo, por haberme enseñado nuevas técnicas y haberme tratado tan bien. Gracias al Dr. Manuel Leal y su grupo, colaborar con vosotros ha sido una gran oportunidad.

Y, cómo no, gracias a todos mis compañeros de laboratorio. Gracias por vuestra compañía durante estos años y por todo lo que implica la convivencia del día a día. Sin vosotros nada hubiera sido igual.

Gracias Miguel, por conservar tu entusiasmo por la ciencia y por transmitirlo a los demás. Gracias por estar siempre ahí y por tu ayuda desde el primer momento.

Gracias a Maribel, a Chusa, a Susana y a Raquel, por hacerme un hueco entre vosotras. Gracias por estar pendientes de mí, por vuestros consejos y apoyo. Gracias Maribel, además de por tantas horas de trabajo que hemos compartido en estos últimos meses, por tu forma de ver las cosas y tu complicidad.



Gracias Rafa C, Marjorie, José Luis y Laura, por vuestra disponibilidad y ayuda siempre, por vuestros consejos, sugerencias y palabras de ánimo. Gracias Verónica, por ser ese espíritu inquieto que siempre me está encaminando la vida para casi los próximos 20 años y por ofrecerme tu respaldo siempre que lo he necesitado.

Mabela y Luis López, muchas gracias por vuestra ayuda y por adoptarme durante tanto tiempo en la zona de bacterias. Gracias a los chicos de Biobanco: Isabel, Almudena, Coral, Jorge y Paula; vuestro trabajo de hormiguitas es indispensable. Santi, gracias por compartir con todos nosotros tu alegría diaria. Lola, gracias por tu buen humor y por la templanza que tienes.

Gracias a todas las nuevas incorporaciones, Begoña y Esther, y a todos los estudiantes de máster y fin de carrera que han pasado por aquí en este tiempo, por aportar tanta frescura al grupo.

Gracias a José María y Rafael Samaniego, por su inestimable ayuda con la estadística y la microscopía.

Gracias a todos los predoctorales con los que he coincidido durante estos años: Alberto (¡qué coincidencia hacer conocido a un nuevo primo!), Rafa G, Javi, Enrique, Judith, Didiana, Dani y Pilar. Gracias porque no sólo habéis sido compañeros de laboratorio, sino también amigos fuera de él. Gracias Judith, por poder contar siempre contigo y por permanecer a mi lado.

Gracias Sandra, los eternos días de experimentos han sido más llevaderos a tu lado. Gracias Irene, porque siempre tienes las palabras adecuadas. Gracias chicas, por esos momentos de confesiones, risas y, por qué no decirlo, por haber creado nuestro mundo paralelo en la “isla del amor”.

Gracias a mis amigos, por la tarea difícil que os ha tocado de aguantarme. Gracias por poder contar con vosotros y por estar siempre a mi lado. Gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntos y por los ánimos que me dais cuando más lo necesito.

Gracias a mi familia, por vuestro apoyo y por interesaros siempre por cómo van las cosas. A Carlos, M^a Laura y Santi, por haberme acogido como a una más de vuestra familia y porque, a pesar de la distancia, sé que siempre podré contar con vosotros. A mis abuelos, por haber tenido la suerte de disfrutar de vuestro cariño.

Y, por supuesto, gracias a mis padres, por enseñarme a ser como soy, por lo pendientes que estáis de mi en todo momento y por vuestro amor incondicional. Gracias a mi hermana Paula, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y por lo mucho que me quieres. Gracias por tus mimos.

Gracias a Nico, por quererme y por apoyarme siempre en todo lo que hago. Por saber hacerme sonreír hasta en los momentos más difíciles y por hacer que mi vida sea mejor a tu lado.

Summary



The present work is composed of two main goals: “Identification and functional analysis of the HIV-1 Nef PGPG motif, responsible for the interaction with the SH2 domain of Lck, as a new potential therapeutic target” and “Study of the *in vitro* and *ex vivo* effects of bryostatin-1 in combination with the antiretrovirals maraviroc or Atripla® on viral reactivation and the inhibition of novel infection issues”.

SECTION 1: HIV-1 Nef affects pivotal processes in the infected host cell including T cell receptor signalling. Most of these effects involve the physical association with and alteration of subcellular localization of the host cell kinase Lck. Retargeting of Lck depends on a PxxP motif in Nef that binds to SH3 domains. Moreover, the SH2 domain of Lck was reported to contribute to interactions with Nef, however the identity of the HIV-1 Nef motif responsible for this interaction has remained unknown. To search for the elusive SH2 binding site we performed a functional alanine scanning analysis along a discrete but highly conserved region at the core of HIV-1 Nef. We identified a PGPG motif encompassing residues 121-137 of HIV-1_{NI.4.3} Nef to be required for the interaction with Lck-SH2. The PGPG motif was critical for Lck dependent Nef functions, including CD4 downregulation, optimal infectivity of viruses produced in T cells as well as intracellular recruitment of Lck. Unexpectedly, we found that the PGPG motif also participated in the binding to the Lck-SH3 domain, indicative of the synergy between PxxP-SH3 and PGPG-SH2 interaction. In accordance, the PGPG motif also participated on Nef dependent inhibition of host cell actin dynamics and MHC-I downregulation, which are PxxP dependent activities of Nef that do not involve Lck.

In conclusion, the PGPG motif can mediate interactions of Nef with SH2 domains and supports the activity of the Nef PxxP motif. Thus, we propose the conserved PGPG motif in HIV-1 Nef as a potential pharmacological target for interference with Nef function in HIV-1 infection.

SECTION 2: Despite antiretroviral therapy successfully controls HIV-1 viremia in most AIDS patients, virus latency establishment early upon infection impedes HIV-1 eradication in HIV-1+ patients. Bryostatin-1 (BRYO) inhibits *in vitro* HIV-1 infection of CD4 T lymphocytes (as it downregulates CD4 and CXCR4, viral receptor and coreceptor, respectively) and, at the same time, reactivates virus from latency through PKC/NF-κB pathway activation. Prior to design clinical studies with BRYO to assess its real impact on the size of the HIV-1 latent reservoirs, the potential *in vitro* effect of BRYO in combination with the antiretrovirals (AR) maraviroc (MVC) and Atripla® (ATP) has been determined. Jurkat-LTRGFP-R5 cell line and two latent and



reactivable HIV-1-infected lymphocytic or monocytic clonal cell lines (J89GFP and THP89GFP respectively) were used as latency models. BRYO reactivated latent HIV-1, reaching levels up to 80% in THP89GFP cells, even in combination with MVC or ATP. Moreover, when AR pre-treated reporter T_{ZM}-bl cells were co-cultured with BRYO treated THP89GFP, new infections of reactivated HIV-1_{89.6} were inhibited 50% or 80% for MVC or ATP pre-treated cells, respectively. Remarkably, when AR were combined with BRYO, the combinations maintained the antiviral effect of the drugs with the maximum rate of inhibition by its own. In addition, BRYO-mediated downregulation of surface CD4 and CXCR4 in PBMC was not affected when it was used along with other AR and no hiperactivation or high proliferation effects were observed in these cells. Significantly, we found that BRYO strongly stimulated the viral promoter (LTR) transcription by activating the transcription factor NF- κ B in human primary astrocytes and in the astrocytoma cell line U87, suggesting that the reactivation effect of BRYO could be especially important in a cellular reservoir such as astrocytes. Moreover, BRYO was also tested *ex vivo* for HIV-1 induction in CD4 T cells isolated from infected individuals receiving HAART and was found to exhibit potent induction activity.

This work is the first to demonstrate that AR combination with BRYO do not interfere with BRYO activity (in terms of reactivation of latently infected cells and partial inhibition of infection) neither with AR antiviral activity.

Thus, we propose BRYO as a viral latency reactivator compound appropriate to be combined with actual antiretroviral treatments in order to purge the viral reservoirs.

Índice



Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	11
1.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	13
1.1.1 Estructura y genoma del VIH-1.....	13
1.1.2 Ciclo replicativo del VIH-1.....	14
1.1.3 Curso natural de la infección por el VIH-1.....	16
1.1.4 Establecimiento de reservorios virales.....	18
1.1.5 El sistema nervioso central como reservorio anatómico del VIH-1	20
1.2 TRATAMIENTOS FRENTE A LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.....	22
1.2.1 Terapia antirretroviral de gran actividad.....	22
1.2.2 Estrategias de erradicación del VIH-1.....	24
a) Intensificación del tratamiento antirretroviral.....	24
b) Terapia génica.....	24
c) Reactivación de la latencia viral.....	25
1.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIH-1.....	29
1.3.1 La proteína Nef del VIH-1 como diana terapéutica.....	29
a) Funciones de Nef	31
b) Interacción entre la proteína Nef y la proteína Lck.....	32
1.3.2 La briostatina-1 como fármaco anti-latencia.....	33
2. Objetivos.....	37
3. Materiales y Métodos.....	41
3.1 MATERIALES.....	43
3.1.1 Cultivos celulares.....	43
a) Medios de cultivo.....	43
b) Células primarias.....	43
c) Líneas celulares.....	44
d) Bacterias.....	46
3.1.2 Plásmidos.....	46
3.1.3 Cebadores.....	47
3.1.4 Anticuerpos.....	47
3.1.5 Fármacos.....	50
3.2 MÉTODOS.....	51
3.2.1 Ensayos de viabilidad celular.....	51
3.2.2 Mutagénesis dirigida por PCR.....	51



3.2.3 Construcción de pGST-LckSH3, pGST-LckSH2 y pGSTLckSH3SH2.....	53
3.2.4 Análisis de secuencias.....	54
3.2.5 Obtención de ADN plasmídico.....	54
3.2.6 Transfecciones.....	55
3.2.7 <i>Western-Blot</i>	55
3.2.8 Ensayo de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> : <i>pull-down</i>	56
3.2.9 Citometría de flujo.....	57
3.2.10 Inmunofluorescencia.....	58
3.2.11 Análisis de la formación del anillo de actina mediada por TCR.....	59
3.2.12 Microscopía de fluorescencia.....	59
3.2.13 Producción de aislados virales.....	59
3.2.14 Cuantificación de aislados virales.....	59
3.2.15 Ensayo de infectividad.....	60
3.2.16 Obtención de CMSP infectadas por el VIH-1 en estado de reposo.....	60
3.2.17 Ensayo de proliferación celular.....	61
3.2.18 Inducción de la activación del LTR viral en astrocitos.....	61
3.2.19 Análisis de translocación de NF- κ B a núcleo en astrocitos.....	61
3.2.20 Reactivación del VIH-1 latente en linfocitos T CD4 procedentes de individuos VIH+ en tratamiento antirretroviral.....	62
3.2.21 Representación de los resultados y análisis estadístico.....	62
4. Resultados.....	63
4.1 Sección 1: LA PROTEÍNA NEF DEL VIH-1 COMO DIANA TERAPÉUTICA.....	65
4.1.1 Identificación del motivo PGPG en la proteína Nef del VIH-1.....	67
4.1.2 El dominio PGPG está implicado en la disminución de la expresión en superficie de CD4 mediada por Nef en linfocitos T...69	
4.1.3 La dependencia del motivo PGPG para la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef está relacionada con la expresión de Lck.....	74
4.1.4 Las mutaciones en los aminoácidos centrales del dominio PGPG no afectan a las funciones dependientes del motivo di-leucina de Nef.....	79
4.1.5 El motivo PGPG es necesario para la interacción entre Nef y el dominio SH2 de Lck.....	83
4.1.6 El motivo PGPG está implicado en el reclutamiento intracelular de Lck.....	85



4.1.7 Papel del motivo PGPG en funciones dependientes del dominio PxxP: inhibición de la reorganización de actina tras la inducción del TCR y disminución de la expresión en superficie del CMH-I....	88
4.1.8 El motivo PGPG es necesario para la mejora de la infectividad viral mediada por Nef mediante un mecanismo dependiente de la expresión de Lck.....	91
4.2. Sección 2: LA BRIOSTATINA-1 COMO FÁRMACO ANTI-LATENCIA.....	93
4.2.1 Efectos de la briostatina-1 en combinación con maraviroc y Atripla® en la reactivación del LTR del VIH-1.....	95
4.2.2 Efectos de la briostatina-1 en combinación con maraviroc y Atripla® en la expresión del receptor CD4 y de los correceptores CXCR4 y CCR5.....	97
4.2.3 Reactivación de la latencia viral mediada por briostatina-1 sola y en combinación con maraviroc y Atripla®.....	99
4.2.4 La combinación de briostatina-1 con maraviroc y Atripla® no interfiere en el efecto antiviral de los compuestos.....	102
4.2.5 Inhibición de la infección del virus reactivado.....	104
4.2.6 Efectos de la briostatina-1 combinada con maraviroc y Atripla® en el fenotipo de CMSP y linfocitos T CD4.....	109
4.2.7 Efecto de la briostatina-1 en la activación viral en astrocitos y mecanismo de acción.....	113
4.2.8 Reactivación viral en linfocitos T CD4 procedentes de individuos VIH-1+ con viremia suprimida.....	118
5. Discusión.....	119
5.1 EL MOTIVO PGPG DE LA PROTEÍNA NEF DEL VIH-1 COMO POSIBLE NUEVA DIANA TERAPÉUTICA.....	121
5.2 LA BRIOSTATINA-1 COMBINADA CON MARAVIROC Y/O ATRIPLA® COMO FÁRMACO ANTI-LATENCIA.....	124
6. Conclusiones.....	129
7. Referencias.....	133
8. Publicaciones.....	159

Abreviaturas



Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura castellana, en aquellos casos en los que existe, y la inglesa para el resto de los casos. Muchos de los acrónimos corresponden a palabras del inglés.

~0-9~

7AAD: 7-aminoactinomicina-D.

~A~

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Ad5: adenovirus 5.

Ac: anticuerpo.

Ag: antígeno.

AIDS: del inglés *acquired immunodeficiency syndrome*.

AKT: proteína codificada por el gen *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*.

También conocida como *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*, como PKB (*protein kinase B*) o por ambos nombres Akt/PKB.

Amp: ampicilina.

AP1: del inglés *activator protein 1*.

AP-1/2/3: del inglés *adaptor protein 1/2/3*.

APC: del inglés *allophycocyanin*.

AR: antirretroviral.

ARF1: del inglés *ADP-ribosylation factor 1*.

ARN: ácido ribodesoxirribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNpol II: Polimerasa II de ARN.

ASFV: del inglés *african swine fever virus*.

ATP: Atripla®.

ATP: del inglés *adenylpyrophosphate*.



~B~

BRIO: briostatina-1.

BCA: del inglés *bicinchoninic acid*.

BSA: del inglés *bovine serum albumin*.

BHE: barrera hematoencefálica.

b-COP: del inglés *coatomer subunit b*.

BrdU: bromodeoxiuridina.

~C~

CA: cápside viral.

Cat: catálogo.

CD: del inglés *cluster of differentiation*. Extensivo para las abreviaturas **CD3**, **CD4**, **CD8**, **CD25**, **CD28**, **CD38** y **CD69**.

CHP: células hematopoyéticas precursoras.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

CMH-I/-II: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I/II.

Ct: control.

CV: carga viral.

Cy: del inglés *cyanine*.

CCR5: del inglés *chemokine (C-C motif) receptor 5*.

CXCR4: del inglés *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*.

c-Raf1: del inglés *rapidly accelerated fibrosarcoma protein 1*.

CRF: del inglés *circulating recombinant forms*.

CROI: del inglés *Conference On Retroviruses And Opportunistic Infections*.

~D~

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

DMSO: dimetil sulfoxido.



~E~

ECD: del inglés *energy coupled dye*.

EDTA: del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*.

EFV: efavirenz.

EGFP: del inglés *enhanced GFP*.

ELISA: del inglés *enzyme-linked immuno sorbent assay*.

env: gen que codifica para la proteína de la envuelta (Env) del VIH-1.

E. coli: *Escherichia coli*.

~F~

FasL: del inglés *Fas ligand*.

FBS: del inglés *fetal bovine serum*.

FITC: fluoresceína 5-isotiocianato.

FDA: del inglés *food and drug administration*.

FTC: emtricitabina.

Fyn: proteína codificada por el gen *tyrosine-protein kinase Fyn proto-oncogene*.

FW: del inglés *forward*.

~G~

gag: del inglés *group-specific antigen*. Gen que codifica para la poliproteína estructural Gag del VIH-1.

gp: glicoproteína.

GFP: del inglés *green fluorescent protein*.

GST: glutatión S-transferasa.

~H~

HA: hemaglutinina.

Hck: del inglés *hemopoietic cell kinase*.

HEK293: del inglés *human embryonic kidney cells 293*.



HDAC: histona deacetilasa.

HDF: del inglés *host dependency factor*.

HEXIM: del inglés *hexamethylene bis-acetamide inducible 1*.

HLA-DR: del inglés *human leukocyte antigens*.

HMBA: del inglés *10-[(3-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)]-9(10H)-anthracenome*.

HMT: histona metiltransferasa.

HRP: del inglés *horseradish peroxidase*.

HTLV1/2: del inglés *human T-lymphotropic virus*.

~I~

iMFI: del inglés *integrated MFI*.

IAT: del inglés *immune activation therapy*.

IC: del inglés *inhibitory concentration*.

IF: inhibidores de fosfatasa.

IFN: interferón.

iHDAC: inhibidores de HDAC.

iHMT: inhibidores de HMT.

IκBα: del inglés *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*.

IL: interleuquina. Extensivo para **IL-2**, **IL-4**, **IL-7**, **IL-15** e **IL-1β**.

IL-R2: del inglés *interleukin receptor 2*.

IN: integrasa viral.

IP: inhibidores de la proteasa viral.

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido.

ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido.

~K~

kb: kilobases.

kDa: kiloDalton.



~L~

LAT: del inglés *linker for activation of T cells*.

LB: del inglés *lysogeny broth*, también conocido como medio Luria-Bertani.

Lck: del inglés *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*.

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LTC: linfocito T citotóxico.

LTNP: del inglés *long term non progressor*.

LTR: del inglés *long terminal repeat*.

Luc: luciferasa.

Lyn: proteína codificada por el gen *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*.

~M~

MA: matriz viral.

MAPK1: del inglés *mitogen-activated protein kinase 1*.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.

MFI: del inglés *mean fluorescence intensity*.

MVC: maraviroc.

MEK9/27: del inglés *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 9/27*.

~N~

NC: nucleocápside viral.

nef: del inglés *negative regulatory factor*. Gen que codifica para la proteína accesoria Nef del VIH-1.

NIAID: del inglés *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*.

NIH: del inglés *National Institutes of Health*.

NFAT: del inglés *nuclear factor of activated T-cells*.

NF- κ B: del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NP: del inglés *normal progressor*.

nt: nucleótido.

NZF: del inglés *nuclease zinc finger*.



~O~

OMS: Organización Mundial de la Salud.

~P~

p-TEFb: del inglés *positive transcription elongation factor b*.

PACS-1: del inglés *phosphofurin acidic cluster sorting protein 1*.

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*.

PC5: PE-Cy5.

PC7: PE Cy7.

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*.

PD-1: del inglés *programmed cell death protein 1*.

PE: del inglés *phycoerythrin*.

PFA: paraformaldehído.

PHA: del inglés *phytohaemagglutinin*.

PI3K: del inglés *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*.

PKC: del inglés *protein Kinase C*.

PLC: del inglés *phospholipase C*.

PM: peso molecular.

PMSF: del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*.

PVDF: del inglés *polyvinylidene fluoride*.

PKC: del inglés *protein kinase C*.

pol: del inglés *DNA polimerase*. Gen que codifica para la poliproteína polimerasa (Pol) del VIH-1.

PR: proteasa viral.

pr: poliproteína.

PTEN: del inglés *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*.



~R~

RAL: *raltegravir*.

rev: del inglés *regulator of expression of virion proteins*. Gen que codifica para la proteína Rev del VIH-1.

RP: del inglés *rapid progressor*.

rpm: revoluciones por minuto.

RPMI: medio *Roswell Park Memorial Institute*.

RV: del inglés *reverse*.

~S~

SAHA: del inglés *suberanilohydroxamic acid*. También conocido como vorinostato.

SDF-1: del inglés *stromal derived growth factor 1*.

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

SEM: del inglés *standard error of the mean*.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNC: sistema nervioso central.

SU: superficie.

SV: sinapsis virológica.

Src: proteína codificada por *v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*.

~T~

tat: del inglés *trans-activator of transcription*. Gen que codifica para la proteína Tat del VIH-1.

TAR: terapia o tratamiento antirretroviral.

TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad.

T_{CM}: linfocito T central-memoria.

TCR: del inglés *T cell receptor*.

T_{EM}: linfocito T efector-memoria.

Tf: transferrina.



Tf-R: del inglés *transferrin receptor*.

TFV: tenofovir.

TGF: del inglés *transforming growth factor*.

TGN: del inglés *trans-golgi network*.

TI: transcriptasa inversa viral.

TM: transmembrana.

TNF: del inglés *tumor necrosis factor*.

TRITC: del inglés *tetramethylrhodamine*.

T_{TM}: linfocito T transición-memoria.

Tyr: tirosina.

~U~

UNAIDS: del inglés *United Nations Programme on HIV/AIDS*.

~V~

VIH: subunidad H de la ATPasa V de membrana.

Vac: vacuna.

vif: del inglés *viral infectivity factor*. Gen que codifica para la proteína accesoria Vif del VIH-1.

VIH-1/2: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1/2.

VIS: virus de la inmunodeficiencia en simios.

Vpr: del inglés *viral protein R*. Gen que codifica para la proteína accesoria Vpr del VIH-1.

Vpu: del inglés *viral protein unique*. Gen que codifica para la proteína accesoria Vpu del VIH-1.

~W~

WT: del inglés *wild type*.

~Z~

ZAP-70: del inglés *zeta-chain-associated protein kinase 70*.

1. Introducción



1.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus ARN clasificado dentro de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) que pertenece al género *Lentivirus*. El VIH puede ser de tipo 1 o 2, siendo el VIH-1 más virulento que el VIH-2, con el que comparte un 40% de homología a nivel de secuencia ARN. Según el grado de homología de sus secuencias, los distintos aislados del VIH-1 se clasifican en cuatro grandes grupos, representando cada uno una transmisión independiente del virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV) a humanos (Sharp y Hahn, 2011): M (*Main* o principal), O (*Outlier* o externo), N (no-M, no-O) y P (descrito como procedente del gorila por Plantier y col. (2009)). La mayoría de los aislados del VIH-1 pertenecen al grupo M, ya que es responsable del 97% de las infecciones a nivel mundial. Se distinguen dentro de él hasta 9 subtipos (denominados A-D, F-H, J, K) y más de 30 formas recombinantes circulantes (CRF).

El VIH es el agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Gottlieb y col., 1981; Barre-Sinoussi y col., 1983). El SIDA es la manifestación clínica de múltiples y severas infecciones de patógenos oportunistas que concurren durante el deterioro progresivo de la respuesta inmune del hospedador debido principalmente, al descenso del número de linfocitos T CD4 durante la infección y a la propagación del VIH. Según el último informe *UNAIDS Global Report 2013*, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a finales del año 2012 había en el mundo 35,3 millones de personas infectadas por el VIH, produciéndose en ese mismo año 2,3 millones de nuevas infecciones y 1,6 millones de fallecimientos por causas relacionadas con el SIDA.

1.1.1 Estructura y genoma del VIH-1

La partícula viral tiene forma esférica y mide entre 80 y 120 nm de diámetro. Está envuelta por una bicapa lipídica de origen celular en la que se encuentran embebidas las glicoproteínas virales gp41 (transmembrana, TM) y gp120 (superficie, SU) (Turner y Summers, 1999). La cápside (CA) consta de 60 subunidades triangulares formadas por la proteína estructural p24, y dentro de la misma se encuentra la nucleocápside (NC), constituida por la proteína p7, que contiene el genoma viral (**figura 1A**). El genoma viral está formado por dos copias idénticas de 9,8 kb de ARN de hebra sencilla con polaridad positiva y codifica para 9 genes: *gag*, *pol*, y *env* comunes al resto de retrovirus; *tat* y *rev*, esenciales para la replicación viral y los llamados genes “auxiliares” o “accesorios”, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* principalmente con funciones de modulación de la respuesta inmune del hospedador (Haseltine, 1991; Frankel y Young, 1998). En cada extremo posee dos repeticiones terminales largas o LTR (*Long Terminal Repeat*), que se comportan como



promotores transcripcionales y además están implicados en la integración del genoma viral en el ADN celular (**figura 1B**). Los genes *tat*, *rev* y *nef* se transcriben y expresan tempranamente en el ciclo de replicación viral. Estas proteínas controlan, entre otros aspectos, la transcripción, el procesamiento del ARN, el ensamblaje del virión y la expresión de genes de la célula hospedadora.

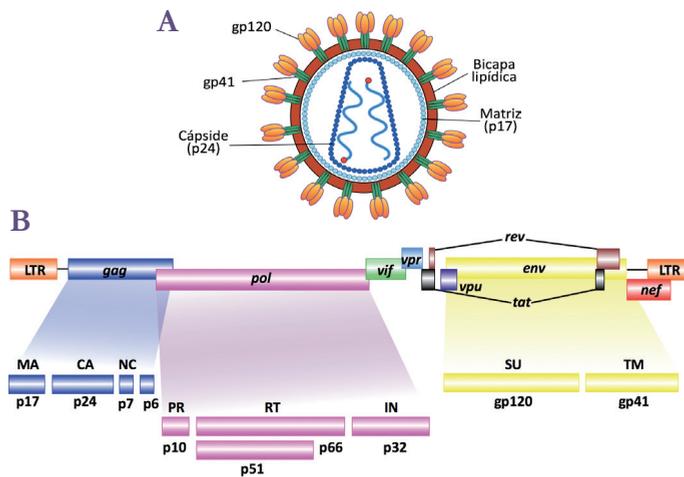


Figura 1. Estructura del VIH-1. A) Morfología del virión. **B)** Organización del genoma. MA, matriz; CA, cápside; NC, nucleocápside; PR, proteasa; TI, transcriptasa inversa; IN, integrasa; SU, superficie; TM, transmembrana. Adaptada de www.stanford.edu.

1.1.2 Ciclo replicativo del VIH-1

La célula diana por excelencia del VIH-1 es el linfocito T CD4 (Sattentau, 1988), que se infecta en los órganos linfoides y en las mucosas de las regiones de entrada viral. El receptor viral CD4 se expresa también en los precursores de células T dentro de la médula ósea y el timo, en monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, células T reguladoras y células de la microglía del sistema nervioso central (SNC), hecho que hace a todos estos tipos celulares susceptibles a la infección por el VIH-1 (Sattentau y Weiss, 1988).

El ciclo del VIH-1, representado en la **figura 2**, se puede dividir en dos etapas bien diferenciadas: la fase temprana, que culmina con la integración del ADN viral en el genoma de la célula y la fase tardía, que incluye la transcripción del genoma viral, la síntesis y procesamiento de sus proteínas, ensamblaje y generación de nuevas partículas virales infectivas (Greene y Peterlin, 2002).



a) Fase temprana. Se divide en las siguientes etapas: 1) entrada del virus en la célula diana a través de la fusión de membranas que se da tras la unión de la gp120 del VIH-1 al receptor celular CD4 y a un receptor de quimiocinas, CCR5 o CXCR4 principalmente; 2) liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción inversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa viral; 4) transporte del ADN al núcleo celular y 5) integración en el genoma de la célula hospedadora mediante las secuencias LTR, por la acción de la enzima integrasa viral.

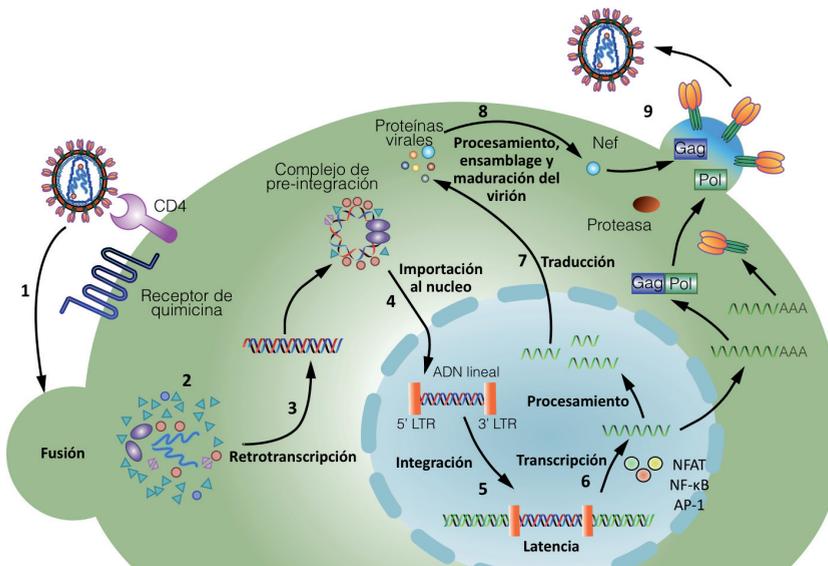


Figura 2. Ciclo replicativo del VIH-1. Adaptada de Engelman y Cherepanov (2012).

b) Fase tardía. Engloba los procesos implicados en la replicación viral, que son: 6) transcripción de los genes provirales, cuya iniciación está principalmente mediada por el factor de transcripción NF-κB; 7) procesamiento de los transcritos primarios y traducción de los ARNm para dar lugar a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 8) ensamblaje de las proteínas virales; 9) maduración del virión infeccioso y salida de la célula por gemación.

A partir del estado de integración, el VIH-1 puede adoptar diversos comportamientos: permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada.

La duración de un ciclo vital del VIH-1 en condiciones *in vivo* está estimada entre 1 y 2 días (Perelson y col., 1996).



1.1.3 Curso natural de la infección por el VIH-1

Las vías de transmisión del VIH-1 se clasifican en:

- a) **parenteral:** la sangre, al contener virus circulante, constituye un vehículo de gran efectividad para transmitir el VIH-1 de una persona infectada a otra que no lo está;
- b) **sexual:** las relaciones sexuales sin protección con una persona infectada por el VIH-1 son uno de los principales mecanismos de transmisión a nivel mundial; y
- c) **vertical o perinatal:** donde la transmisión de VIH-1 de madre a hijo puede ocurrir durante el embarazo, en el parto o a través de la lactancia.

Tras la entrada del VIH-1 al organismo se inicia un proceso de infección en el que tiene lugar una fuerte interacción virus-hospedador, pudiéndose diferenciar tres fases: aguda o primo-infección, crónica y SIDA (**figura 3**).

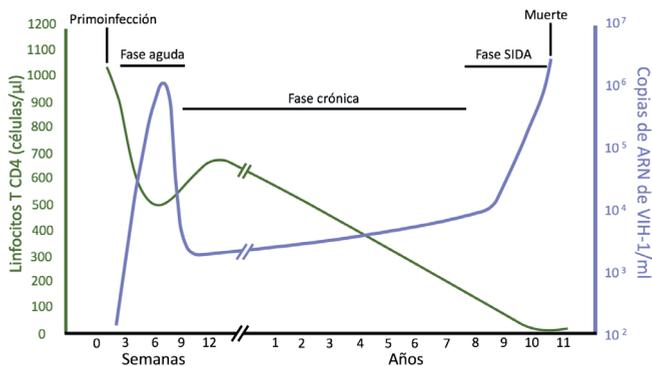


Figura 3. Curso natural de la infección por el VIH-1. Adaptada de Rowland-Jones (2003).

a) **Fase aguda.** Se caracteriza por valores altos de viremia plasmática, que alcanza su valor más alto a las dos semanas (Kahn y Walker, 1998) y por un descenso el número de células T CD4 (Henrard y col., 1995). La disminución de la carga viral (CV) está asociada con la aparición de la respuesta mediada por linfocitos T CD8 citotóxicos (LTC) específicos para el VIH-1, que son capaces de controlar parcialmente la replicación viral permitiendo una recuperación parcial del número de linfocitos T CD4 (Borrow y col., 1994; Ogg y col., 1998). La aparición de anticuerpos específicos frente al VIH-1 generalmente se detecta entre la semana 3 y la 12 tras la infección, marcando el final de la seroconversión (Busch y Satten, 1997).



b) Fase crónica. Tras la fase aguda, la viremia plasmática disminuye hasta alcanzar un valor estable, el cual persistirá hasta fases muy avanzadas de la infección. El resultado de la interacción entre los factores virales e inmunológicos del individuo infectado, determina la velocidad de progresión de la enfermedad (Bruisten y col., 1997). Durante toda la fase crónica, entre 10 y 15 años de duración, existe una eliminación persistente de los linfocitos T CD4, debido fundamentalmente a la apoptosis inducida por mecanismos relacionados con la hiperactivación del sistema inmunológico (Li y col., 2005). La recuperación homeostática de linfocitos T CD4 es insuficiente para compensar esta pérdida, lo que resulta en una disminución paulatina de los valores de linfocitos T CD4 en sangre periférica y en órganos linfoides. Además, la aparición de variantes virales de escape, más virulentas a medida que progresa la infección, acelera la destrucción del sistema inmunológico.

c) Fase SIDA. El estadio más avanzado de la infección se caracteriza por un incremento persistente de la viremia y por una profunda inmunosupresión reflejada en valores de células T CD4 < 200 células/μl en sangre, lo que conlleva a la aparición de enfermedades oportunistas y neoplasias que definen el SIDA (Douek, 2003). El deterioro inmunológico permite la aparición de diversas infecciones (clásicas y oportunistas) y tumores, alcanzando la fase más avanzada de la enfermedad, el SIDA, y la muerte en un tiempo variable de no mediar tratamiento antirretroviral (TAR) (Mellors y col., 1997).

Los individuos VIH-1 positivos se pueden clasificar en tres grupos o cohortes principales dependiendo de su velocidad de progresión a SIDA. Los individuos de progresión rápida o rápidos progresores (RP) presentan una viremia elevada, un rápido descenso del número de células T CD4 y una progresión a SIDA entre 2-3 años desde la primo-infección (Khanlou y col., 1997). Los individuos de progresión normal (NP) presentan valores normales de células T CD4 tras la infección y un deterioro gradual de su sistema inmune concomitante con el aumento de la viremia en un periodo de 10-15 años. Finalmente, los individuos no progresores a largo plazo (LTNP), aproximadamente el 5% de los individuos seropositivos, presentan valores estables de células T CD4 (>500 células/μl) y una viremia prácticamente indetectable. Además, estos individuos se caracterizan, por una esperanza de vida muy prolongada desde la primo-infección (>20 años) y la inexistencia de la sintomatología inmunológica y clínica propia del SIDA en ausencia de TAR (Cao y col., 1995).



1.1.4 Establecimiento de reservorios virales

Un reservorio viral es un tipo de célula o sitio anatómico donde una forma competente para la replicación del VIH se puede acumular y persistir de forma estable. Para que se denomine reservorio debe cumplir dos requisitos fundamentales: que conserve virus con potencial replicativo para que pueda contribuir en la reposición de la población de células infectadas en el futuro y que posea una estabilidad en el tiempo, de forma que los virus puedan persistir ya sea como viriones libres o en las células infectadas. Un depósito puede ser clasificado como latente si las células infectadas no están produciendo virus pero conservan la capacidad para hacerlo (Saksena y col., 2010).

En el ciclo replicativo del VIH-1 se pueden diferenciar dos tipos de latencia viral. La primera es la latencia de pre-integración o pre-integrativa, caracterizada por la generación de diferentes formas de ADN viral antes de la integración, que predomina en las células T CD4 *naive* de individuos infectados por el VIH-1 y no tratados (Zack y col., 1990; Pierson y col., 2002). La segunda es la latencia de post-integración o post-integrativa, en la que se da una falta de replicación después de la integración del ADN viral en el genoma celular (Chun y col., 1995), que predomina en las células T CD4 memoria, garantizándose así la persistencia del virus a largo plazo. Este tipo de latencia se establece durante la primoinfección (Chun y col., 1998). También otras células, como los monocitos/macrófagos (Zhu y col., 2002), las células dendríticas de los nódulos linfáticos (Smith y col., 2001; Keele y col., 2008) y células del SNC como los astrocitos (Tornatore y col., 1994) y la microglía (He y col., 1997), pueden servir como reservorios virales.

Una vez que el provirus se integra en el genoma de la célula, el establecimiento de la latencia está determinado por numerosos mecanismos implicados en la transcripción del genoma, como pueden ser la falta de factores de transcripción o la difícil accesibilidad de los mismos a las zonas de inicio de la transcripción debido a la modificación de las histonas o a la metilación del ADN. Bajo determinadas condiciones, estas modificaciones epigenéticas son susceptibles de reversión provocando la replicación competente de los provirus integrados (Finzi y col., 1999; Richman y col., 2009). Debido a su larga vida media y a la proliferación homeostática de los mismas, los linfocitos T CD4 memoria infectados son los que contribuyen en mayor medida a la constitución del reservorio viral. Además, bajo condiciones de activación transitoria, a pesar de la muerte celular por apoptosis, algunas células se convierten en fuente de nuevas infecciones, bien por producción de partículas virales libres o bien por transmisión célula-célula (**figura 4**) (Chun y col., 1997b; Siliciano y col., 2003). Por tanto, aunque sólo una pequeña proporción de células T, aproximadamente una por cada millón de células, están



latentemente infectadas, constituyen un reservorio viral estable que puede ser reactivado y provocar un rebote de la viremia o CV (Chun y col., 1999a; Davey y col., 1999).

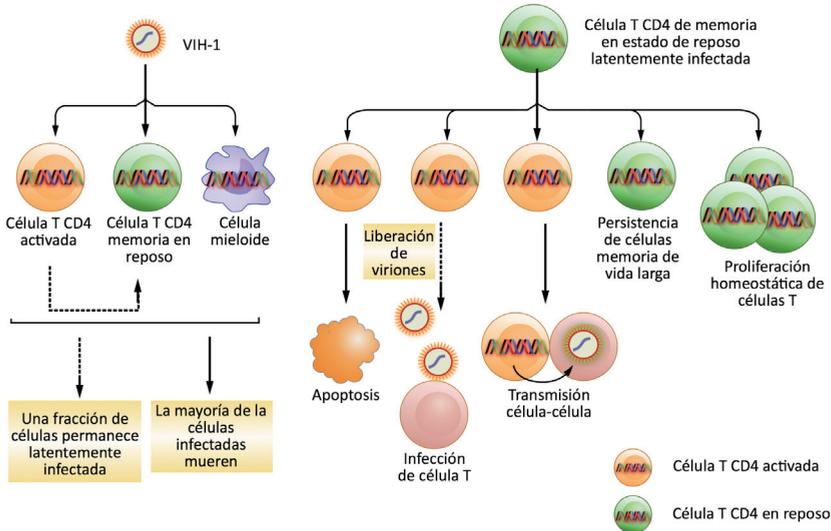


Figura 4. Establecimiento de la infección latente. Adaptada de Deeks y col. (2012).

En la **figura 5** se muestra un diagrama con la dinámica de la latencia viral en linfocitos T. Básicamente, los linfocitos T *naïve* se activan tras una estimulación antigénica y se vuelven susceptibles a la infección por el VIH-1. La mayor parte de las células infectadas mueren, pero una pequeña parte se convierte en linfocitos T central-memoria (T_{CM}) para el antígeno al que han sido expuestos. La estimulación antigénica de los T_{CM} produce su activación y transformación en linfocitos T memoria-efectores (T_{EM}). Su estado metabólicamente activo conduce a la reactivación del provirus latente integrado que contribuye finalmente al repunte de la viremia. La mayoría de los linfocitos T mueren debido a la toxicidad de la producción viral, pero una pequeña fracción consigue diferenciarse en T_{CM} específicos de antígeno y rellenan el reservorio. La proliferación homeostática del VIH-1 inducida por la producción de IL-7 e IL-15 provocan la diferenciación de los T_{CM} en linfocitos T memoria de transición (T_{TM}) parcialmente activados, lo cual favorece la reactivación parcial del VIH-1 latente (Tyagi y Bukrinsky, 2012). Hasta la fecha, los reservorios celulares virales representan una barrera fundamental para la erradicación del virus y para el desarrollo de una respuesta inmune antiviral eficaz (Katlama y col., 2013). Actualmente se están desarrollando nuevas terapias dirigidas a la erradicación de estos reservorios celulares virales y algunas de ellas se detallarán en el apartado 1.2.

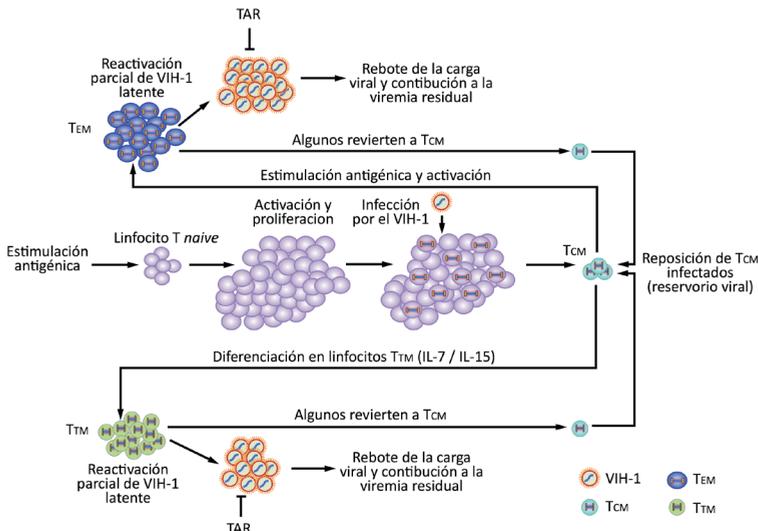


Figura 5. Dinámica de los linfocitos T latentemente infectados. T_{CM}, linfocito T central-memoria; T_{EM}, linfocito T memoria-efector; T_{TM}, linfocito T memoria-transitoria. Adaptada de Tyagi y Bukrinsky (2012).

1.1.5 El sistema nervioso central como reservorio anatómico del VIH-1

Un gran número de compartimentos anatómicos pueden actuar como reservorios virales, incluyendo el tejido linfoide, el tracto gastrointestinal, el SNC, el tracto genital y el pulmón (Chun y col., 1997a). El SNC está protegido por la barrera hematoencefálica (BHE), que lo separa de la sangre circulante limitando el paso de moléculas y células. Esta compartimentalización del SNC da lugar a un entorno protegido tanto del sistema inmunológico como de la penetración efectiva de fármacos, sirviendo así como sitios potenciales de replicación persistente del VIH-1 (Saksena y Potter, 2003).

La neuropatología asociada a la infección por el VIH-1 se caracteriza por la infiltración de macrófagos en el SNC, la formación de nódulos microgliales y células gigantes multinucleadas, la activación y deterioro de los astrocitos y la pérdida neuronal (Gendelman y col., 1994). Los principales síntomas clínicos incluyen alteración de la memoria a corto plazo, disminución de la capacidad de concentración mental, debilidad en las piernas, lentitud de movimiento y depresión. Estos síntomas suelen ir acompañados con cambios de personalidad, apatía y aislamiento social. Al conjunto de los síntomas neurológicos y psiquiátricos causados por la neuroinvasión del VIH-1 se le conoce como “complejo de demencia de SIDA” o “demencia asociada al VIH-1” (Janssen y col., 1992; Reger y col., 2002).



El VIH-1 invade el SNC en las etapas tempranas del curso de la infección utilizando diversos mecanismos de entrada (**figura 6**). El principal mecanismo se conoce como la hipótesis del “Caballo de Troya” (Peluso y col., 1985; Haase, 1986). De acuerdo con este modelo, el VIH-1, al igual que otros lentivirus, entra en el SNC “camuflado” en células T CD4 y monocitos infectados que circulan en la sangre y atraviesan la barrera hematoencefálica, propagando así la infección. Este modelo se confirmó mediante hibridación *in situ* y análisis inmunohistoquímico, que evidenció la acumulación del VIH-1 en las regiones perivasculares (Wiley y col., 1986; Takahashi y col., 1996). Mecanismos alternativos para la neuroinvasión proponen la entrada del VIH-1 libre bien por migración entre las células endoteliales o bien por transcitosis (Bomsel, 1997; Banks y col., 2001). Aunque en el tejido nervioso la principal diana del VIH-1 son los macrófagos perivasculares y la microglía, también los astrocitos, oligodendrocitos y neuronas pueden ser susceptibles a la infección por el VIH-1 (Trillo-Pazos y col., 2003). La infección suele ser dependiente del receptor CD4 en el caso de los macrófagos y las células microgliales, pero parece ser independiente de CD4 en las neuronas y astrocitos, en los que la entrada viral parece estar mediada por correceptores como CXCR4 y CCR5, ceramidas o receptores de manosa (Kramer-Hammerle y col., 2005). Numerosos estudios *in vivo* han demostrado la presencia de ADN o proteínas virales en el interior de los astrocitos mediante técnicas de hibridación *in situ* o de PCR *in situ* (Bagasra y col., 1996).

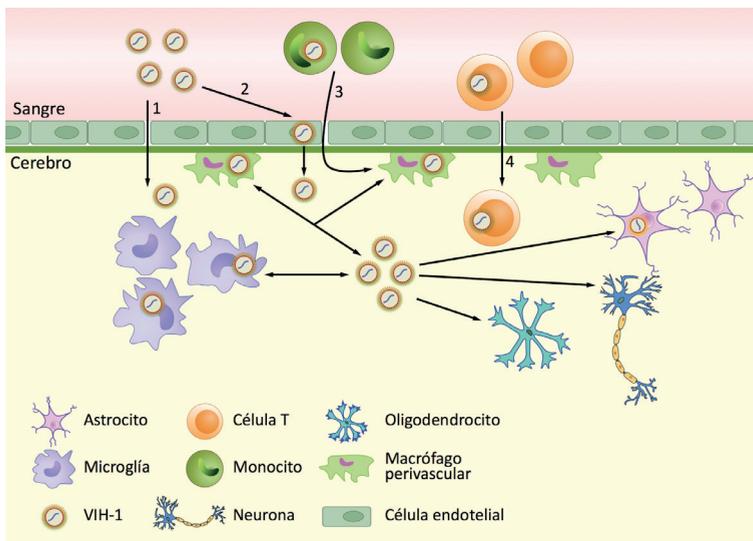


Figura 6. Mecanismos de entrada del VIH-1 en el SNC. Paso de virus entre las células epiteliales de la BHE (1) o por transcitosis (2). Paso de virus “camuflado” en monocitos (3) o linfocitos T CD4 (4) infectados que son capaces de atravesar la BHE. Adaptada de Ghafouri y col. (2006).



Además, la infección por el VIH-1 de astrocitos en cultivo se ha demostrado en al menos diez líneas celulares diferentes derivadas de astrocitoma y también en astrocitos primarios humanos (Brack-Werner, 1999). Tras la entrada del VIH-1, se establece una infección crónica con una producción viral muy limitada, predominando la expresión de componentes no estructurales del virus. A pesar de estas restricciones, los astrocitos infectados son capaces de iniciar la infección altamente productiva de VIH-1 en experimentos de co-cultivo con CMSP, por lo que contribuyen en gran medida al desarrollo de las patologías en el SNC (Muñoz-Fernández y Fresno, 1998) y les convierte en reservorios virales importantes.

1.2 TRATAMIENTOS FRENTE A LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

En el año 1987, sólo seis años después de la aparición de los primeros casos de SIDA, se aprobó el uso clínico de la zidovudina para el tratamiento de la infección por el VIH-1. A este primer fármaco antirretroviral (AR) le siguieron otros inhibidores de la TI análogos de nucleósidos o nucleótidos (ITIAN), que se utilizaron primero en monoterapia y más tarde en combinaciones dobles a lo largo del siguiente decenio. No obstante, ambas estrategias terapéuticas fracasaron debido al rápido desarrollo de mutaciones de resistencia frente a estos fármacos AR y no fue hasta el año 1996 cuando, con la adición de un inhibidor de la proteasa (IP) a una pareja de ITIAN, se logró suprimir de forma eficaz y duradera la replicación del VIH-1. Por ello, a esta combinación de fármacos AR y poco después a la formada por dos ITIAN y un inhibidor de la TI no-análogo de nucleósidos (ITINAN), se les denominó “tratamiento antirretroviral de gran actividad” o TARGA, al que en adelante se le nombrará simplemente tratamiento antirretroviral (TAR).

Hoy en día existen fármacos AR específicos para el VIH-1 que inhiben diferentes etapas de su ciclo viral como, por ejemplo, la fusión, la transcripción inversa, la integración o la maduración proteolítica.

1.2.1 Terapia antirretroviral de gran actividad

Esta terapia consiste en la combinación de tres o más fármacos AR pertenecientes a dos o más subfamilias distintas. En la actualidad existen más de 25 fármacos AR para el tratamiento de la infección por el VIH-1 (De Clercq, 2009). La mayor parte de ellos tienen como diana la TI del VIH-1 y se dividen en dos subgrupos: ITIAN (zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina y tenofovir) e ITINAN (nevirapina, delavirdina, efavirenz y etravirina). Los IP que hay actualmente en el mercado son: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir,



atazanavir, fosamprenavir, tipranavir y darunavir. En los últimos años han aparecido nuevos fármacos AR capaces de inhibir la IN como raltegravir, elvitegravir (DeJesus y col., 2012; Sax y col., 2012) y dolutegravir (van Lunzen y col., 2012); la fusión del virus con la membrana celular como enfuvirtida; o antagonistas del correceptor CCR5 como maraviroc (Emmelkamp y Rockstroh, 2007). Además, los estudios pre-clínicos de tres nuevos fármacos han sido presentados en la conferencia sobre retrovirus y enfermedades oportunistas (CROI) que tuvo lugar en Boston en marzo de 2014: el BMS663068, pro-fármaco que da lugar al primer inhibidor de la unión CD4-gp120; el MK-1439, un nuevo ITIAN; o el GSK744, nuevo compuesto inhibidor de la IN (Spreen y col., 2013). La selección de una pauta terapéutica inicial tiene consecuencias a largo plazo sobre los tratamientos futuros y debe ser personalizada para cada individuo infectado. Siguiendo las guías terapéuticas, el inicio de tratamiento en individuos que no presentan resistencia viral suele consistir en la combinación de 2 ITIAN y un tercer AR altamente eficaz de otra familia (*Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*, 2013). Existen formulaciones farmacológicas en las que se asocian dos o más fármacos, como por ejemplo Atripla® que contiene tenofovir, emtricitabina y efavirenz, o Complera®, que contiene rilpivirina, tenofovir y emtricitabina, que sólo requieren la administración de un comprimido al día (Clay y col., 2008; Bernardini y Maggiolo, 2013). Los cambios de TAR deben considerarse en caso de: sustitución de una pauta que fracasa, para evitar la toxicidad o para mejorar el cumplimiento o la adherencia al tratamiento.

El TAR tiene como objetivo principal la reducción de la CV en plasma y el aumento de los linfocitos T CD4, ralentizando la progresión de la infección y, por tanto, incrementando la esperanza de vida de los individuos VIH-1 positivos. Sin embargo, el TAR no está exento de problemas. Principalmente, el empleo de varios fármacos aumenta los efectos secundarios y, sobre todo, no consigue eliminar los reservorios virales (Autran y col., 1997; Richman y col., 2009), por lo que los individuos infectados necesitan tomar dicha medicación de por vida. Además, debido a la alta tasa de replicación del VIH-1 y a la elevada frecuencia de mutaciones, es altamente probable la aparición de resistencias a los fármacos AR.



1.2.2 Estrategias de erradicación del VIH-1

Puesto que el TAR actúa sobre virus replicativos, los provirus integrados latentemente son capaces de escapar del efecto de estos fármacos, por lo que, a pesar de que el TAR controla de forma eficaz la viremia o CV en la mayoría de los individuos VIH-1 positivos, todavía no ha sido posible curar esta infección. En la actualidad existen dos grandes áreas de investigación volcadas en esta línea. La primera persigue una **cura funcional**; es decir, conseguir una situación de CV indetectable prolongada en el tiempo sin necesidad de TAR. Situaciones de cura funcional se dan espontáneamente en los individuos infectados denominados controladores de élite, quienes consiguen controlar la replicación del VIH-1 sin necesidad de TAR, y también se consiguen en algunos sujetos que inicien el TAR durante la infección aguda y que, tras retirarles el tratamiento permanecen durante años con la viremia controlada, como los denominados controladores post-tratamiento.

La segunda estrategia pretende alcanzar una **cura esterilizante**, lo que supone una completa eliminación del virus competentemente replicativo. Probablemente, el paciente infectado por el VIH-1 conocido como paciente de Berlín (Hutter y col., 2009) sea el primer caso en el que se ha dado la completa eliminación del VIH-1, ya que, hasta la fecha, se mantiene con viremia indetectable en ausencia de TAR cinco años después de haberse sometido a un trasplante de médula ósea de un donante homocigoto para la mutación defectiva $\Delta 32$ en el gen CCR5, causada por eliminación de los primeros 32 residuos del correceptor (Allers y col., 2011; Symons y col., 2014).

El objetivo de numerosos estudios es alcanzar la cura esterilizante, centrándose en el reservorio viral latente para erradicar el VIH-1. Las principales estrategias llevadas a cabo hasta ahora se detallan a continuación.

a) Intensificación del tratamiento antirretroviral. Ya que el TAR no logra parar completamente la replicación del VIH-1 ni las nuevas infecciones de las células diana, en principio la intensificación del TAR podría ayudar a reducir el tamaño del reservorio viral. Hasta la fecha, los ensayos clínicos realizados siguiendo esta premisa no han sido muy prometedores, ya que ni la intensificación con raltegravir ni con maraviroc han sido capaces de reducir el ADN proviral o la viremia residual (Gutierrez y col., 2011; Llibre y col., 2012; Vallejo y col., 2012; Gutierrez y col., 2013). Probablemente, este fracaso sea debido a la poca penetración de los fármacos a través de las barreras anatómicas, como los órganos linfoides o el SNC.

b) Terapia génica. El caso del paciente de Berlín ha generado un amplio interés en la búsqueda de intervenciones curativas basadas en terapia celular. Puesto que realizar



trasplantes alogénicos con células madre de donantes naturalmente resistentes a la infección por el VIH-1 no es una estrategia factible, la terapia génica ha tomado especial interés como estrategia alternativa para eliminar el VIH-1 de las células infectadas o para generar células resistentes a la infección (Cannon y June, 2011). De hecho, en 2012 se llevaron a cabo algunos ensayos clínicos en fase 1 en los que se estudió el potencial efecto de diferentes enzimas con actividad nucleasa que tenían como diana secuencias de ADN que se encontraban bien en los genes que codifican para los correceptores virales (Pérez y col., 2008; Yuan y col., 2012; Didigu y col., 2014) o bien en el genoma proviral (Mussolino y col., 2011; Schiffer y col., 2012). Hasta ahora, los resultados publicados muestran que las modificaciones genéticas realizadas a través de este mecanismo son estables e inhiben la infección por el VIH-1 en modelos *in vitro* y en ratones humanizados. Los ensayos clínicos en humanos están en las primeras fases de desarrollo y, hasta ahora, estos tratamientos parecen ser seguros y no causar efectos adversos graves.

c) Reactivación de la latencia viral. El objetivo de los tratamientos de reactivación del VIH-1 es la eliminación de los reservorios virales. Para este fin es necesario estimular la producción viral mediante la activación transcripcional del provirus latente en las células infectadas. Este hecho implicaría bien la muerte de las células productoras por efecto citopático del virus o su detección y eliminación por parte del sistema inmune del huésped. Existen evidencias de que la remisión a largo plazo o la erradicación de virus residual se pueden conseguir con los enfoques clínicos conocidos como “terapia de estimulación”, o, más precisamente, la “**terapia de activación inmune**” (IAT). Esta estrategia tiene como objetivo reactivar el reservorio del virus latente a través de la activación de las células infectadas que componen este reservorio para promover la muerte celular y acelerar la eliminación de virus. Hasta la fecha se han llevado a cabo varios estudios con el fin de estimular los linfocitos T, incluyendo anticuerpos anti-CD3 (Prins y col., 1999), citoquinas como IFN- γ (Lafeuillade y col., 2001), TNF, IL-1 β , IL-2 (Chun y col., 1999b), IL-7 y mitógenos como los ésteres de forbol (Márquez y col., 2008; Katlama y col., 2013). Además, existe una gran diversidad de moléculas pequeñas con capacidad de reactivación viral como, por ejemplo, ingenoles (Warrilow y col., 2006), estatinas (prostatina y briostatina) (Kulkosky y col., 2001; Sánchez-Duffhues y col., 2011) y los análogos de 1,2-diacilglicerol (Hamer y col., 2003).

La IAT no debe inducir la activación policlonal de linfocitos T, por lo que moléculas agonistas de PKC sin capacidad tumorigénica como la prostatina o la briostatina (Kulkosky y col., 2001; Trushin y col., 2005; Sánchez-Duffhues y col., 2011), podrían cumplir claramente este criterio abriendo nuevas vías de investigación para el tratamiento de la latencia del VIH-1.



Los principales compuestos que se han utilizado como reactivadores de la infección por el VIH-1 (**figura 7**) han sido:

- **Activadores de NF- κ B.** NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción que regulan la replicación del VIH-1. Aunque estudios con algunos inductores de esta vía de señalización como la IL-2 o el anticuerpo monoclonal anti-CD3 no han tenido éxito (Kulkosky y col., 2002; Mitsuyasu y col., 2007), otros compuestos activadores de NF- κ B como las estatinas (prostatina y briostatina), han sido capaces de inducir la transcripción viral en modelos *in vitro* de latencia (del Real y col., 2004; Mehla y col., 2010; Sánchez-Duffhues y col., 2011).

- **Inhibidores de las histona-deacetilasas (iHDAC) o metiltransferasas (iHMT).** Ambos tipos de enzimas están involucradas en el silenciamiento de la cromatina, por lo que se han probado compuestos que puedan inhibir estas funciones. El primer iHDAC estudiado fue el ácido valproico (Siliciano y col., 2007) y, con los años, se han ido desarrollando compuestos más potentes, como el vorinostato (Archin y col., 2012), la romidepsina o el panobinostato (Shirakawa y col., 2013). Estos trabajos han demostrado que los iHDAC alteran la latencia del VIH-1 e inducen la expresión del VIH-1 *in vitro* en líneas celulares infectadas de forma latente, linfocitos T primarios infectados de forma latente, linfocitos T CD4 en reposo aislados de individuos VIH-1 positivos y, recientemente, *in vivo*. Hasta el momento se han descrito dos iHMT: la caetocina y el BIX-01294. Ambos han mostrado *in vitro* una inducción de la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4 en reposo procedentes de sujetos infectados avirémicos, pero los estudios realizados hasta el momento indican que no se pueden administrar de forma segura en humanos (Bouchat y col., 2012).

También se han utilizado otros compuestos como, por ejemplo, el disulfiram (activador de la vía AKT) (Xing y col., 2011) o la IL-7, citoquina implicada en la proliferación de linfocitos T CD4 *naive* y memoria (Mackall y col., 2011). Varios estudios han demostrado que la IL-7 induce la replicación *ex vivo* de VIH-1 en linfocitos T CD4 en reposo procedentes de pacientes infectados por el VIH-1 bajo TAR (Lehrman y col., 2004). Además, un ensayo clínico realizado en pacientes infectados por el VIH-1 mostró que la administración de IL-7 aumentaba el número de linfocitos T CD4 y T CD8 con un fenotipo memoria y provocaba aumentos transitorios de ARN viral en el plasma de algunos de los individuos tratados (Levy y col., 2009).

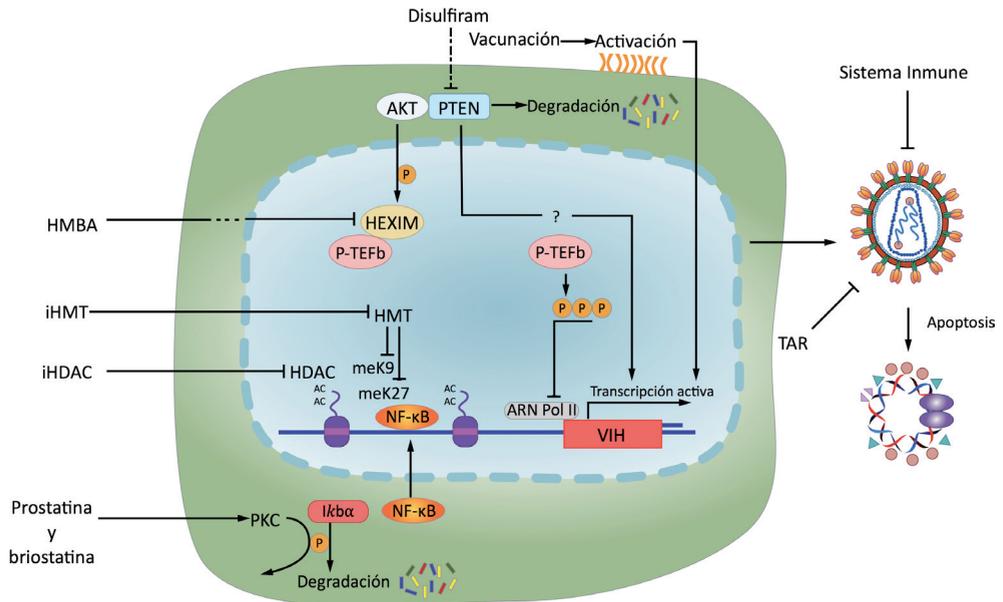


Figura 7. Mecanismos de reactivación de la latencia viral. HMBA, hexametileno bis-acetamida; iHMT, inhibidores de las metil transferasas de histona; iHDAC, inhibidores de las deacetilasas de histona; TAR, tratamiento antirretroviral. Adaptada de Barton y col. (2013).

En la **tabla 1** se resumen los principales ensayos clínicos relacionados con estrategias de cura llevadas a cabo o presentadas durante el año 2013.



Ensayo/Investigador	Estrategia	Población de estudio	Principal objetivo
Optiprim ANRS 47 (A. Cheret) NCT01033760	3 o 5 AR en la fase aguda		
IntensVIH (A. Lafeuillade) NCT00935480	Intensificación con RAL+MVC		
Eramune 01 (C. Katlama) NCT01019551	IL-7 + intensificación conRAL+MVC	29 ptes en TAR con ARN<50 cp/ml y ADN entre 10 y 1000 cp/106 CMSP	Descenso de 0,5 log de ADN a las 56 semanas
Eramune 02 (R. Murphy) NCT09976404	Vac Ad5+ intensificación con RAL+MVC	28 ptes en TAR con ARN<50 cp/ml y ADN entre 10 y 1000 cp/106 CMSP. Ac negativos para Ad5	Descenso de 0,5 log de ADN a las 56 semanas
S. Deeks NCT01286259	Disulfiram	20 ptes en TAR con ARN<50 cp/ml	Detección de replicación de VIH-1 en T CD4 en reposo
D. Margolis NCT01319383	Vorinostato (SAHA)	30 ptes con ARN<30 cp/ml	Detección de expresión de VIH-1 en T CD4 en reposo
S. Lewin NCT01365065	Vorinostato (SAHA)	20 ptes con ARN<30 cp/ml y T CD4>500/ml	Detección de pre-ARNm en T CD4 en reposo a los 28 días
L. Ostergaard NCT01680094	Panobinostato	16 ptes con viremia suprimida y T CD4>500/ml	Cambio en pre-ARNm en T CD4 en reposo desde el inicio de la intervención
J. Alezari NCT01252641	Linfocitos T CD4 autólogos modificados en el gen CCR5 por NZF SB-728-T	30 ptes con viremia suprimida y T CD4<300/ml o fracaso en TAR	Seguridad. Persistencia y activación de los linfocitos T modificados con NZF
P. Tebas NCT00842634	Linfocitos T CD4 autólogos modificados en el gen CCR5 por NZF	18 ptes con viremia suprimida o fracaso en TAR	Seguridad
A. Krishnan NCT00569985	CHP CD34+ autólogas modificadas con un gen CCR5 no funcional	10 ptes con linfoma-SIDA que van a recibir trasplante de CHP	Seguridad. Persistencia de las células transducidas
F.Maldarelli NCT01295515	Intensificación con INFα 2b	Reclutamiento en marcha	Eficacia: niveles de ARN en sangre y diversificación de secuencias
Gilead	Romidepsina		
S. Moreno	Briostatina		
H. Hatano	Anticuerpo anti-PD1		
A. Woolfrey	Células autólogas resistentes al VIH		

Tabla 1. Ensayos clínicos que persiguen la cura de la infección por el VIH-1 (año 2013). La población de estudio de todos los ensayos son pacientes crónicamente infectados por VIH-1. Abreviaturas: AR, antirretroviral; RAL, raltegravir; MVC, maraviroc; Vac Ad5, vacunación con adenovirus 5; NZF, nucleasa *zinc-finger*; CHP, células hematopoyéticas progenitoras; IFN α , interferón α ; Pte, paciente; Ac, anticuerpos; TAR, tratamiento antirretroviral; NA, no adjudicado. ARN, ARN del VIH-1; ADN, ADN del VIH-1. NCT, código del estudio obtenido de www.clinicaltrials.org. Adaptada de Van Lint y col. (2013) y Katlama y col. (2013).



1.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIH-1

A pesar del éxito del TAR y de las mejoras a su acceso durante los últimos años, la aparición de mutantes del VIH-1 resistentes a la terapia y los fracasos en el desarrollo de una vacuna profiláctica hacen necesario la **identificación de nuevas dianas terapéuticas** que puedan responder a las limitaciones de los actuales fármacos. Además, puesto que los reservorios virales representan una barrera fundamental para la cura de la infección, la **reactivación de la latencia viral** es un aspecto importante a tener en cuenta para poder alcanzar la erradicación del virus.

1.3.1 La proteína Nef del VIH-1 como diana terapéutica

El genoma del VIH-1 codifica sólo para 15 proteínas; por lo tanto, al igual que otros patógenos intracelulares, el VIH-1 necesita secuestrar y hacer uso de múltiples factores del huésped (*Host Dependency Factors*, HDF) para poder completar su ciclo replicativo y que la infección sea exitosa (Brass y col., 2008). Las proteínas accesorias del VIH-1 no poseen actividad enzimática, pero son fundamentales para reclutar la maquinaria de la célula huésped a través de su interacción con múltiples HDF. En concreto, Nef interfiere en las vías de señalización y tráfico de la célula huésped infectada mediante la interacción física con proteínas celulares específicas implicadas en estas vías, favoreciendo, en última instancia, la replicación y la propagación viral.

Nef es una proteína de aproximadamente 27 kDa, con un patrón de expresión temprana tras la infección viral. A pesar de su carácter de proteína auxiliar del VIH-1, Nef es fundamental para una óptima replicación e infectividad, así como para la elevada patogenicidad tanto *in vitro* como *in vivo* del virus (Chowers y col., 1994). De hecho, la expresión de Nef aumenta los valores de viremia plasmática en más de dos logaritmos durante la fase temprana de la infección (Kestier y col., 1991), favoreciendo de esta forma la propagación viral inicial y la aparición de SIDA en pacientes infectados (Birch y col., 2001; Carl y col., 2001). Cabe destacar la existencia de formas atenuadas del virus con mutaciones en el gen *nef* en un grupo de individuos infectados por el VIH-1 pertenecientes a la cohorte de LTNP, por lo que se ha sugerido una asociación directa entre la expresión de Nef y la tasa de progresión a SIDA (Rodes y col., 2004; Pushker y col., 2010).

La base molecular de las actividades de Nef durante el ciclo vital del VIH-1 radica en su comportamiento como proteína adaptadora, capaz de secuestrar y alterar los mecanismos y vías de señalización de la célula infectada facilitando múltiples interacciones



proteína-proteína entre el virus y la célula huésped. Por ello, Nef presenta numerosos dominios funcionales (**figura 8 y tabla 2**) distribuidos a lo largo de su estructura primaria que determinan la especificidad de sus interacciones (ver revisión en Geyer y col. (2001)). Nef presenta un sitio de miristilación en su extremo N-terminal, que le confiere su capacidad de unión a membranas celulares, particularmente enriquecidas en colesterol y glicosfingolípidos. Esta propiedad no sólo posibilita su incorporación en la partícula viral, sino que además constituye un requisito molecular para la mayoría de las funciones de Nef durante el ciclo vital del virus (Alexander y col., 2004).

De entre los múltiples sitios de interacción en la proteína Nef, cabe destacar el dominio rico en prolina (72PxxP75), que permite su interacción con el dominio SH3 de las proteínas tirosina quinasa de la familia Src (como Hck, Lck y Lyn); el motivo ácido (61EEEE64), que media la interacción con PACS-1 y el dominio di-leucina (160ExxxLL165), implicado en la interacción con los complejos adaptadores de clatrina AP-1, AP-2 y AP-3 (Geyer y Peterlin, 2001).

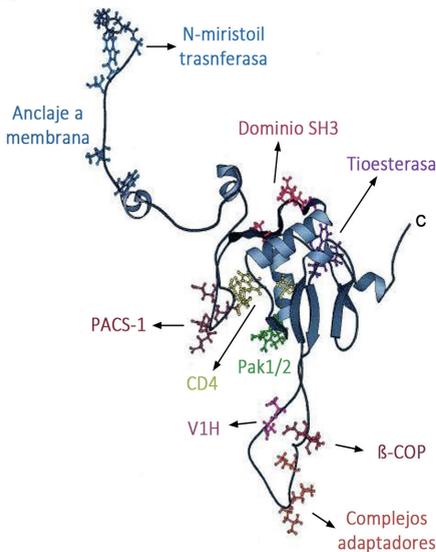


Figura 8. Localización de los dominios funcionales de Nef del VIH-1 en la estructura tridimensional de la proteína. Adaptada de Geyer y col. (2001).

Región	Proteína con la que interactúa	Referencia
Modificación de la proteína		
MGxxxH (1)	N-miristoil transferasa	Geyer y col., (1999)
CAW/LEA (55)	Proteasa viral	Freund y col., (1994)
Señalización		
PxxP (72)	Dominios SH3 de proteínas quinasa Src (Hck, Lck)	Saksela y col., (1995) Fackler y col., (1999)
RR (105)	Pak1/2	Renkema y col., (1999)
DDPxxE (174)	c-Raf1 quinasa	Hodge y col., (1998)
Tráfico		
WL (57), L (110)	Región citoplasmática de CD4	Grzesiek y col., (1996)
EEEE (61)	PACS-1	Piguet y col., (2000)
FPD (121)	Tioesterasa humana	Liu y col., (2000)
EE (154)	β-COP	Piguet y col., (1999)
ExxxLL (160)	Complejos adaptadores AP-1/2/3	Craig y col., (1998) Bresnahan y col., (1998)
DD (174)	V1H (Subunidad H de ATPasa vacuolar)	Lu y col., (1998)

Tabla 2. Dominios de la proteína Nef del VIH-1. Las posiciones de inicio de cada dominio en la secuencia de Nef del VIH-1NI4.3 están indicadas entre paréntesis. Adaptada de Geyer y col. (2001).



a) Funciones de Nef

La proteína Nef del VIH-1 desempeña una serie de actividades clave a lo largo de la replicación del VIH-1 (**figura 9**).

- Durante la **entrada viral**, en las células infectadas por el VIH-1, Nef es capaz de reducir los niveles de CD4, CXCR4 (Venzke y col., 2006) y CCR5 (Michel y col., 2005) de la superficie de la célula evitando así la superinfección (**figura 9A**) y la apoptosis celular (**figura 9C**).

En el caso de CD4, Nef induce un aumento en su tasa de internalización desde la superficie de la membrana plasmática, inhibe su ruta de reciclaje, y, al mismo tiempo, promueve su reclutamiento en endosomas tardíos previo a su degradación lisosomal. A nivel molecular, Nef interacciona y recluta activamente los complejos adaptadores de clatrina AP-1 y AP-3 del hospedador al imitar la función de la proteína Arf-1 constitutivamente activada (Craig y col., 1998; Craig y col., 2000; Janvier y col., 2003). La tasa de internalización de CD4 mediada por Nef depende del tipo celular. Por ello sólo se puede observar un aumento en la tasa de internalización en células de la línea linfóide, pero no en las mieloides (Laguette y col., 2009). Este efecto está estrictamente relacionado con la estabilización en la membrana de la molécula CD4 mediada por la proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (Lck) a través de su interacción con el fragmento citosólico de CD4 (Collette y col., 1996; Laguette y col., 2009).

- Durante la **transcripción inversa** del ARN viral se ha demostrado que Nef mejora la fidelidad de la TI, evitando la aparición de mutaciones “letales” en el genoma viral.

- En las **etapas tardías del ciclo replicativo** Nef juega un papel importante en la modificación de las rutas de tráfico vesicular, promoviendo la formación de una estructura de pre-ensamblaje viral, donde son reclutadas las proteínas estructurales del virus como Gag y Env (Qi y Aiken, 2008). Nef también está implicada en la salida de nuevos viriones a través de la sinapsis virológica (SV), posiblemente secuestrando y desviando la maquinaria implicada en la activación vía TCR hacia la formación de estructuras de contacto célula-célula para así garantizar la transmisión de viriones hacia células no infectadas (Sol-Foulon y col., 2007) (**figura 9B, C**). Además, Nef mantiene a la célula infectada oculta de la respuesta del sistema inmune del hospedador al modular los niveles de CMH-I y CMH-II de membrana (Schwartz y col., 1996). Al contrario del efecto de Nef sobre CD4, la retirada del CMH-I de la membrana plasmática únicamente implica su secuestro en las membranas del trans-golgi (TGN) sin afectar a la vida media del complejo. Para ello, la interacción de Nef con CMH-I induce un



cambio de conformación en este último que promueve el reconocimiento de una región discreta del CMH-I como motivo de tráfico reconocible por el complejo AP-1 (Roeth y col., 2004) (figura 9A).

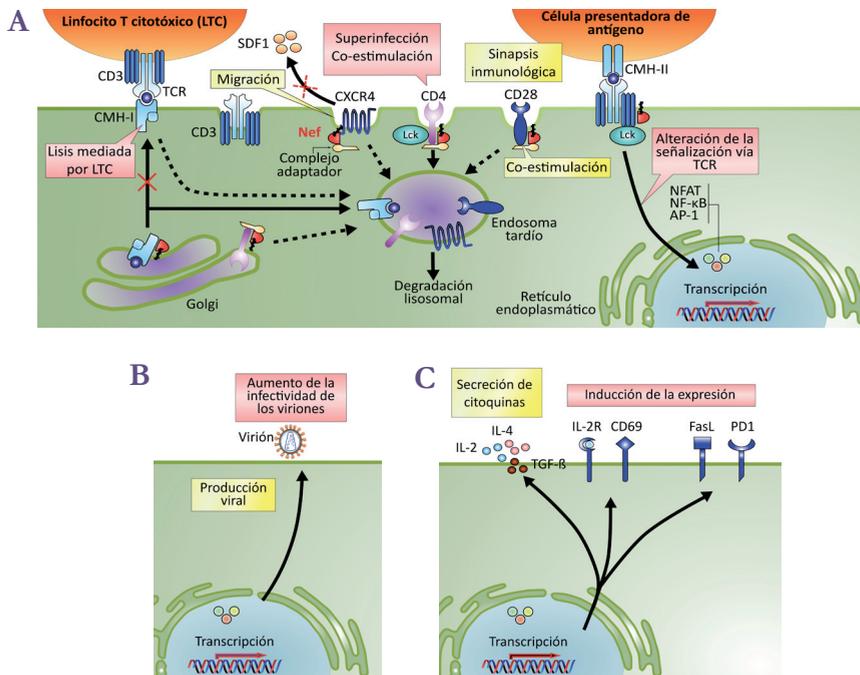


Figura 9. Funciones de la proteína Nef del VIH-1. Funciones de la proteína implicadas en: evasión inmune (A), liberación e infectividad de los viriones (B) o modulación de la activación y apoptosis celular (C). Adaptada de Kirchhoff (2009).

b) Interacción entre la proteína Nef y la proteína Lck

La proteína Lck es una tirosina quinasa que se expresa de forma específica en los linfocitos y se asocia con las colas citoplasmáticas de los correceptores CD4 y CD8 para ayudar a la señalización desde el complejo receptor de células T (TCR) (Rudd y col., 1989). Cuando el TCR es activado por la presentación del antígeno específico por parte del CMH, Lck desencadena una cascada de fosforilación celular que implica diversas proteínas como ZAP-70, LAT (*Linker of Activated T cells*), la quinasa PI3K y la fosfolipasa C (PLC). La cascada de fosforilación de tirosina iniciada por Lck culmina en la movilización intracelular de iones calcio (Ca^{2+}) y en la activación de importantes cascadas de señalización dentro de los linfocitos (Fooksman y col., 2010; Nika y col., 2010).



Además, Lck juega un papel importante en diferentes aspectos del curso de la infección, como por ejemplo en la infección productiva (Tremblay y col., 1994) y la formación de viriones y la producción viral a través del reclutamiento de Gag en los sitios de ensamblaje (Briand y col., 1997).

La proteína Nef interacciona con el dominio SH3 de Lck de forma cooperativa implicando la unión previa al dominio SH2 mediante un mecanismo independiente de fosforilación en Tyr (Collette y col., 1996). Mientras que el dominio PxxP de Nef es el determinante molecular para la interacción con el dominio SH3 de Lck, el sitio de interacción con el dominio SH2 es desconocido.

Puesto que el aumento en la tasa de internalización de CD4 mediada por Nef está estrictamente relacionado con la estabilización de CD4 en la membrana por su interacción con Lck, se ha propuesto que Nef promueve la disociación del complejo Lck/CD4 y, al mismo tiempo, logra el reclutamiento masivo del complejo adaptador AP-2, quien reconoce y une el motivo di-leucina de tráfico de CD4 expuesto tras la unión de Nef a Lck, con la consiguiente aceleración de la internalización de CD4 (Collette y col., 1996; Laguette y col., 2009). Además, Nef también interacciona con Lck para modular los niveles de activación de las linfocitos T CD4 infectados y, por tanto, la optimización de la replicación del virus (Fackler y col., 2001).

Por lo tanto, la identificación del sitio de interacción de Nef con el dominio SH2 de Lck tiene un especial interés desde un punto de vista terapéutico por constituir una diana para el tratamiento de la infección por el VIH-1 y ha sido el objeto de estudio en la Sección 1 de esta Memoria.

1.3.2 La briostatina-1 como fármaco anti-latencia

Como ya se ha descrito en el apartado 1.2.2, el objetivo de los tratamientos de reactivación del VIH-1 es eliminar los reservorios virales. Para ello es necesario estimular la actividad transcripcional del provirus latente en las células infectadas, dando lugar a células productoras de virus que bien podrían morir por efecto citopático del virus o ser detectadas y eliminadas por el sistema inmune del huésped.

Las briostatinas son una familia de macrólidos de lactona aisladas de briozoos invertebrados marinos. De las 20 briostatinas identificadas hasta el momento, algunas de ellas son potentes moduladores de la actividad de PKC tanto noveles como clásicas, siendo la briostatina-1 (BRIO) significativamente más potente que la prostatina (Hale y col., 2002; Sánchez-Duffhues y col., 2011). NF- κ B es uno de los principales factores



de transcripción que regula la replicación del VIH-1 y uno de sus mecanismos de activación es dependiente de la vía de PKC, por lo que agonistas de PKC podrían reactivar el VIH-1 latente.

En los años noventa algunos estudios *in vitro* mostraron la capacidad de la BRIO de reactivar la latencia viral (Kinter y col., 1990; Qatsha y col., 1993), hecho que se corroboró años más tarde (Mehla y col., 2010; Sánchez-Duffhues y col., 2011). Además, se ha descrito un efecto sinérgico de la BRIO con inhibidores de las HDAC en la reactivación de la latencia del VIH-1 en las células Jurkat-LAT-GFP (Pérez y col., 2010).

Como otros activadores de PKC, la BRIO regula negativamente la expresión del receptor y correceptor del VIH-1 (CD4 y CXCR4 respectivamente), inhibiendo la infección de células T CD4 (Hezareh y col., 2004; Warrilow y col., 2006).

En la **figura 10** se muestran los distintos aspectos en los que participa la BRIO en el contexto de la infección/replicación del VIH-1.

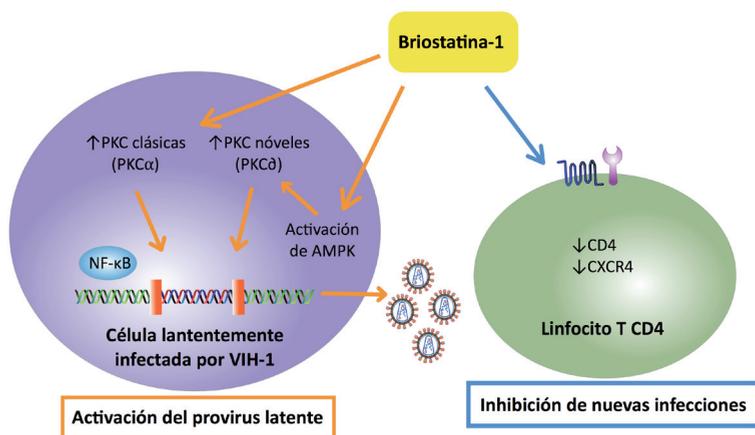


Figura 10. Papel de la briostatina en el contexto de la infección por VIH-1.
Adaptada de Mehla y col. (2010).

La BRIO es un fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) con el que se han realizado ensayos clínicos en humanos como agente anti-cancerígeno y en la enfermedad de Alzheimer, por lo que están disponibles los datos sobre su farmacocinética y toxicidad (Sun y Alkon, 2006; Irie y col., 2012).

Si la reactivación viral se realizara en combinación con el TAR, se produciría una reactivación de los reservorios virales latentes y al mismo tiempo se inhibirían nuevas



infecciones por parte del VIH-1 reactivado. Antes de diseñar estudios clínicos de combinación de TAR con posibles reactivadores para evaluar su impacto real sobre el tamaño de los reservorios latentes de VIH-1, es necesario determinar *in vitro* y *ex vivo* el potencial efecto de los compuestos en combinación con los AR. Estudios *ex vivo* han mostrado resultados prometedores en cuanto a reactivación del provirus latente de individuos infectados bajo TAR tras el tratamiento con el inhibidor de HDAC vorinostato (Archin y col., 2012) o con nuevos análogos de prostatina (Beans y col., 2013). Pero no sólo es importante analizar el potencial efecto de reactivación del compuesto anti-latencia a ensayar en combinación con los AR, sino también evaluar si el compuesto reactivador antagoniza de alguna forma la capacidad de inhibición de los AR, aspecto que, hasta la fecha no ha sido estudiado.

Todos estos aspectos previos a los ensayos clínicos son los que se han evaluado en la Sección 2 de esta Memoria, utilizando como reactivador viral la BRIO y combinándola con AR actualmente utilizados en la práctica clínica, como MVC o ATP. Además, puesto que la BRIO tiene buena penetrabilidad en el SNC, se ha investigado si también era capaz de inducir la activación del VIH-1 en los astrocitos, ya que constituyen un reservorio celular importante.

2. Objetivos



A pesar del éxito de la TAR y de las mejoras a su acceso durante los últimos años, la aparición de mutantes de VIH-1 resistentes a la terapia y los fracasos en el desarrollo de una vacuna profiláctica hacen necesario la **identificación de nuevas dianas terapéuticas** que puedan responder a las limitaciones de los actuales fármacos o compuestos. Además, debido a que los reservorios virales representan una barrera fundamental para la “cura de la infección por el VIH-1”, la **reactivación de la latencia viral** es un aspecto importante a tener en cuenta para poder alcanzar la erradicación del virus.

Por ello, los objetivos planteados en esta Memoria han sido los siguientes:

1. Identificar y analizar la función de un nuevo dominio presente en la proteína Nef del VIH-1, responsable de la interacción con el dominio SH2 de Lck, como posible nueva diana terapéutica.
2. Estudiar los efectos de la briostatina-1 combinada con antirretrovirales actualmente utilizados en la práctica clínica, como maraviroc o Atripla®, en la reactivación viral y en el efecto antiviral de los compuestos.

3. Materiales y métodos



3.1 MATERIALES

3.1.1 Cultivos celulares

a) Medios de cultivo

Los medios utilizados para cultivar distintos tipos celulares fueron:

- **Medio de cultivo RPMI completo.** Para obtener el medio completo, se suplementó el RPMI-1640 (Biochrom AG) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Lonza, BioWhittaker), 125 mg/ml de ampicilina, 125 mg/ml de cloxaciclina y 40 mg/ml de gentamicina (Normon).

- **Medio de cultivo DMEM completo.** Para obtener el medio completo, el medio DMEM (Biochrom AG) se suplementó con 10% de FBS, 1% de glutamina, 125 mg/ml de ampicilina, 125 mg/ml de cloxaciclina y 40 mg/ml de gentamicina (Normon).

b) Células primarias

Las muestras de sangre de donantes sanos fueron obtenidas del Centro de Transfusión de Madrid. Las muestras de individuos VIH-1 positivos se obtuvieron del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Todos los pacientes que han participado en este estudio firmaron un consentimiento informado, que había sido previamente aprobado por el comité ético del centro hospitalario al que pertenecen. Todos los pacientes en el momento del estudio estaban recibiendo TAR durante, al menos, dos años y presentaban carga viral (CV) indetectable (<50 copias/ml), cuyas características clínicas más relevantes se detallan en la **tabla 5** (apartado 3.2.20).

- **Células mononucleares de sangre periférica (CMSP).** Para aislar las CMSP, la sangre se diluyó 1:1 en tampón fosfato salino estéril (150 mM NaCl, pH 7.2) (PBS) (Lonza, BioWhittaker). Posteriormente, esta sangre diluida, se centrifugó en gradiente de densidad *Ficoll Hypaque* (Pharmacia Fine Chemicals) a 1800 rpm durante 30 min sin freno. Tras sucesivos lavados con PBS, las CMSP se cultivaron a una densidad aproximada de $5 \cdot 10^6$ células/ml a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en medio RPMI completo suplementado con 60 U/ml de interleuquina-2 (IL-2) recombinante humana (Murex Diagnostics) para mantener la viabilidad de las células primarias en cultivo y 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Murex Diagnostics) para producir una activación policlonal durante 3 días.



- **Linfocitos T CD4.** Los linfocitos T CD4 se purificaron a partir de CMSP por selección negativa (*Human CD4+ T Cell Isolation kit II*, Miltenyi). La pureza de la población aislada se evaluó por citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD3-PC7 y anti-CD4-APC (ver sección 3.1.4) y fue siempre superior al 95%. Los linfocitos T CD4 se cultivaron a una densidad aproximada de 5.10^6 células/ml a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en medio RPMI completo suplementado con 20 U/ml de IL-2.

- **Astrocitos humanos primarios (NHA).** Los astrocitos humanos provienen de cerebros de fetos humanos de 5 meses y fueron adquiridos a Lonza (CC-2565). Para establecer el cultivo inicial, las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² en medio basal de astrocitos (ABM™, Lonza) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para garantizar la viabilidad y el crecimiento celular óptimo, el pase de células se realizó cuando la confluencia del cultivo alcanzaba entre el 70 y 80%.

c) Líneas celulares

Se utilizaron distintas líneas celulares en función de los requerimientos específicos de cada experimento. Sus principales características se detallan a continuación.

- **CEM-SS (CEM) y Jurkat 1.1 (Jurkat).** Ambas líneas fueron utilizadas como modelos de células T, puesto que proceden de linfomas humanos. Se obtuvieron a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent*, División de AIDS, NIAID, NIH: CEM-SS (Cat# 776), del Dr. Peter L. Nara y Jurkat 1.1 (Cat# 1340), del Dr. Thomas M. Folks. Se cultivaron en suspensión en RPMI completo.

- **HeLa T4 (Hela-CD4).** Procede de la línea celular HeLa, modificada genéticamente para expresar altas cantidades del receptor viral CD4. Se obtuvo a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent*, División de AIDS, NIAID, NIH: Hela T4⁺ (Cat# 154), del Dr. Richard Axel. Las células se cultivaron en DMEM completo suplementado con geneticina a 500 µg/ml.

- **HEK293T.** Procede de células embrionarias de riñón humano transformadas mediante su cultivo con adenovirus 5 y fue adquirida a través del *American Type Culture Collection* (ATCC, LGC Standards) (Cat# CRL-3216). Las células fueron cultivadas en medio DMEM completo. Puesto que estas células tienen gran capacidad de ser transfectadas, se utilizaron para la preparación de stocks de VIH-1 empleados en los experimentos de infección (procedimiento que será detallado en el apartado 3.2.13).

- **TZM-bl.** Procede de la línea celular HeLa, modificada genéticamente para



expresar altas cantidades del receptor viral CD4 y del correceptor viral CCR5 y para poseer en su genoma varias copias integradas de los genes que codifican para las enzimas luciferasa y β -galactosidasa, ambos bajo el control del promotor del VIH-1 (LTR). Se adquirió a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent*, División de AIDS, NIAID, NIH: TZM-bl (Cat# 8129), del Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu y Tranzyme Inc. Las células fueron cultivadas en medio DMEM completo.

- **JLTRG-R5**. Procede de la línea celular Jurkat, establemente transfectada con una construcción que codifica para el gen de la proteína GFP bajo el control del LTR viral. Estas células expresan el correceptor viral CXCR4 y bajos niveles del correceptor viral CCR5, por lo que son susceptibles a la infección tanto por virus de tropismo X4 como por virus de tropismo R5. Se adquirió a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent*, División de AIDS, NIAID, NIH: JLTRG-R5 (Cat# 11586), del Dr. Olaf Kutsch. Se cultivaron en suspensión en RPMI completo.

- **U87-MG (U87)**. Se obtuvo a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent*, División de AIDS, NIAID, NIH: U87-MG (Cat# 2188), de los Dr. Bruce Chesebro y Dr. Jan Ponte. Procede de células de astroglioma humano y fue cultivada en adherencia en medio DMEM completo.

- **J89GFP y THP89GFP**. Proceden de las líneas celulares Jurkat (modelo linfocítico) y THP-1 (modelo monocítico), respectivamente. Ambas son líneas celulares clonales infectadas latentemente con el VIH-1^{89.6} modificado genéticamente para contener en su secuencia el gen que codifica para la proteína GFP mejorada (EGFP) VIH-1 89 ENG (esquema de la construcción representado en la **figura 11**) y fueron cedidas por el Dr. David N. Levy (Kutsch y col., 2002). Las células J89GFP se cultivaron en suspensión en medio RPMI completo. Las células THP89GFP se cultivaron en placas de baja adherencia (Costar) en medio DMEM completo para favorecer que éstas crecieran en suspensión y evitar así su activación.

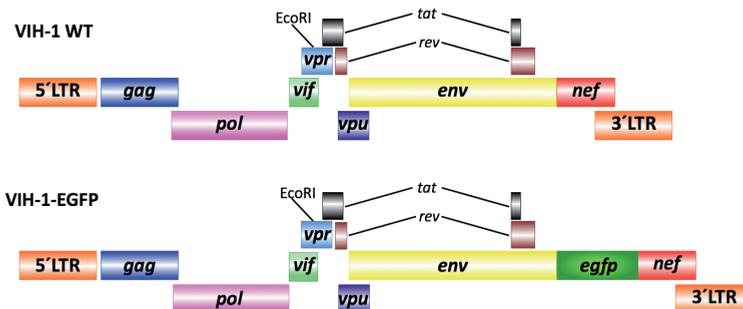


Figura 11. Esquema de la construcción VIH-1 89 ENG. Adaptada de Kutsch y col. (2002).



d) Bacterias

Las bacterias *XL1-Blue* (Stratagene) se utilizaron para clonar las construcciones obtenidas tras el proceso de mutagénesis dirigida (ver apartado 3.2.2) y para clonar las construcciones pGST-LckSH3, pGST-LckSH2 y pGST-LckSH3SH2 obtenidas en esta Memoria (ver apartado 3.2.3).

Las bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α se utilizaron para producir grandes cantidades de las proteínas de fusión GST-LckSH3, GST-LckSH2, GST-LckSH3SH2 y GST-Nef previa inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich) a 100 μ M durante 3 h.

Para el cultivo de bacterias se utilizó medio *Luria Bertani* (LB) líquido. Para el aislamiento de clones, las bacterias se cultivaron en placas con medio LB-agar (1,5%). Ambos se prepararon diluyendo el compuesto correspondiente (Sigma-Aldrich), en agua destilada y se esterizaron en autoclave. Se añadió ampicilina a 100 μ g/ml en el LB líquido y 50 μ g/ml para el LB-agar.

3.1.2 Plásmidos

- **pNL4.3, pNL(AD8), pNL89.6 y pNL4.3 Δ Nef.** Se obtuvieron a través del programa *AIDS Research and Reference Reagent* (División de AIDS, NIAID, NIH). Son plásmidos de expresión que contienen el genoma del VIH-1 integrado. Codifican para la expresión del provirus VIH-1_{NL4.3} (de tropismo X4), del VIH-1_{NL(AD8)} (de tropismo R5) o del VIH-1_{89.6} (tropismo dual) en su forma salvaje o con una delección en el gen de la proteína Nef. Se utilizaron para realizar las producciones virales (procedimiento que será detallado en el apartado 3.2.13).

- **pCG-Nef-GFP, pGEX-Nef y pCDNA-Nef-HA.** Fueron cedidos por el Dr. Serge Benichou (Instituto Cochin, Paris, Francia). Son plásmidos de expresión que contienen la secuencia de las proteínas de fusión Nef-GFP (Nef_{NL4.3}-proteína verde fluorescente), GST-Nef (Glutathion S transferasa-Nef Lai) y Nef-HA (Hemaglutinina del virus de la gripe humana-Nef_{NL4.3}) respectivamente. Se utilizaron para realizar sobre ellos la mutagénesis dirigida en el dominio PGGP de Nef (ver apartado 3.2.2).

- **pCG-Nef-GFP LL/AA, pCG-Nef-GFP PxxP/AxxA, pCDNA-Nef-HA LL/AA y pCDNA-Nef-HA PxxP/AxxA.** Fueron cedidos por el Dr. Serge Benichou (Instituto Cochin, Paris, Francia). Son plásmidos de expresión que contienen la secuencia de la proteína de fusión Nef-GFP o Nef-HA con mutaciones en el dominio di-leucina (LL/AA) o poli-prolina (PxxP/AxxA).



- **pLck-GFP y pLck-Cherry**. Fueron donados por el Dr. M.A. Alonso (CBMSO, Madrid, España). Son plásmidos de expresión que contienen la secuencia de las proteínas de fusión Lck-GFP y Lck-Cherry respectivamente.

- **pGEX-4T1**. Plásmido de expresión que contiene el gen de la proteína GST (GE, Healthcare).

- **pGST-LckSH3, pGST-LckSH2 y pGST-LckSH3SH2**. Se construyeron para el desarrollo de esta Memoria (ver apartado 3.2.3), son plásmidos de expresión que codifican para los dominios de Lck SH3, SH2 o ambos, fusionados a GST.

- **pLTR-Luc**. Plásmido reportero que codifica el gen de la luciferasa bajo el control del LTR viral. Fue cedido por el Dr J. L. Virelizier (Instituto Pasteur, Paris, Francia).

- **pI κ B α** . Fue donado por el Dr G. Crabtree (Universidad de Stanford, California, EEUU). Es un plásmido de expresión que codifica para la proteína I κ B α .

3.1.3 Cebadores

Los cebadores (Eurogentec) indicados en la **tabla 3** se utilizaron para realizar mutagénesis dirigida en el dominio de dimerización o en el dominio PGPG de Nef (ver apartado 3.2.2), para amplificar los distintos dominios de la proteína Lck (ver apartado 3.2.3) o para secuenciar las construcciones y corroborar así la identidad de las secuencias codificadas (ver apartado 3.2.4).

3.1.4 Anticuerpos

Los anticuerpos enumerados en la **tabla 4** se utilizaron para analizar la expresión de diversas proteínas humanas evaluadas en esta Memoria. Cuando los anticuerpos primarios utilizados para citometría de flujo y microscopía confocal no estaban marcados fluorescentemente, se utilizaron anticuerpos secundarios específicos para la especie en la que se había generado el anticuerpo primario y acoplados a distintos fluoróforos. En los ensayos de *western-blot* fueron utilizados anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) de Dako.



A. CEBADORES PARA MUTAGÉNESIS	
Nombre	Secuencia 5'-3'
DW/AA FW	CAAGGCTACTTCCCT <u>GCTGCG</u> CAGAACTACACACCAGG
DW/AA RV	CCTGGTGTGTAGTTCTG <u>CGCAG</u> CAGGGAAGTAGCCTTG
QN/AA FW	CTACTTCCCTGATTG <u>GGCGGC</u> CTACACACCAGGGC
QN/AA RV	GCCCTGGTGTGTAG <u>GCCGCC</u> CAATCAGGGAAGTAG
YT/AA FW	CTTCCCTGATTGGCAGAA <u>CGCCG</u> CACCAGGGCCAGGGGTCAG
YT/AA RV	CTGACCCCTGGCCCTGGT <u>GCGGCG</u> TTCTGCCAATCAGGGAAG
PG1/AA FW	GGCAGAACTACAC <u>AGCAG</u> CGCCAGGGGTCAG
PG1/AA RV	CTGACCCCTGGCG <u>CTGCTG</u> TGTAGTTCTGCC
PG2/AA FW	GAACTACACACCAGGG <u>GCGAG</u> CGGTCAGATATCC
PG2/AA RV	GGATATCTGACC <u>GCTGCC</u> CTGGTGTGTAGTTC
VR/AA FW	TACACACCAGGGCCAGGG <u>GCCGC</u> CATATCCACTGACCTTTGGATG
VR/AA RV	ATCCAAAGGTCAGTGGATAT <u>GCGGCC</u> CTGGCCCTGGTGTGTAG
YP/AA FW	CCAGGGCCAGGGGTCAGAG <u>CTGCA</u> CTGACCTTTGGATGGTG
YP/AA RV	CACCATCCAAAGGTCAGT <u>GCA</u> CTGACCCCTGGCCCTGG

B. CEBADORES PARA AMPLIFICAR LOS DOMINIOS de Lck	
Nombre	Secuencia 5'-3'
SH3 FW	<u>GAATTC</u> CTGGTTATCGCTCTGCACAG
SH3 RV	<u>CTCGAG</u> TCAATTTGGCCACAAAATTGAAG
SH2 FW	<u>GAATTC</u> TGGTTCTTCAAGAATCTGAGC
SH2 RV	<u>CTCGAG</u> TCAGCAAGGACGGCTCAACCT

C. CEBADORES PARA SECUENCIACIÓN	
Nombre	Secuencia 5'-3'
HA RV	TCTGGGACGTCGTATGGGTA
GFP RV	TCCCGGCGCGGTCACGAACT
Nef RV	ATGGGTGGCAAGTGGTC

Tabla 3. Relación de los cebadores utilizados en esta Memoria. FW, cebador directo; RV cebador reverso. **A)** Los nucleótidos subrayados representan los nucleótidos que codifican para el par de aminoácidos que se mutará en cada caso. **B)** Los nucleótidos subrayados representan el sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI (en los cebadores FW) y XhoI (en los cebadores RV).



ANTICUERPOS PRIMARIOS CONJUGADOS				
Anticuerpo	Fluoróforo	Técnica	Uso	Casa Comercial
anti-CD3 (clon UCHT1)	PC5, PC7	Citometría de flujo	Identificación de linfocitos T	Beckman Coulter
anti-CD4 (clon SFCH12T4D11)	PC5, PC7			Beckman Coulter
anti-CXCR4 (clon 44717)	APC		Análisis de la expresión de las distintas moléculas en la superficie celular para evaluar el efecto de Nef sobre CD4 o el efecto de la BRIO en el fenotipo celular	R&D Systems
anti-CCR5 (clon 2D7/CCR5)	PE			BD Pharmingen
anti-CD25 (clon M-A251)	PE			BD Pharmingen
anti-CD38 (clon LS198-4-3)	FITC			Beckman Coulter
anti-CD69 (clon TP1.55.3)	FITC, PE			Beckman Coulter
anti-HLA-DR (clon immu-357)	ECD			Beckman Coulter

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Especie	Técnica	Uso	Casa Comercial
anti-CMH-I (clon WG32)	ratón	Citometría de flujo	Análisis de la expresión de CMH-I en la superficie celular para evaluar el efecto de Nef sobre esta molécula	Cedido por el Dr. Miguel Relloso
anti-CD4 (clon 4B12)	ratón	Inmunofluorescencia	Análisis de la expresión en membrana (CD4) o intracelular (CD4, Lck y Lck-Y595/394) para evaluar el efecto de la expresión de Nef	Leica Microsystems
anti-Lck (28/Lck)	ratón			BD Transduction Laboratories
anti-Y505Lck (clon 4G10)	conejo			Millipore
anti-Tf-R (clon H68.4)	ratón		Análisis de la expresión de Tf-R	Zymed
anti-p65 (policlona l)	conejo		Análisis de la traslocación de NF-kB	Millipore
anti-GFP (clones 7.1 y 13.1)	ratón		Western-blot	Análisis de la expresión de las proteínas de fusión Neg-GFP, Lck-GFP y Nef-HA
anti-HA (clon 3F10)	rata	Roche		
anti-γ-Adaptina (clon 100/3)	ratón	Detección de AP-1 en el ensayo de interacción Nef-AP-1 o como control de carga en los <i>western-blot</i>		Sigma-Aldrich
anti-Numa-1 (clon1C5)	ratón	Control de carga en la fracción nuclear de los <i>western-blot</i>		Sigma-Aldrich
anti-p65 subunidad activa (clon12H11)	ratón	Detección de NF-kB en el ensayo de traslocación		Millipore
anti-p24 (clon 183-H12-5C)	ratón	Detección de la proteína viral p24		NIH
anti-CD3 (clon HIT3a)	ratón	Estimulación de células Jurkat		BD Pharmingen

ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Anticuerpo	Especie	Conjugado	Técnica	Casa Comercial
anti-ratón	cabra	Alexa 555, 647	Inmunofluorescencia o Citometría de flujo	Molecular Probes
anti-conejo	cabra	Alexa 488, 647		Molecular Probes

Tabla 4. Relación de anticuerpos utilizados en esta Memoria.



3.1.5 Fármacos

Los fármacos utilizados en la Sección 2 de esta Memoria fueron: Briostatina-1 (BRIO), Maraviroc (MVC) y Atripla® (ATP).

- **BRIO.** Compuesto que se une con gran afinidad a PKC, siendo un potente modulador de su actividad. En los ensayos *in vitro* inhibe el crecimiento celular y la angiogénesis y también tiene propiedades inmunomoduladoras. Se ha probado en ensayos clínicos como agente anti-cancerígeno y para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (Sigma-Aldrich).

- **MVC.** Compuesto que se une al receptor de quimiocina CCR5 en la superficie celular, provocando un bloqueo de la unión del VIH-1 con este correceptor, evitando la entrada de virus con tropismo R5. El medicamento formulado (Selzentry®) fue el primero aprobado por la FDA (año 2007) que pertenecía a una nueva clase de agentes AR dirigidos a proteínas del huésped. (Pfizer).

- **ATP.** Fármaco aprobado por la FDA en 2006 como AR de dosis única diaria que combina tres inhibidores de la TI: efavirenz (EFV), emtricitabina (FTC) y fumarato de disoproxilo de tenofovir (TFV). FTC y TFV son análogos de nucleósidos (ITIAN), mientras que EFV es no análogo de lo nucleósidos (ITINAN). Por tanto, ATP bloquea la TI del VIH-1, evitando la síntesis de DNA viral y, por tanto, su integración en el genoma y la replicación viral. (Gilead).

Los tres compuestos se disolvieron en agua destilada con DMSO al 1%. Al añadir los compuestos disueltos a los cultivos celulares, la concentración de DMSO nunca superó el 0,001%, no mostrando toxicidad en los ensayos de viabilidad realizados.



3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensayos de viabilidad celular

a) MTT. Ensayo basado en la capacidad que tienen las células viables de reducir la sal de tetrazolio MTT a cristales de formazán MTT por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Las células se incubaron con el estímulo correspondiente (BRIO de 1 a 100 nM, MVC de 1 a 100 μ M y/o ATP de 0,3 a 30 μ M) durante 24 (JLTRG-R5, CMSP, U87 y NHA) o 72 (TZM-bl) h y posteriormente se retiró el medio y se añadió el sustrato MTT (Sigma) a 0,15 mg/ml disuelto en “OptiMEM” (Gibco-BRL), que se incubó durante 4 h a 37°C. Finalmente se retiró el medio y se añadieron 200 μ l de DMSO con el fin de disolver los cristales formados. Se midió la absorbancia a 570/655 nm.

El análisis de los resultados se realizó normalizando a 100% de viabilidad el valor de absorbancia obtenido a 570/655 nm en el ensayo MTT de las células no tratadas. Se consideró un tratamiento como no tóxico cuando la viabilidad de las células tratadas fue igual o superior al 80%.

b) 7AAD. Las células J89GFP y THP89GFP se trataron con el estímulo correspondiente (BRIO a 100 nM, MVC a 100 μ M y/o ATP a 30 μ M) y después de 1, 2 o 4 días de tratamiento se recogieron las células y se determinó la viabilidad celular por marcaje con 0,5 mg/ml de 7-aminoactinomicina D (7AAD; Sigma-Aldrich) en PBS-BSA 0,1%. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se fijaron las células añadiendo formaldehído al 2% en PBS de durante 10 min. Se analizaron por citometría de flujo con el citómetro Gallios (Beckman Coulter). Para el análisis de los resultados se empleó el programa FlowJo, versión 7.6.1 (Tree Star Inc).

3.2.2 Mutagénesis dirigida por PCR

Esta técnica se empleó para la obtención de los mutantes puntuales de la proteína Nef. Se utilizó el kit *Quick-Change II Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) empleando parejas de oligonucleótidos mutagénicos complementarios diseñados para realizar diferentes mutaciones puntuales en la región 123-127 de la proteína Nef del VIH-1 (**figura 16 y tabla 3**). Como molde de la amplificación se utilizaron las construcciones plasmídicas pCG-Nef-GFP, pGEX-Nef y pCDNA-Nef-HA (ver apartado 3.1.2). La **figura 12** muestra de forma esquemática los pasos de este procedimiento.

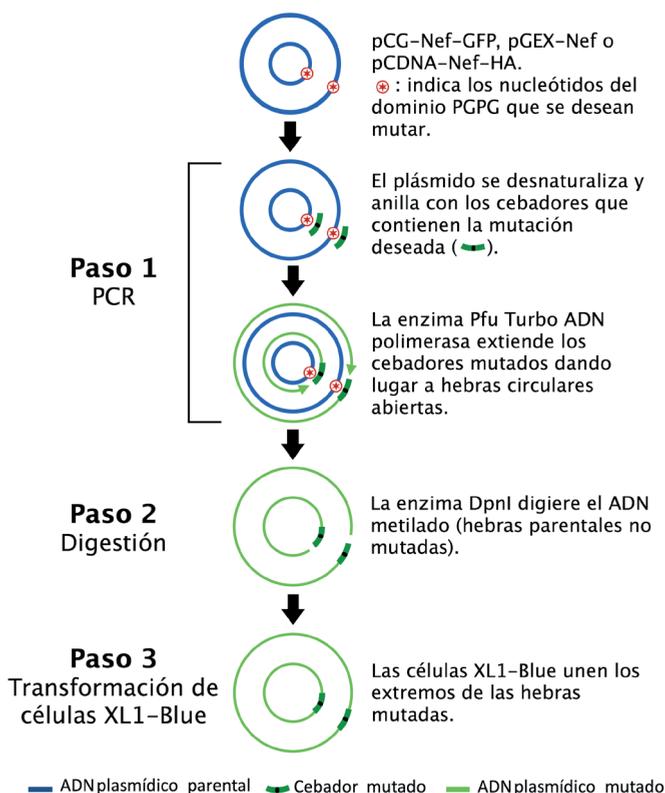


Figura 12. Proceso de mutagénesis dirigida en el dominio PGP de Nef.

- **PCR de mutagénesis.** Las amplificaciones de ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Roche). Todas las mezclas de reacción de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l y contenían: 50 ng del plásmido molde, 5 μ l de tampón de PCR 10 x, 125 ng de cada oligonucleótido, 1 μ l de la mezcla de dNTP incluida en el kit y 2,5 U de Pfu *Turbo* ADN polimerasa. La reacción de amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 2 min a 95°C y 18 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 50°C y 8 min a 68°C. Tras esta reacción, el producto obtenido es una mezcla de plásmido original y plásmido mutado.

- **Digestión enzimática.** Para eliminar el ADN plasmídico empleado como molde, se utilizó la enzima de restricción DpnI, que corta sólo las secuencias metiladas de ADN bacteriano. La digestión se llevó a cabo durante 2 h a 37°C en un volumen



final de 30 μl (25 μl del producto de PCR y 10 U de DpnI). 10 μl de cada reacción de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% para comprobar que tras la digestión se conservaba una banda de aproximadamente 9,5 kb.

- **Transformación de bacterias.** Los productos de la digestión se transformaron en las bacterias XL1-*Blue* y se purificaron como se detalla en el apartado 3.2.5.

3.2.3 Construcción de pGST-LckSH3, pGST-LckSH2 y pGST-LckSH3SH2

La construcción de estas proteínas de fusión se realizó amplificando por PCR cada uno de los dominios SH2 o SH3 de Lck o bien los dos dominios juntos SH3SH2 utilizando los cebadores correspondientes (tabla 3). En la figura 13 se muestra de forma esquemática el proceso seguido.

- **Amplificación de los dominios de Lck.** Con el fin de que estos fragmentos pudieran ser posteriormente clonados en el vector pGEX-4T1, se utilizaron los cebadores Fw-EcoRI, añadiendo a la secuencia del dominio de Lck correspondiente la secuencia de la enzima de restricción EcoRI y Rv-XhoI, a la que se añadió la secuencia de XhoI. Los fragmentos se amplificaron por PCR a partir del plásmido molde pLck-GFP. Para llevar a cabo las reacciones de PCR, se utilizó el kit *Maxime PCR*, el cual suministra una PreMix (i-Taq) (iNTRON Biotechnology), por lo que a cada tubo de reacción se añadieron 50 ng de ADN, 125 ng de cada oligonucleótido y se ajustó con agua hasta 20 μl . Para amplificar el dominio SH2 o el SH3SH2 se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C 2 min, 36 ciclos de 95°C 30 seg, 44°C 45 seg, 72°C 30 seg y 1 ciclo de 72°C 10 min. Las condiciones de la reacción de PCR para amplificar el dominio SH3 fueron: 1 ciclo de 95°C 2 min, 36 ciclos de 95°C 30 seg, 48°C 45 seg, 72°C 30 seg y 1 ciclo de 72°C 10 min.

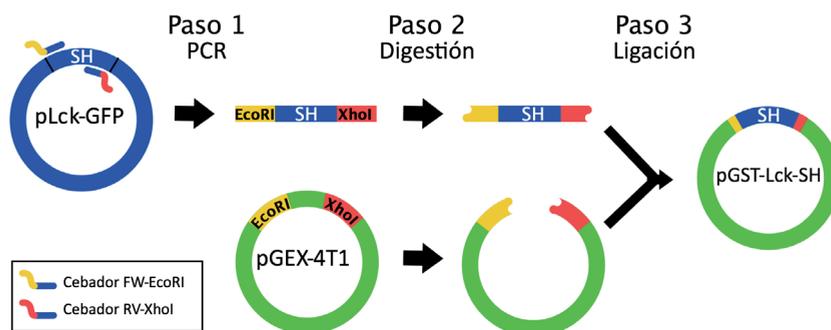


Figura 13. Proceso de generación de las construcciones pGST-LckSH3, pGST-LckSH2 y pGST-LckSH3SH2



- **Purificación de los dominios de Lck y clonaje.** Una vez comprobado el tamaño del fragmento amplificado (150 nucleótidos para SH3, 300 para SH2 y 450 para SH3SH2) en gel de agarosa al 1,2%, se cargó todo el volumen restante de la PCR en otro gel de agarosa al 1,2% para purificar el ADN siguiendo las indicaciones del fabricante (*Gel Extraction kit*, Qiagen). Tanto los productos de amplificación como el vector pGEX-4T1 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI/XhoI (BioLabs) y los dominios de Lck se clonaron en fase en el plásmido. Los productos de la ligación se transformaron en las bacterias XL1-*Blue* y se purificaron como se detalla en el apartado 3.2.5.

3.2.4 Análisis de secuencias

La incorporación de las mutaciones se comprobó mediante secuenciación automática de ADN realizada en la Unidad de Secuenciación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, seguida por un análisis comparativo con otras secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* usando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, *National Center For Biotechnology Information*; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin identificar secuencias conocidas con alta similitud.

3.2.5 Obtención de ADN plasmídico

- **Transformación de bacterias.** Las bacterias XL1-*Blue* ultracompetentes (proporcionadas en el kit de mutagénesis) fueron transformadas siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras haber añadido 2 μ l de β -mercaptoetanol, las bacterias se incubaron 10 min a 4°C; a continuación se añadieron 4 μ l del DNA tratado con DpnI (para las muestras de mutagénesis) o 10 μ l de la ligación (para las muestras del clonaje de los dominios de Lck); se mezcló y se incubó durante 30 min a 4°C; después de ser sometidas a un choque térmico (30 seg a 42°C y 2 min a 4°C), se añadió 0,5 ml de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación. Por último, se extendieron 0,25 ml de cada transformación en placas de LB-agar suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron en una estufa a 37°C. Al día siguiente se trabajaba con las colonias que habían crecido en la placa.

- **Cultivos de bacterias y extracción de ADN.** En este apartado se debe distinguir entre dos protocolos, en los que la manipulación de bacterias fue diferente dependiendo de si el objetivo del protocolo era la obtención de secuencias de clones de bacterias o la obtención de cantidades suficientes de plásmido para realizar los experimentos de transfección celular. De cada placa de LB-Amp se picaron 4 colonias y se cultivaron en 4 ml de LB-Amp (100 μ g/ml). Tras 16 h de incubación a 37°C,



se utilizó 1 ml de cada cultivo para hacer un stock glicerolado al 50% (V/V) para su conservación a -80°C ; los otros 3 ml se utilizaron para obtener ADN plasmídico a través del kit de minipreps siguiendo las indicaciones del fabricante (*Minipreps SV Purification Kit*, Promega). Una vez comprobada la incorporación de las mutaciones, se realizaron cultivos de 250 ml a partir del glicerolado conservado para obtener ADN suficiente para realizar los diferentes ensayos. La extracción de ADN se llevó a cabo a través del kit de midipreps siguiendo las indicaciones del fabricante (*Qiagen Plasmid Midi Kit*). Se utilizó 1 μl del ADN eluído para medir la concentración y calidad de la muestra con el *nanodrop* (Thermo Scientific).

3.2.6 Transfecciones

Se realizaron para expresar las proteínas Nef y/o Lck en células T (CEM, Jurkat o CMSP) y no T (Hela-CD4), para realizar las producciones de virus con mutaciones en Nef (Jurkat o HEK293T) o para realizar las producciones a gran escala de los aislados virales X4-VIH-1_{NL4.3}, R5-VIH-1_{NL(AD8)} o X4/R5-VIH-1_{89.6} (HEK293T). La transfección de las células T se realizó por nucleofección siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (*Human T Cell Nucleofector® Kit*, Lonza). Las células no T, adherentes, se transfectaron por lipofección (*Lipofectin*, Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, se cultivaron en medio OptiMEM durante 12 h y posteriormente en medio DMEM completo. Para obtener cantidades suficientes de las producciones virales VIH-1_{NL4.3}, VIH-1_{NL(AD8)} o VIH-1_{89.6}, las células HEK2983T se transfectaron con el método del fosfato cálcico siguiendo las indicaciones del fabricante (*Calcium Phosphate transfection*, Sigma-Aldrich).

3.2.7 Western-Blot

- Obtención de extractos de proteína. Para obtener los extractos de proteína se recogieron las células del cultivo, se lavaron con PBS y se lisaron con una solución de lisis compuesta por: 50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30 mM octil-glucósido, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, PMSF 1 mM. Se utilizó el inhibidor de proteasas (IP) *Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free* (Thermo Scientific). Tras añadir la mezcla de lisis, las muestras se resuspendieron y se incubaron en hielo durante 30 min en agitación. El lisado resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C , con el fin de eliminar el material insoluble.

Para analizar la translocación a núcleo de la proteína NF- κ B, las fracciones citosólicas y nucleares se separaron siguiendo las indicaciones del fabricante (*Nuclear/Cytosolic fractionation kit*, MBL International).



La concentración proteica de los extractos se midió mediante la cuantificación con ácido bicinodínico (BCA) (*Protein Assay Kit*, Thermo Scientific).

- **Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana.** La cantidad de proteína cargada en los geles de SDS-PAGE (PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*) varió entre 25 y 40 μg , dependiendo del tipo de experimento realizado. El porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida empleado en los geles (entre el 7,5 y el 12%) varió en función del tamaño molecular (kDa) de la proteína a estudiar. Las proteínas se separaron en función de su tamaño, utilizando condiciones reductoras, a un voltaje constante de 120 mV. Tras la separación proteica, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polivinildifluoride*) (*Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting*, BioRad) previamente hidratada y equilibrada con metanol.

- **Revelado de la membrana de PVDF.** Después de 16 h de incubación a 4°C en solución de bloqueo [5% agente bloqueante (BioRad), PBS, 0,01% Tween-20 (Sigma-Aldrich)] se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente. El anticuerpo primario y el tiempo de incubación dependieron de cada experimento. La detección se realizó mediante un anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de la especie donde se había realizado el anticuerpo primario, unido a la enzima HRP 0 en solución de bloqueo (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La relación de anticuerpos utilizados ha sido detallada en la **tabla 4**. Las membranas se revelaron con *Immun-Star Western C Chemiluminescent Kit* (BioRad) en un aparato *Chemidoc XRS* (BioRad), analizando los resultados con el programa *Image J* (*National Institutes of Health*; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

3.2.8 Ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro*: pull-down

Tanto para ensayar el requerimiento del dominio PGPG para la unión de Nef con Lck como para comprobar las ausencia de efectos de su mutación sobre la estructura tridimensional de la proteína, se estudió la interacción de Nef con Lck o de Nef con AP-1 respectivamente mediante el ensayo de interacción *in vitro* (*pull-down*) empleando la proteína de fusión GST-Lck o GST-Nef purificadas con esferas de sefarosa recubiertas de glutatión (Amersham Biosciences) y lisados celulares de HeLa-CD4.

- **Purificación de las proteínas recombinantes.** Tras producir las proteínas de fusión GST-LckSH3, -SH2, -SH3SH2 o GST-Nef en bacterias *E.coli* DH5 α , los precipitados celulares se rompieron con una solución de lisis compuesta por: 50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT (ditiotreitól), 1% Tritón X-100, PMSF 1 mM, IP 1x. Además, cuando se purificaron las proteínas GST-LckSH3, -SH2 y -SH3SH2, se añadió una mezcla de inhibidores de fosfatasa (IF)



formada por: 5 mM NaOV, 50 mM NaF y 2 nM de ácido okadaico. Posteriormente, se purificaron usando esferas de sefarosa unidas a glutatión. Los productos de purificación se analizaron por electroforesis de proteínas (apartado 3.2.7), para así comprobar el tamaño adecuado de las proteínas y estimar cualitativamente la cantidad de proteína purificada.

- **Extracción de lisados celulares.** Por otro lado, las células HeLa-CD4 transfectadas con pNef-HA (para los ensayos de interacción Nef-Lck) o no transfectadas (para los ensayos de interacción Nef-AP-1) se lisaron con la siguiente solución: 50 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, PMSF 1x e IP 1x. A los lisados de las células HeLa-CD4 transfectadas con pNef-HA, se les añadió también, 30 mM octil-glucósido e IF 1x.

- **Ensayo de interacción.** Los lisados de las células HeLa-CD4 se incubaron a 4°C durante 12 h con 3 µg de las proteínas de fusión purificadas. Tras tres lavados con la solución de lisis celular, se estudió por *western-blot* la presencia de Nef utilizando anti-HA (para los ensayos de interacción Nef-Lck) o de AP-1 utilizando anti-γ-Adaptina (para los ensayos de interacción Nef-AP-1).

3.2.9 Citometría de flujo

Esta técnica se utilizó para estudiar la expresión de moléculas en la membrana plasmática o en toda la célula. En la superficie celular se estudió la expresión de CD4, CMH-I, CXCR4, CCR5, CD25, CD38, CD69 y HLA-DR. A nivel intracelular se estudió la expresión de Nef-GFP y Lck-GFP. Excepto para las proteínas fusionadas a GFP, la expresión de moléculas se analizó mediante tinción con los anticuerpos primarios adecuados para cada experimento conjugados con distintos fluoróforos (**tabla 3**). Para la tinción en superficie, las células (CEM, HeLa-CD4, JLTRG-R5 o CMSP) se lavaron con PBS y, a continuación se incubaron durante 5 min con PBS suplementado con 2% de FBS y con 10 µg/ml de IgG humanas (Sigma-Aldrich). El marcaje se realizó durante 1 h a 4°C y después de tres lavados las células se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 1%. La medida de la fluorescencia se hizo mediante el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) y el análisis de los resultados se hizo con el programa FlowJo, versión 7.6.1 (Tree Star Inc). La fluorescencia se expresa como media de la intensidad de fluorescencia (MFI) o como la media de la intensidad de fluorescencia integrada (iMFI), que se calcula multiplicando el porcentaje de células positivas para un marcador determinado por la MFI de esa población.



3.2.10 Inmunofluorescencia

Para realizar los marcajes en células HeLa-CD4, las células se cultivaron directamente sobre los cubre-objetos de vidrio circulares al inicio del experimento. Para los marcajes de células en suspensión (CEM, Jurkat o CMSP), éstas se sembraron con medio de cultivo RPMI sin suero sobre cubre-objetos de vidrio previamente recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) en pocillos de p24. Tras 4 h de adhesión a los cubre-objetos se procedió a su marcaje para inmunofluorescencia. El marcaje de superficie (CD4) se llevó a cabo a 4°C en células no permeabilizadas y antes de la fijación. Para marcajes intracelulares (CD4, Lck, faloidina, el receptor de transferrina, Tf-R y NF-κB), las células se fijaron con formalina (Sigma-Aldrich), después de 5 min se lavaron con 0,1% de BSA en PBS durante otros 5 min y posteriormente se permeabilizaron con 0,1% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) en PBS a 4°C durante 5 min. Tras otro lavado con PBS-BSA al 0,1%, las células se bloquearon durante 30 min con PBS-BSA al 1%. Después, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. En el caso de marcajes indirectos, las células se lavaron tres veces con PBS-BSA al 0,1%, previo a su incubación durante 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo. Cuando los marcajes se realizaron con anticuerpo primario y secundario, se puso un punto de marcaje sólo con anticuerpo secundario como control. Después de las incubaciones con los anticuerpos, las células se lavaron 3 veces con PBS-BSA al 0,1% y los cubre-objetos se montaron en porta-objetos de vidrio para microscopía sobre una gota de solución de montaje (*Fluoromount-G*, SouthernBiotech).

Las imágenes se realizaron en la Unidad de Microscopía Confocal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y se obtuvieron con un microscopio confocal láser (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) utilizando distintos láseres para detectar la fluorescencia de cada anticuerpo (488, 561 o 647 nm). Para cada muestra, se tomaron fotos de tres secciones medias de la célula (separadas 0,5 μm) y se analizaron entre 25 y 50 células. Para cuantificar la intensidad de fluorescencia (entendiéndose como la media de intensidad de fluorescencia por pixel) correspondiente a CD4, Lck o pY505/394Lck se utilizó el programa *ImageJ* teniendo en cuenta una escala de grises de 0 a 250. Para el análisis cuantitativo de la distribución de Lck en Jurkat y CMSP, se midió la intensidad de fluorescencia en ocho líneas radiales trazadas en cada célula en el plano ecuatorial. La relación entre Lck intracelular y Lck en membrana celular se calculó teniendo en cuenta 25 células por experimento de tres experimentos independientes. Cuando el valor de la relación entre Lck intracelular y Lck en membrana celular era mayor o igual que el obtenido en una célula no transfectada + 2 × SEM (error estándar de la media), se consideraba que las células expresaban altos niveles de Lck intracelular. Todas las



imágenes mostradas en esta Memoria se han deconvolucionado con el programa Huygens 3.0 (Scientific Volume Imaging) y se han procesado con el programa Adobe Photoshop (Adobe).

3.2.11 Análisis de la formación del anillo de actina mediada por TCR

Los cubres-objetos recubiertos con poli-L-lisina se prepararon como se indica en el apartado anterior. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo anti-CD3 diluido en TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7,5 y 150 mM NaCl) a 10 µg/ml durante 3 h a 37°C. Después de lavarlos con TBS se incubaron durante 5 min a 37°C con las células Jurkat transfectadas con los plásmidos de expresión pGFP o pNefGFP en medio sin suero y se fijaron mediante la adición directa de paraformaldehído. Finalmente se llevó a cabo el protocolo de inmunofluorescencia como se ha indicado en el apartado anterior utilizando Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich).

3.2.12 Microscopía de fluorescencia

Las células J89GFP y THP89GFP se fotografiaron en cultivo con el microscopio Leica DMI 3000B con el aumento de 10x.

3.2.13 Producción de aislados virales

Los aislados virales empleados en esta memoria se produjeron mediante transfección transitoria de 6.10⁶ células Jurkat o 5.10⁶ células HEK293T (ver apartado 3.2.6). Para la producción de virus mutados en Nef, las células se transfectaron con 20 µg del plásmido proviral pNL4.3ΔNef junto con 60 µg del plásmido pCDNA-Nef-HA salvaje (WT) o mutado en el motivo PGP o en el dominio PxxP. Para la obtención de las producciones virales VIH-1_{NL4.3}, VIH-1_{NL(AD8)} o VIH-1_{89.6}, las células HEK2983T se transfectaron transitoriamente con 20 µg de los plásmidos provirales pNL4.3, pNL(AD8) y pNL89.6. 72 h después de la transfección, los virus contenidos en los sobrenadantes celulares se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 min y posteriormente se filtraron con una membrana de tamaño de poro de 0,45 µm. El filtrado resultante se alicuotó y preservó a -80°C para su posterior utilización.

3.2.14 Cuantificación de aislados virales

La titulación viral del sobrenadante recogido en las células productoras que contenía el VIH-1 se cuantificó mediante ELISA de Agp24Gag utilizando el kit *Innotest HIV antigen mAb* (Innogenetics), siguiendo las especificaciones del fabricante.



3.2.15 Ensayo de infectividad

Las células TZM-bl se cultivaron a una concentración de 10^4 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos un día antes de ser infectadas durante tres horas.

Para realizar los ensayos de infectividad de los virus VIH-1_{NL4.3} en su forma salvaje o mutados en Nef, las células se infectaron con 20 ng de Agp24Gag por cada 10^6 células con los virus VIH-1_{NL4.3} WT, VIH-1_{NL4.3} ΔNef, VIH-1_{NL4.3} Nef-PG1/AA, VIH-1_{NL4.3} Nef-PG2/AA, o VIH-1_{NL4.3} Nef-PxxP/AxxA obtenidos a partir de células Jurkat o HEK293T (ver apartado 3.2.13).

Para realizar los ensayos de inhibición viral de los AR (MVC y ATP) en combinación con BRIO, las células se pre-trataron durante 1 h con BRIO (100 nM), MVC (100 μM) y/o ATP (30 μM). Después se infectaron con 500, 200 o 500 ng de Agp24Gag por cada 10^6 células de los aislados virales VIH-1_{NL4.3}, VIH-1_{NL(ΔD8)} o VIH-1_{89.6} respectivamente, obtenidos por transfección transitoria de células HEK293T (ver apartado 3.2.13). Después de la infección fueron tratadas de nuevo con BRIO, MVC y/o ATP a las concentraciones anteriormente indicadas.

Tras 48 h de cultivo, las células se lisaron con el tampón de lisis comercial *Glo Lysis buffer* (Promega) y se midió la actividad luciferasa utilizando el reactivo *Bright-Glo™ Luciferase Assay System* (Promega) en el luminómetro 1450 *Microbeta Luminescence Counter* (Walax, Trilux).

3.2.16 Obtención de CMSP infectadas por el VIH-1 en estado de reposo

La obtención de CMSP infectadas por el VIH-1 en estado de reposo se utilizó como un modelo más fisiológico de infección latente en CMSP humanas. Las CMSP se activaron durante 72 h con 2 μg/ml de PHA e infectaron con 200 ng de Agp24Gag por cada 10^6 células del aislado viral X4-VIH-1_{NL4.3} durante 3 h y se mantuvo el cultivo durante cuatro semanas. Durante las tres primeras semanas, cada semana se retiraba el sobrenadante y se añadían CMSP autólogas previamente activadas con 2 μg/ml de PHA en medio RPMI completo con 50 U/ml de IL-2. Durante la última semana las células se mantuvieron con IL-2 a concentración baja (20 U/ml) para establecer un estado de reposo de las CMSP. Para comprobar el estado de activación/reposo de las CMSP se analizó la expresión en superficie de los marcadores de activación CD69, CD25 y HLA-DR por citometría de flujo (ver apartado 3.2.9). Una vez en estado de reposo, las CMSP infectadas por el X4-VIH-1_{NL4.3} se trataron con BRIO (50 nM), ATP (30 μM) o BRIO-ATP y se cuantificó la producción de Agp24Gag en el sobrenadante de las CMSP por ELISA a 1, 3 y 6 días post-tratamiento (3.2.14) y la expresión de distintos marcadores de activación celular en superficie (CD25, CD69 y HLA-DR) a días 1 y 6 post-tratamiento.



3.2.17 Ensayo de proliferación celular

Se estudió el efecto sobre la proliferación celular que podía tener el tratamiento de linfocitos T CD4 con BRIO (50 nM), MVC (100 μ M) y/o ATP (30 μ M) utilizando el kit *BrdU Cell Proliferation Assay* (Chemicon International) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.18 Inducción de la activación del LTR viral en astrocitos

Para estudiar la capacidad de la BRIO para inducir la activación del LTR viral y la implicación del factor de transcripción NF- κ B en astrocitos, se co-transfectaron las células U87 con 1 μ g del plásmido pLTR-luc junto con 2 μ g de un plásmido vacío o un plásmido de expresión codificante para la proteína I κ B α por lipofección (*Lipofectin*, Invitrogen). Según las indicaciones del fabricante, se cultivaron en medio OptiMEM durante 5 h y posteriormente en medio DMEM completo en presencia o no de BRIO a 100 nM. Tras 16 h de tratamiento, las células se lisaron con el tampón de lisis comercial *Glo Lysis buffer* (Promega) se cuantificó la cantidad de proteína y se midió la actividad luciferasa en 20 μ g de proteína total utilizando el reactivo *Bright-Glo™ Luciferase Assay System* (Promega) en el luminómetro 1450 *Microbeta Luminiscence Counter* (Walax, Trilux).

3.2.19 Análisis de translocación de NF- κ B a núcleo en astrocitos

Las células U87 y NHA se cultivaron en placas de cultivo (para el posterior análisis por *western-blot*) o directamente sobre los cubre-objetos de vidrio circulares (para los experimentos de inmunofluorescencia) en medio con suero al 10%. 24 h antes de realizar el experimento de translocación de NF- κ B en las células U87 se substituyó el medio anterior por otro medio con suero al 2%. Las células se trataron durante 5, 10, 15, 30 o 60 min con BRIO y se procedió a realizar la extracción proteica de las fracciones citoplasmática o nuclear (apartado 3.2.7) o al procedimiento de inmunofluorescencia para la detección de NF- κ B, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.10. Para cuantificar la intensidad de fluorescencia de NF- κ B nuclear se utilizó el programa *Image J*, delimitando el contorno nuclear con la tinción con Topro (Life Technologies) teniendo en cuenta una escala de grises de 0 a 250.



3.2.20 Reactivación del VIH-1 latente en linfocitos T CD4 procedentes de individuos VIH-1+ en tratamiento antirretroviral

En este estudio se incluyeron tres individuos infectados por el VIH-1 bajo TAR que mantenían niveles indetectables de viremia plasmática (<50 copias/ml), cuyas características clínicas más relevantes se detallan en la **tabla 5**. Se purificaron los linfocitos T CD4 a partir de CMSP por selección negativa y se cultivaron en medio RPMI completo suplementado con ATP a 30 μ M en ausencia o presencia de BRIO durante 2 días. El número de copias de ARN viral se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo celular utilizando el kit Taqman VIH-1 Cobas AmpliPrep/Cobas, versión 1.5 (Roche Diagnostics). El límite de detección para este técnica fue de 50 copias/ml.

Paciente	Edad (años)	Género	Nadir T CD4 (cls/mm ³)	T CD4* (cls/mm ³)	% T CD4*	T CD8* (cls/mm ³)	% T CD8*	Tiempo de infección (años)	Tiempo en TAR* (años)	Tiempo en supresión virológica* (años)
1	53	M	667	1592	49	529	16,3	7	5	5
2	42	M	323	713	31	ND	ND	5	3	3
3	52	M	376	800	36,4	435,6	19,8	3	3	2,5

Tabla 5. Características clínicas del los individuos VIH-1+. Datos facilitados por el Hospital Ramón y Cajal de Madrid. *, indica los valores correspondientes al momento de toma de la muestra. M, masculino; cls, células; ND, no disponible.

3.2.21 Representación de los resultados y análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media o el promedio + SEM. Las figuras se realizaron con el programa GraphPad Prism. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (IBM) mediante la prueba *t* para muestras no relacionadas (*Unpaired Student's t test*). Se consideró estadísticamente significativo un valor de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$.

4. Resultados

4.1 Resultados

Sección 1

*LA PROTEÍNA NEF DEL VIH-1
COMO DIANA TERAPÉUTICA*



4.1 LA PROTEÍNA NEF DEL VIH-1 COMO DIANA TERAPÉUTICA

4.1.1 Identificación del motivo PGGP en la proteína Nef del VIH-1

Para identificar un dominio funcional nuevo en la proteína Nef que pudiera estar involucrado en la interacción con la proteína Lck se comparó la estructura primaria de las diferentes secuencias de la proteína Nef del VIH-1, VIH-2 y del VIS disponibles en la base de datos de Los Álamos (www.hiv.lanl.gov/). Para este fin se llevó a cabo un alineamiento de secuencias mediante el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

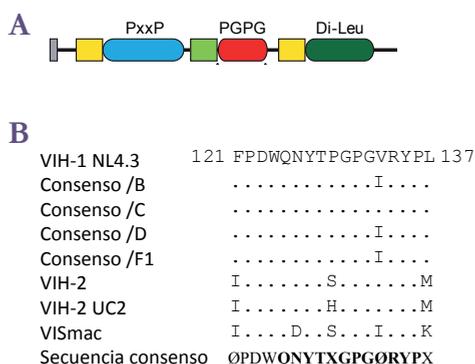


Figura 14. Organización y secuencia del dominio PGGP de la proteína Nef. A) Representación esquemática de la organización de la proteína Nef del VIH-1, VIH-2 y VIS. Se muestra en rojo, el dominio PGGP, en azul el dominio poli-prolina (PxxP), en verde oscuro el dominio di-leucina (Di-Leu), en gris el dominio de anclaje a membrana, en amarillo los grupos ácidos y en verde claro el dominio de dimerización. **B)** Alineación de la región 121-137 de la proteína Nef del VIH-1_{NL4.3} con secuencias homólogas de Nef del VIH-2 y del VIS. La secuencia consenso del dominio PGGP está resaltada en negrita. X representa cualquier residuo de aminoácido y Ø representa un residuo hidrofóbico.

Tal y como se muestra en la **figura 14**, la proteína Nef posee un elevado grado de conservación a lo largo de toda su extensión en los distintos aislados virales analizados, con importantes identidades en los motivos funcionales ya descritos en la literatura (Geyer y Peterlin, 2001). Entre ellos, destacan el dominio de anclaje a membrana, los dominios ácidos (61EEEE64), el de dimerización (121FPD123), el di-leucina (Di-Leu, 160ExxxLL165) y el dominio poli-prolina (PxxP, 72PxxP75). Además de estas similitudes, se encontró una región de secuencia muy conservada que comprendía los aminoácidos 125-136 de la proteína Nef del VIH-1. La secuencia consenso derivada para esta región, era QNYTXGPGØRYP, (**figura 14A, B**), donde X representa cualquier residuo de aminoácido y Ø representa un residuo hidrofóbico.

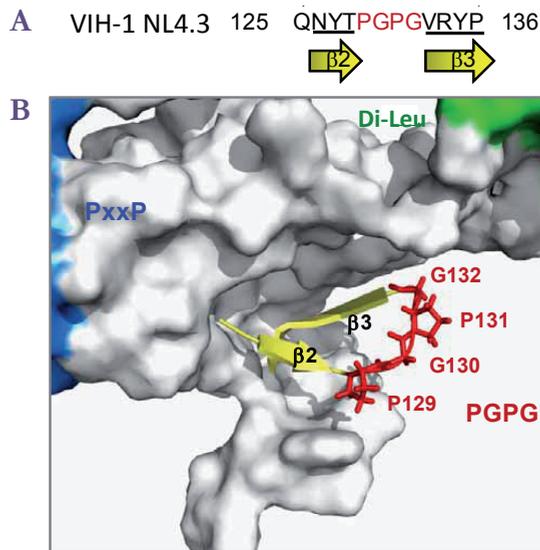


Figura 15. Estructura y conformación del dominio PGPG de la proteína Nef del VIH-1. **A)** Estructura lineal del dominio PGPG de la proteína Nef del VIH-1_{NL4.3}, con los aminoácidos centrales (PGPG) marcados en rojo y los aminoácidos flanqueantes que conforman las beta láminas subrayados. **B)** Representación tridimensional de la estructura terciaria de un fragmento de la proteína Nef mediante el programa Pymol (pdb2nef). Los residuos centrales del dominio PGPG (rojo) están flanqueados por las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ (amarillo). Las superficies de los dominios PxxP y Di-Leu están coloreadas en azul o verde, respectivamente.

Esta región está situada en el núcleo central de la proteína Nef, justo a continuación del dominio de dimerización. A nivel de estructura tridimensional (pdb2nef: obtenida de la base de datos *Protein Data Bank*) esta región forma un pequeño bucle flanqueado por dos láminas beta antiparalelas ($\beta 2$: NYT y $\beta 3$: VRYP), que dejan expuesto los aminoácidos hidrofóbicos centrales 129PGPG132 hacia la superficie de la proteína Nef del VIH-1 (**figura 15**). Debido a la repetición de esta secuencia, de aquí en adelante se denominará dominio PGPG a esta región de Nef.

Un estudio más pormenorizado de la estructura tridimensional de la proteína Nef del VIH-1 mediante el programa de visualización Pymol (www.pymol.org/) mostró que este bucle se encuentra expuesto en la superficie de la proteína y lo suficientemente separado tanto del dominio di-leucina como del dominio poli-prolina (**figura 15B**). Estos datos estructurales sugieren que el dominio PGPG podría mediar, de forma individual, en interacciones proteína-proteína entre Nef y factores del hospedador.



Para analizar el papel de este nuevo dominio en las funciones de Nef descritas previamente, se analizó la actividad de una colección de mutantes de sustitución por Ala en todo el dominio PGPG (**figura 16**), obtenidos por mutagénesis dirigida sobre plásmidos de expresión codificantes para la proteína Nef silvestre (WT) tal y como se describe en el apartado 3.2.2 de la Sección de Materiales y Métodos. Además, con el fin de comparar la actividad de estos mutantes con otros mutantes deficientes de Nef ya descritos, se estudió la actividad de las proteínas mutadas en los aminoácidos clave del dominio Di-Leu (L164L165/AA), en los del dominio PxxP (72PxxP75/AxxA) y en el dominio de dimerización (D123W124/AA) de la proteína Nef.

Nef WT (VIH-1 NL4.3) 121	<u>F</u> PDW <u>Q</u> NYTPGPGVRYPLTF 139
DW/AA	-- AA -----
QN/AA	--- AA -----
YT/AA	----- AA -----
PG1/AA	----- AA -----
PG2/AA	----- AA -----
VR/AA	----- AA -----
YP/AA	----- AA ---

Figura 16. Mutaciones realizadas en el dominio de dimerización y en el dominio PGPG de la proteína Nef del VIH-1. Los aminoácidos del dominio PGPG están subrayados.

4.1.2 El dominio PGPG está implicado en la disminución de la expresión en superficie de CD4 mediada por Nef en células T

De entre las numerosas funciones en linfocitos T, la proteína tirosina quinasa Lck promueve la estabilización de CD4 en la superficie de la membrana plasmática. Por ello, se ha sugerido que la etapa más temprana de la disminución de la expresión en superficie de CD4 mediada por Nef en células T debería implicar la desestabilización de la interacción entre Lck y CD4 (Collette y col., 1996).

Con el fin de analizar de forma sencilla el papel del dominio PGPG en la interacción entre Nef y Lck se evaluó el efecto de las mutaciones en el dominio PGPG en la actividad de Nef sobre los niveles de expresión en superficie de la molécula de CD4 en células T. Así, las células CEM se transfectaron transitoriamente con los correspondientes plásmidos de expresión codificantes para la proteína Nef (WT o mutada) fusionada a GFP.

La expresión de la molécula CD4 en superficie se analizó por citometría de flujo tal como se muestra en la **figura 17**. Se analizó la MFI de CD4 en la subpoblación que expresaba Nef-GFP y se comparó con la subpoblación no transfectada de cada punto.



La expresión de la forma silvestre de Nef (Nef-WT) produjo una disminución de los valores de CD4 en superficie de aproximadamente un 80% comparado con los valores de las células control sin transfectar. Por el contrario, la expresión del mutante deficiente Nef-LL/AA (deficiente para la interacción con los complejos adaptadores y, por tanto, para la internalización de moléculas de superficie mediada por clatrina) o del mutante de dimerización Nef-DW/AA, no produjo cambio alguno en los niveles de expresión de CD4 de superficie y mostraron niveles muy similares al de las células no transfectadas. Las células que expresaban los mutantes Nef-YT/AA, -PG2/AA, -VR/AA e -YP/AA, presentaron un perfil de expresión de CD4 comparable con el de las células que expresaban los mutantes deficientes Nef-LL/AA o -DW/AA, es decir, estas mutaciones inhibían la actividad de la proteína Nef sobre los valores de expresión de CD4 en la membrana plasmática. Las mutaciones QN/AA o PG1/AA también afectaron, aunque en menor medida, a la actividad de Nef, observándose una reducción del 50% en la capacidad de modular CD4 de membrana.

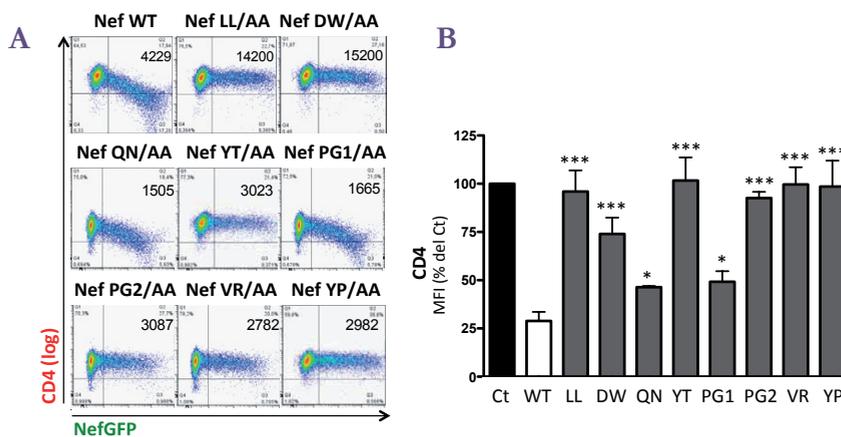


Figura 17. Las mutaciones en el dominio PGPG inhiben la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef. Las células CEM se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG, en el Di-Leu (LL) o en el de dimerización (DW) y 16 h después se analizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD4-PE la expresión de CD4 en la superficie de las células GFP positivas. **A)** Experimento representativo en el que se muestra la MFI de la población GFP positiva. **B)** Los histogramas representan la MFI de CD4 normalizada a 100% para el punto de células control sin transfectar (Ct, barra negra). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células transfectadas con Nef-WT y las transfectadas con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$.



Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo y, además, estudiar la distribución intracelular de la molécula de CD4, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal en células fijadas y permeabilizadas (**figura 18**).

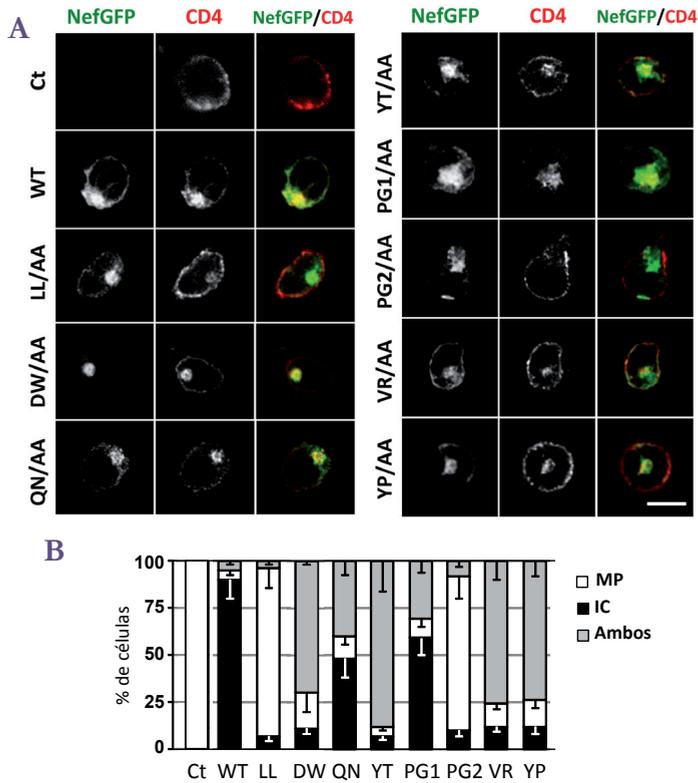


Figura 18. Efecto del dominio PPG de Nef en la distribución subcelular de CD4. Las células CEM se transfectaron con pNef-GFP WT, mutado en el dominio PPG, en el Di-Leu (LL/AA) o en el de dimerización (DW/AA) y 16 h después se analizó por inmunofluorescencia indirecta el patrón de expresión de CD4 (Alexa 555). **A)** Sección óptica media de una célula representativa. Ct, expresión de CD4 en una célula control no transfectada. Las áreas de co-localización se ven en amarillo en las imágenes fusionadas. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B)** La distribución de CD4 se calculó por densitometría como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los histogramas representan el porcentaje de células con distribución predominante de CD4 en la membrana plasmática, MP, (blanco), intracelular, IC, (negro) o ambos (gris). Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron más de 50 células por condición.



De acuerdo con los resultados de citometría de flujo, la expresión de la proteína Nef-WT produjo un descenso del 90% en la expresión de CD4 de superficie comparado con las células control no transfectadas, efecto que fue acompañado por un reclutamiento de CD4 en un compartimento membranosos intracelular positivo para Nef. Por el contrario, el 85% de células que expresaban Nef-LL/AA mostraron el fenotipo opuesto, es decir, niveles elevados de expresión en membrana plasmática y reducida acumulación de CD4 en compartimentos intracelulares. De forma similar, aquellas células transfectadas con el mutante de dimerización Nef-DW/AA o con los mutantes Nef-YT/AA, -VR/AA e -YP/AA del dominio PGPG, mostraban unos niveles elevados de CD4 tanto en la superficie como en compartimentos intracelulares, indicativo de una actividad parcial en la perturbación del tráfico intracelular de CD4. Sin embargo, la proteína mutante Nef-PG2/AA perdió completamente la actividad de Nef puesto que la distribución subcelular de CD4 fue comparable a la observada en células no transfectadas o en aquellas que expresaban el mutante defectivo Nef-LL/AA. Finalmente, las proteínas mutantes Nef-QN/AA y -PG1/AA eran capaces de reducir los niveles de CD4 de superficie pero en menor medida que la proteína Nef-WT aunque inducían una fuerte acumulación de CD4 en compartimentos intracelulares, mostrando, por tanto, una actividad significativamente reducida.

Para descartar que estos efectos observados no fueran debido a diferentes valores de expresión entre la proteína salvaje y las proteínas mutantes se estudió por *western-blot* que los valores de expresión eran equiparables utilizando anticuerpos anti-GFP para reconocer la proteína de fusión Nef-GFP y anti- γ -Adaptina como control de carga (figura 19).

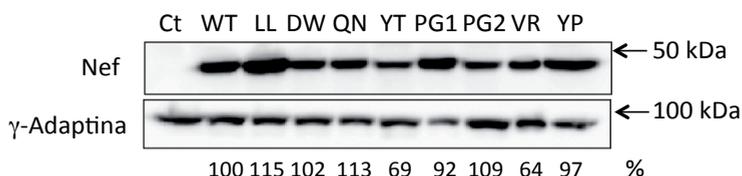


Figura 19. Niveles de expresión de la proteína Nef en células CEM. Las células CEM se transfectaron con pNef-GFP WT, mutado en el dominio PGPG o en el Di-Leu (LL) y 16 h después se analizó por *western-blot* utilizando un anticuerpo anti-GFP la expresión de Nef, que fue cuantificada por densitometría y expresada normalizando el valor de expresión de Nef WT a 100%. Los niveles de expresión de γ -Adaptina se utilizaron como control de carga. Ct, célula control no transfectada.



Estos resultados se confirmaron en linfocitos T primarios mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo y de inmunofluorescencia (figura 20).

En resumen, los datos indican que la integridad del dominio PGPG es necesaria para la disminución de CD4 de la membrana plasmática de células T.

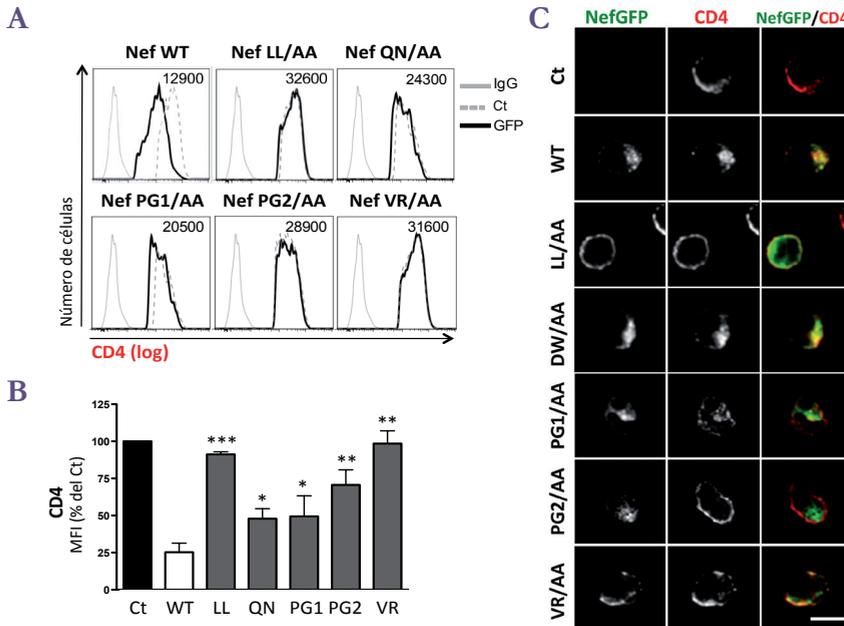


Figura 20. Las mutaciones en el dominio PGPG inhiben la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef en linfocitos T primarios. Las CMSP se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutada (barras grises) en el dominio PGPG o en el Di-Leu (LL/AA) y 16 h después se analizó el patrón de expresión de CD4 en la superficie de las células CD3 positivas y GFP positivas por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD4-PC7 (A, B) o su distribución subcelular por inmunofluorescencia indirecta (Alexa 555) (C). **A**) Experimento en el que se muestra la MFI de CD4 en células que expresan Nef-GFP (línea negra), las células control (Ct) no transfectadas (línea gris punteada) o células teñidas con anti-IgG (línea gris). **B**) Los histogramas representan la MFI de CD4 normalizada a 100% para el punto de células Ct (barra negra). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. **C**) Sección óptica media de una célula representativa. Las áreas de co-localización se ven en amarillo en las imágenes fusionadas. La barra de escala corresponde a 10 μ m. La estadística se realizó entre las células transfectadas con Nef-WT y las transfectadas con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



4.1.3 La dependencia del motivo PGGP para la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef está relacionada con la expresión de Lck

Dado que la proteína Lck estabiliza la molécula de CD4 en la superficie de las células T, los resultados anteriores sugieren que la dependencia del dominio PGGP de la proteína Nef observada en linfocitos T podría estar únicamente relacionada con la expresión de la proteína Lck. Para comprobar esta posibilidad se analizó la expresión de CD4 en superficie en células carentes de esta tirosina quinasa y, para este fin, las células HeLa-CD4 se transfectaron transitoriamente con los correspondientes plásmidos de expresión codificantes para la proteína Nef (WT o mutada) fusionada a GFP. La expresión de la molécula CD4 en superficie se analizó por citometría de flujo (**figura 21**) así como por inmunocitoquímica y posterior análisis por microscopía confocal en células fijadas (**figura 22**). La **figura 21** muestra el análisis de la MFI de CD4 en la subpoblación que expresaba Nef-GFP comparada con la subpoblación no transfectada de cada punto. La expresión de Nef-WT produjo una disminución de los valores de CD4 en superficie de aproximadamente un 80% comparado con los valores de las células control sin transfectar.

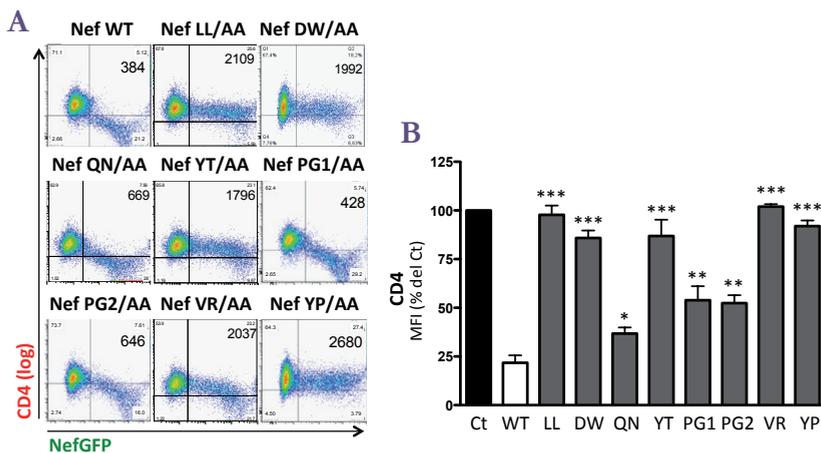


Figura 21. Efecto de las mutaciones en el dominio PGGP de Nef en la expresión de CD4 en la membrana plasmática de células HeLa-CD4. Las células HeLa-CD4 se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGGP, en el Di-Leu (LL/AA) o en el de dimerización (DW/AA) y 16 h después se analizó la expresión de CD4 en la superficie de las células GFP positivas por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD4-PE. **A)** Experimento representativo en el que se muestra la MFI de la población GFP positiva. **B)** Los histogramas representan la MFI de CD4 normalizada a 100% para el punto de células control sin transfectar (Ct, barra negra). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células transfectadas con Nef-WT y las transfectadas con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



Por el contrario, la expresión del mutante deficiente Nef-LL/AA o del mutante de dimerización Nef-DW/AA, no produjo cambio alguno en los niveles de expresión de CD4 de superficie y mostraron niveles muy similares al de las células no transfectadas. Del mismo modo, las proteínas mutantes Nef-YT/AA, -VR/AA e -YP/AA fueron, al igual que en células T, totalmente defectivas en cuanto a disminución de CD4 de superficie. Así, aquellas células que expresaban estos mutantes mostraban un fenotipo muy similar al de una célula no transfectada, con unos niveles de expresión muy similares a los observados en células que expresaban el mutante LL/AA o el mutante estructural Nef-DW/AA. En cambio, las células que expresaban las proteínas mutantes Nef-QN/AA, -PG1/AA y -PG2/AA, proteínas que, en células T presentaban una actividad de Nef parcial o totalmente reducida, presentaron una disminución de CD4 de aproximadamente un 50%, es decir, estas mutaciones no eran totalmente defectivas para esta función de Nef en células carentes de Lck. Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia corroboraron los resultados de citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 22** la expresión de la proteína Nef-WT y -QN/AA produjo un descenso en la expresión en superficie de CD4 comparado con las células control no transfectadas.

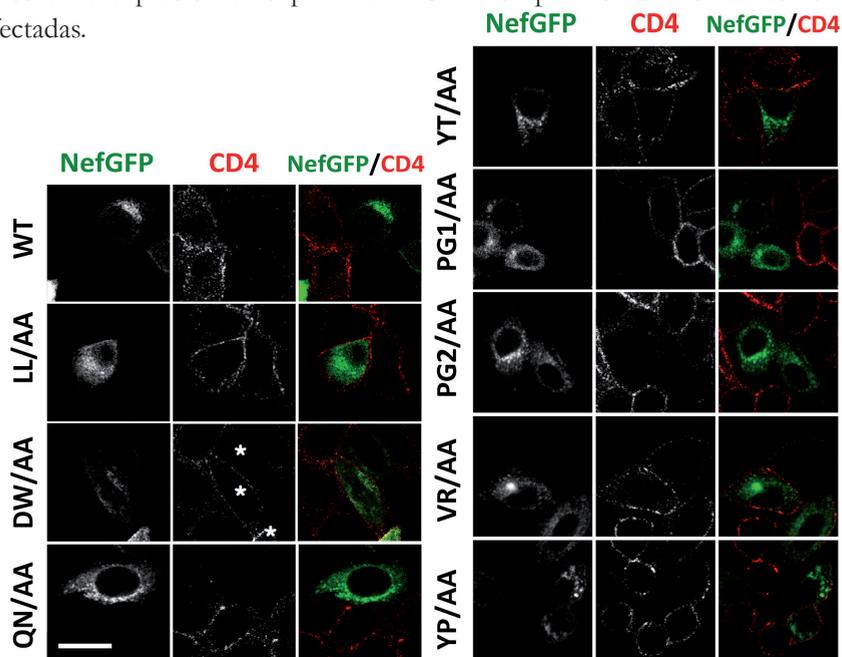


Figura 22. Efecto de las mutaciones en el dominio PGP de Nef en la expresión de CD4 en la membrana plasmática de células HeLa-CD4. Las células HeLa-CD4 se transfectaron con pNef-GFP WT, mutado en el dominio PGP, en el Di-Leu (LL/AA) o en el de dimerización (DW/AA) y 16 h después se analizó el patrón de expresión de CD4 (Alexa 555) en la superficie celular por inmunofluorescencia indirecta. Sección óptica media de una célula representativa. La barra de escala corresponde a 10 μ m.



Por el contrario, las células que expresaban Nef-LL/AA, -DW/AA, -YT/AA, -VR/AA e YP/AA mostraron el fenotipo opuesto, es decir, elevados niveles de expresión en membrana. Sin embargo, las proteínas mutantes Nef-PG1/AA y -PG2/AA eran capaces de reducir los niveles de CD4 de superficie aunque en menor medida que la proteína Nef-WT. A la vista de los resultados obtenidos en Hela-CD4, parece que el papel de los aminoácidos centrales del dominio PGPG sólo se manifestó en aquellas células que expresaban la proteína Lck. Para corroborar este hecho, se co-transfectaron transitoriamente las células Hela-CD4 con plásmidos de expresión de la proteína Nef-WT o mutada en los aminoácidos centrales del dominio PGPG, junto con un plásmido vacío o con un plásmido de expresión codificante para la proteína Lck. La eficiencia de transfección y los niveles de expresión de las proteínas Nef y Lck se analizaron por *western-blot* utilizando anticuerpos anti-GFP o anti-HA para reconocer las proteínas de fusión Nef-GFP, Lck-GFP o Nef-HA y anti- γ -Adaptina como control de carga (**figura 23**).

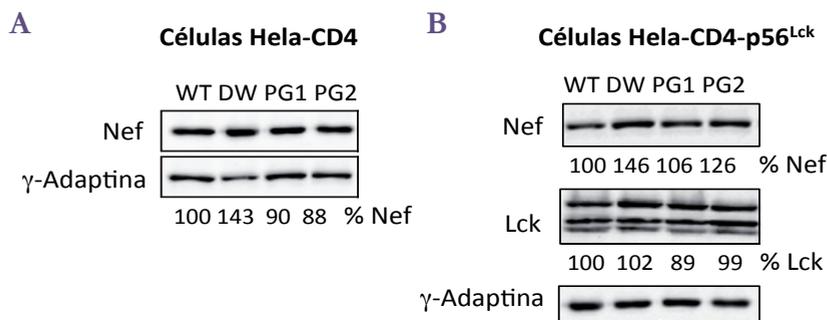


Figura 23. Niveles de expresión de la proteína Nef y Lck en células Hela-CD4 co-transfectadas. Las células HeLa-CD4 se co-transfectaron con pNef-GFP WT, mutado en los aminoácidos centrales del dominio PGPG o en el de dimerización (DW) junto con un plásmido vacío (**A**) o con pNef-HA WT, mutado en el dominio PGPG o en el de dimerización (DW) junto con un plásmido codificante para la proteína Lck-GFP (**B**) y 16 h después se analizó por *western-blot* la expresión de Nef y de Lck utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-HA y fue cuantificada por densitometría y expresada normalizando el valor de expresión de las células transfectadas con Nef-WT a 100%. Los niveles de expresión de γ -Adaptina se utilizaron como control de carga.



Los niveles de expresión en superficie de la molécula CD4 se cuantificaron por citometría de flujo (figura 24) y por inmunofluorescencia (figura 25). Como se puede observar en ambos tipos de pruebas, las proteínas mutantes Nef-PG1/AA y -PG2/AA mostraron una actividad muy cercana a la proteína Nef-WT en las células deficientes en Lck. De hecho, aquellas células que expresaban estos mutantes mostraban un notable descenso de los niveles de CD4 en superficie presentando valores que no eran significativamente diferentes al de aquellas células que expresaban la proteína Nef-WT.

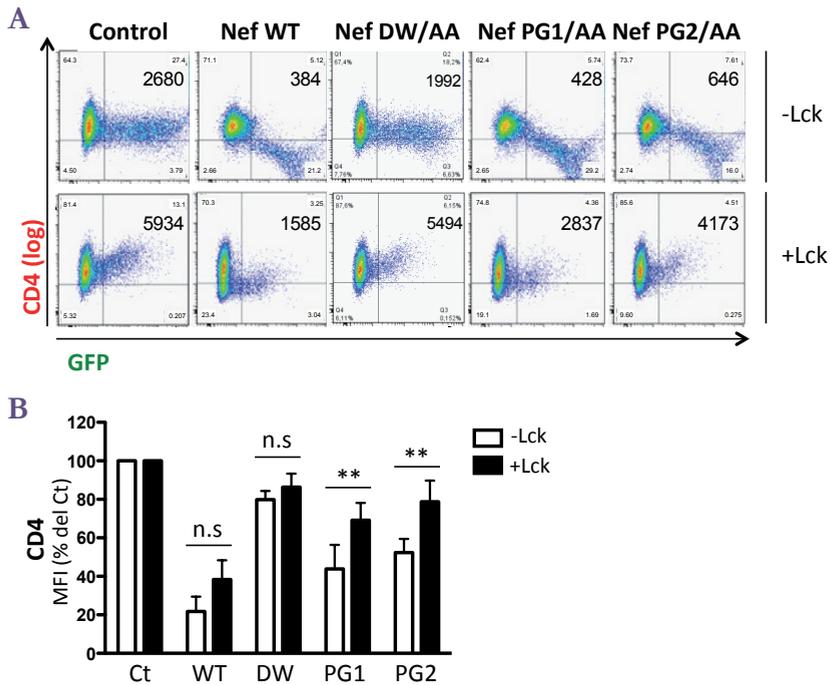


Figura 24. La dependencia del motivo PGP para la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef está relacionada con la expresión de Lck. Las células HeLa-CD4 se co-transfectaron con pGFP o pNef-GFP WT, mutado en los aminoácidos centrales del dominio PGP o en el de dimerización (DW/AA) junto con un plásmido vacío (-Lck, paneles superiores y barras blancas) o con pNef-HA WT, mutado en los aminoácidos centrales del dominio PGP o en el de dimerización (DW/AA) junto con un plásmido codificante para la proteína Lck-GFP (+Lck, paneles inferiores y barras negras) y 16 h después se analizó la expresión de CD4 en la superficie de las células GFP positivas por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD4-PE. **A**) Experimento representativo en el que se muestra la MFI de la población GFP positiva. **B**) Los histogramas representan la MFI de CD4 normalizada a 100% para el punto de células control (Ct) transfectadas con GFP (arriba) o con Lck-GFP (abajo). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células -Lck y +Lck. n.s, no significativo; **, $p \leq 0,01$.

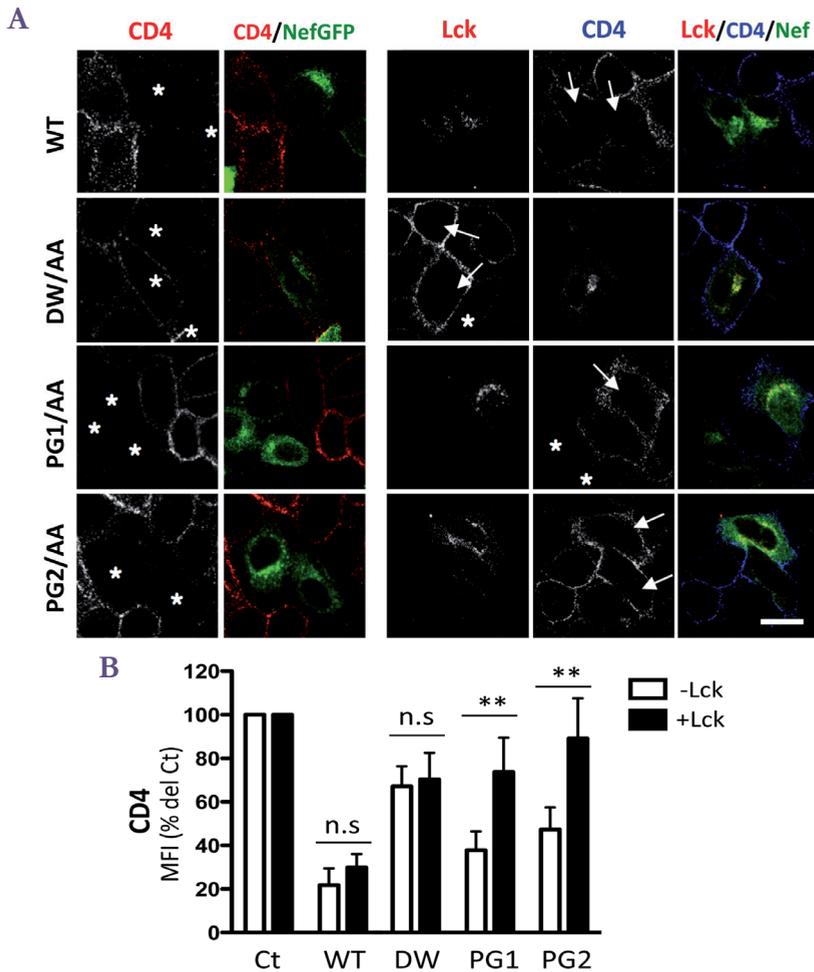


Figura 25. La dependencia del motivo PGGP para la disminución de CD4 de superficie mediada por Nef está relacionada con la expresión de Lck. Las células HeLa-CD4 se co-transfectaron con pNef-GFP WT, mutado en los aminoácidos centrales del dominio PGGP o en el de dimerización (DW/AA) junto con un plásmido vacío (-Lck, paneles de la izquierda y barras blancas) o un plásmido codificante para la proteína Lck-Cherry (+Lck, paneles de la derecha y barras negras) y 16 h después se analizó por inmunofluorescencia indirecta la expresión de CD4 (Alexa 555 en los paneles de la izquierda y Alexa 647 en los paneles de la derecha) en la superficie de las células. **A)** Sección óptica media de una célula representativa. Las células solamente positivas para Nef-GFP se indican mediante asteriscos, mientras que las células co-transfectadas se indican mediante flechas. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B)** La expresión en superficie de CD4 se cuantificó por densitometría como se describe en Materiales y Métodos y se normalizó a 100% para el punto de células control sin transfectar (Ct). Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron más de 50 células por condición. La estadística se realizó entre las células -Lck y +Lck. n.s, no significativo; **, $p \leq 0,01$.



Por otro lado, se observó que la expresión ectópica de Lck revirtió el fenotipo defectivo de los mutantes -PG1/AA y -PG2/AA. De hecho, en las células HeLa-CD4 co-transfectadas con el plásmido de expresión codificante para Lck y los mutantes de Nef se observaba una pérdida de actividad de Nef respecto al efecto sobre los niveles de CD4 de superficie, con valores muy similares a los ya observados en las células T (figuras 17, 18 y 20).

Ya que el papel de los aminoácidos centrales del dominio PGPG sólo se manifiesta en aquellas células que expresan la proteína Lck, estos resultados indican su posible relación funcional con esta tirosina quinasa y excluyen cualquier tipo de efecto que su mutación podría tener sobre la estructura de la proteína Nef.

4.1.4 Las mutaciones en los aminoácidos centrales del dominio PGPG no afectan a las funciones dependientes del motivo di-leucina de Nef

En la **tabla 6** se resume la actividad de Nef-WT y de los mutantes generados en el dominio PGPG en cuanto a la disminución de la expresión de CD4 en las distintas condiciones estudiadas: células T (Lck endógena), células HeLa-CD4 (que no expresan Lck), o células HeLa-CD4-Lck (con expresión ectópica de Lck).

La proteína Nef-WT disminuyó la expresión de CD4 en superficie en todos los sistemas celulares analizados, mientras que los mutantes defectivos Nef-LL/AA y Nef-DW/AA perdieron esta función independientemente de la expresión de Lck.

Nef VIH-1	CEM	Hela-CD4	Hela-CD4-Lck
WT	+	+	+
LL/AA	-	-	-
DW/AA	-	-	-
QN/AA	+/-	+/-	+/-
YT/AA	-	-	-
PG1/AA	+/-	+	+/-
PG2/AA	-	+/-	-
VR/AA	-	-	-
YP/AA	-	-	-

Tabla 6. Disminución de la expresión de CD4 en superficie mediada por Nef. Resumen de la capacidad de la proteína Nef WT, mutada en el dominio PGPG, en el Di-Leu (LL/AA) o en el de dimerización (DW/AA) de disminuir la expresión de CD4 en superficie en los distintos modelos celulares evaluados. +, capaz de disminuir CD4; -, incapaz de disminuir CD4; +/-, fenotipo intermedio.



La mayoría de los mutantes del dominio PGPG (Nef-QN/AA, Nef-YT/AA, -VR/AA e -YP/AA) presentaron el mismo fenotipo de disminución de CD4 independientemente de la expresión de Lck, ya sea manteniendo unos niveles intermedios de actividad (Nef-QN/AA) o una pérdida prácticamente total de la actividad (Nef-YT/AA, -VR/AA e -YP/AA). Cabe señalar que estos residuos mutados forman parte de las láminas beta 2 y 3 de la estructura secundaria de la proteína, por lo que la pérdida de función de estas proteínas podría deberse a un mal plegamiento o a pérdida de estabilidad de las proteínas mutantes. Sin embargo, las proteínas mutantes Nef-PG1/AA y -PG2/AA presentaron un perfil de actividad respecto a la expresión de CD4 distinto en función de la presencia o no de Lck. De hecho, son parcial o totalmente defectivas en células que expresan Lck pero casi totalmente activas en células carentes para Lck, por lo que es de suponer que la pérdida de actividad observada en células T o en HeLa-CD4-Lck no fue debida a alteraciones en la estructura de la proteína o a efectos en otros dominios de la proteína necesarios para la disminución en la superficie de CD4.

Para corroborar estos resultados se analizaron dos funciones de Nef que son dependientes de la integridad de la proteína: la interacción con el complejo adaptador de clatrina AP-1 (Craig y col., 2000) y la alteración del tráfico endosomal del receptor de la transferrina (Tf-R) (Madrid y col., 2005).

El estudio de la interacción *in vitro* entre Nef y AP-1 se realizó mediante ensayos de *pull-down* empleando las proteínas recombinantes GST-Nef y extractos citosólicos de células HeLa-CD4. Como se muestra en la **figura 26**, la proteína Nef-WT se unió eficientemente el complejo AP-1 tal y como muestra el *western-blot* revelado con un anticuerpo anti- γ -Adaptina dirigido contra la unidad gamma del complejo AP-1. Por el contrario, el mutante defectivo Nef-LL/AA mostró una débil o nula interacción, con un rendimiento de recuperación similar al de la proteína GST control. Cabe destacar que las mutaciones PG1/AA o PG2/AA no afectaron a la eficiencia de unión Nef/AP-1. Estos resultados no se debían a diferencias en la cantidad de proteína recombinante empleada en el experimento, ya que la tinción con rojo Ponceau mostró cómo la carga de las proteínas GST fue homogénea, a excepción de Nef-WT y Nef-PG2/AA, que parecían ser un poco menos abundantes. Cabe destacar que si la estructura de la proteína estuviera afectada por estas mutaciones, muy probablemente la cantidad de recuperación de AP-1 se vería drásticamente reducida.

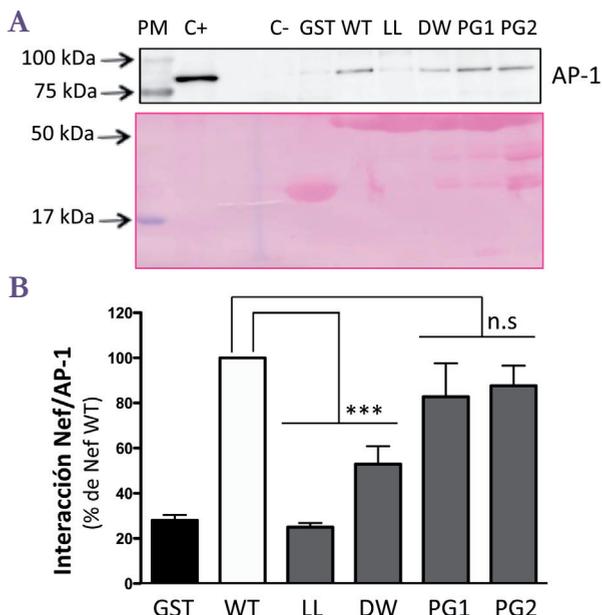


Figura 26. Ensayo de interacción *in vitro* entre Nef y AP-1. Cantidades equivalentes de la proteína GST (barra negra) o GST-Nef WT (barra blanca), mutada (barras grises) en el dominio Di-Leu (LL/AA) o en el motivo PGPG (PG1/AA y PG2/AA) inmovilizadas en esferas de sefarosa recubiertas con glutatión se incubaron con lisados de células HeLa-CD4. Las proteínas unidas fueron separadas mediante SDS-PAGE y la asociación del complejo AP-1 fue analizada por *western-blot* con un anticuerpo anti- γ -Adaptina y se cuantificó por densitometría. **A)** Arriba, *western-blot* representativo de un experimento. Abajo, tinción de rojo Ponceau, que muestra la cantidad de GST utilizada en el ensayo de interacción. PM, marcador de peso molecular; C+, lisado inicial de HeLa-CD4; C-, esferas de sefarosa recubiertas con glutatión sin proteína GST unida. **B)** La unión con AP-1 se determinó como la cantidad de AP-1 cuantificada por densitometría en el *western-blot* y se normalizó a 100% el valor obtenido con la proteína Nef-WT. Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre los valores de interacción obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. n.s, no significativo; ***, $p \leq 0,001$.

La segunda actividad de Nef dependiente del dominio di-leucina analizada fue el reclutamiento intracelular del receptor de transferrina (Tf-R). En condiciones normales, tras unir su ligando en la superficie de la membrana plasmática, el Tf-R se internaliza a través de vesículas recubiertas de clatrina, circula por un compartimento endosomal temprano y, a partir de éste, se recicla a la membrana plasmática (Hao y Maxfield, 2000). En presencia de la proteína Nef del VIH-1, la tasa de internalización de Tf-R no se ve afectada, pero se observa una disminución en la tasa de reciclaje a la membrana plasmática provocando una disminución en la expresión en superficie del mismo (Madrid y col., 2005).



Para estudiar la distribución intracelular de la molécula de Tf-R, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal en células fijadas y permeabilizadas. La expresión de la proteína Nef-WT produjo un descenso del 80% en la expresión de Tf-R en superficie comparado con las células control no transfectadas, efecto que fue acompañado por un reclutamiento de Tf-R en un compartimento membranoso intracelular positivo para Nef (**figura 27**). Por el contrario, el 90% de células que expresaban Nef-LL/AA mostraron el fenotipo opuesto, es decir, elevados niveles de expresión en membrana plasmática y reducida acumulación de Tf-R en compartimentos intracelulares. El fenotipo de las células transfectadas con Nef-PG1/AA o -PG2-AA fue muy similar al que presentaban las células trasfectadas con Nef-WT, indicando que las mutaciones en el dominio PGPG no afectan a la función del dominio di-leucina y/o a la estructura global de la proteína.

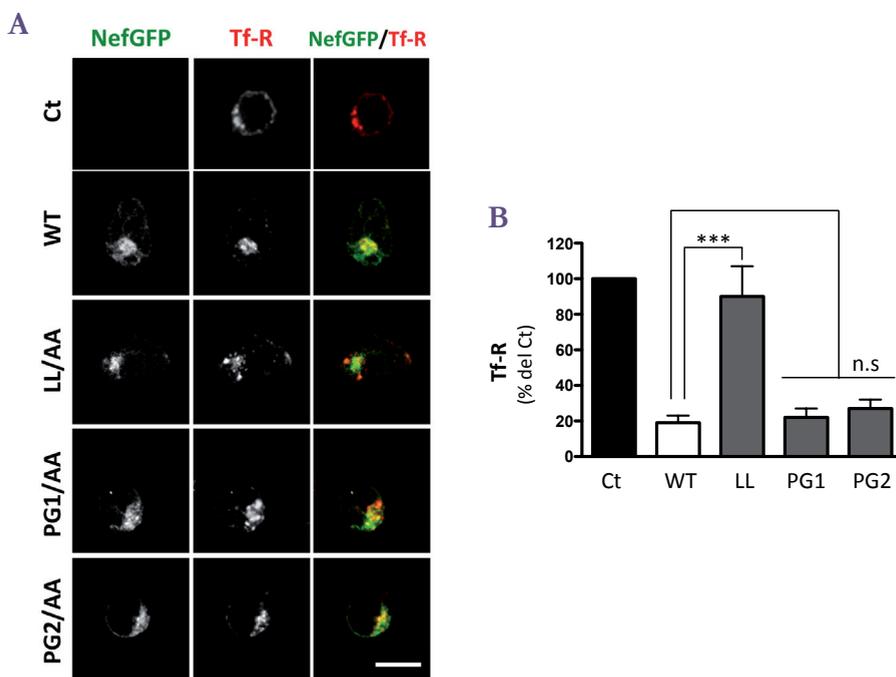


Figura 27. Efecto de Nef en el tráfico del receptor de Transferrina (Tf-R). Las células CEM se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG o en el Di-Leu (LL/AA) y 16 h después se analizó por inmunofluorescencia indirecta el patrón de expresión del Tf-R (Alexa 555). **A**) Sección óptica media de una célula representativa. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B**) La intensidad de fluorescencia correspondiente al Tf-R se cuantificó por densitometría como se describe en Materiales y Métodos y se normalizó a 100% para el punto de células control sin transfectar (Ct, barra negra). Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron más de 50 células por condición. La estadística se realizó entre las células transfectadas con Nef-WT y las transfectadas con los distintos mutantes de Nef. n.s., no significativo; ***, $p \leq 0,001$.



4.1.5 El motivo PGPG es necesario para la interacción entre Nef y el dominio SH2 de Lck

Teniendo en cuenta que la funcionalidad del motivo PGPG en cuanto a disminución de CD4 de la superficie celular sólo fue evidente en células que expresaban Lck, todo parecía indicar que el motivo PGPG sería un nuevo determinante molecular de Nef que podría ser necesario para la interacción de la proteína Nef del VIH-1 con Lck. Con el fin de estudiar este hecho, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* mediante la técnica de *pull-down*, empleando las proteínas de fusión GST-Lck-SH3, GST-Lck-SH2 y GST-Lck-SH3SH2. Para cada ensayo de interacción se purificaron las proteínas recombinantes con esferas de sefarosa recubiertas de glutatión, comprobando en gel de poliacrilamida el tamaño, la expresión y la pureza adecuada de las mismas (**figura 28**). Una vez purificadas, las proteínas recombinantes se incubaron con extractos citosólicos de células HeLa-CD4 que expresaban las proteínas Nef-HA, bien en su forma WT, mutada en el motivo PGPG o mutada en el dominio poli-prolina (69PxxP78/AxxA) como control de interacción con el dominio SH3 de Lck (Saksela y col., 1995; Collette y col., 1996).

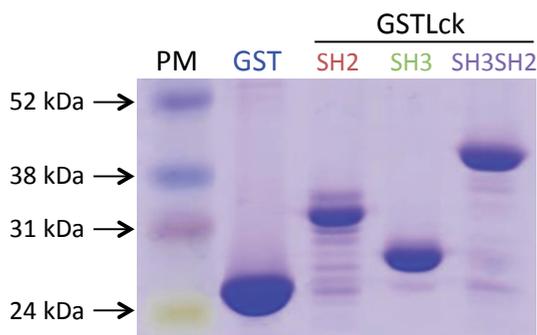


Figura 28. Purificación de las proteínas GST, GSTLck-SH2, GSTLck-SH3 ó GSTLck-SH3SH2. Las proteínas recombinantes se obtuvieron como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los productos de la purificación se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* para comprobar el tamaño adecuado de cada proteína recombinante, la pureza y para cuantificar la cantidad de proteína. PM, marcador de peso molecular.

El resultado de la interacción se analizó por *western-blot* utilizando un anticuerpo anti-HA para reconocer la proteína Nef unida (**figura 29A**). Como control negativo de la técnica se realizó en paralelo el *pull-down* de los mismos lisados con la proteína GST purificada. Como se observa en la **figura 29**, la proteína Nef-WT interaccionaba de forma eficiente

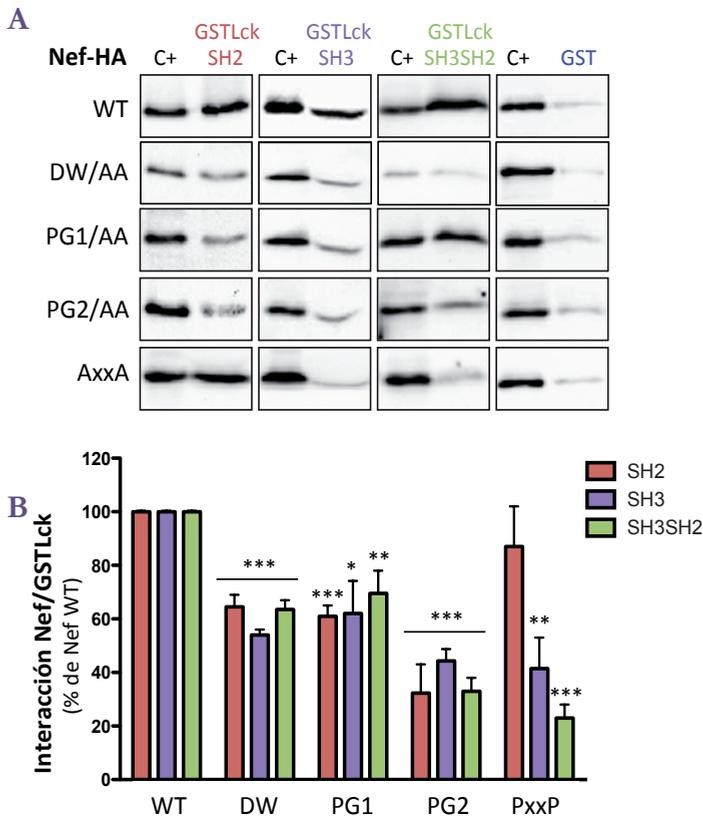


Figura 29. Ensayo de interacción *in vitro* entre Nef y los dominios SH de Lck. Las células HeLa-CD4 se transfectaron con pNef-HA WT, mutado en el motivo PGPG o en el dominio poli-prolina (AxxA). 16 h después de la transfección, las células HeLa se lisaron y se incubaron durante 12 h a 4°C con 3 mg de las proteínas GST, GSTLck-SH2, GSTLck-SH3 o GSTLck-SH3SH2 inmovilizadas en esferas de sefarosa recubiertas con glutatión. Las proteínas unidas fueron separadas mediante SDS-PAGE y la cantidad de Nef recuperada fue analizada por *western-blot* con un anticuerpo anti-HA y se cuantificó por densitometría. **A)** *Western-blot* representativo de un experimento. C+, lisado inicial de HeLa. **B)** La unión de Nef con los motivos SH de Lck se determinó como la cantidad de Nef cuantificada por densitometría en el *western-blot* y se normalizó a 100% el valor obtenido con la proteína Nef-WT. Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre los valores de interacción obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



con el dominio SH3 y con el SH2. La interacción de Nef con los dos dominios en tándem resultó ser incluso más eficiente que con cada dominio por separado, resultado que concuerda con el efecto sinérgico de la interacción Nef/Lck descrito por Dutartre y colaboradores (Dutartre y col., 1998). Como cabía esperar, la proteína mutante Nef-AxxA no interactuó con el dominio SH3 mientras que su unión al dominio SH2 fue tan eficiente como el observado con la proteína Nef-WT. Sin embargo, la interacción con SH3SH2 fue prácticamente nula, indicando que la interacción con SH3 es necesaria para estabilizar la unión con la proteína Lck a través del dominio SH2. Las mutaciones -PG1/AA o -PG2/AA disminuyeron de forma significativa (un 46% y un 69%, respectivamente) la interacción con el dominio SH2. Además, y de forma inesperada, la interacción con el dominio SH3 también se vio afectada, a pesar de la presencia del dominio PxxP intacto en ambos mutantes. Como consecuencia, las mutaciones PG1/AA y PG2/AA disminuyeron en 23% y 67% respectivamente la interacción con SH3SH2. A la vista de los resultados parecía que los aminoácidos centrales del dominio PGPG, pero sobretodo los residuos P131G132 estaban implicados en la interacción de Nef con Lck. Los datos indican que se necesita el motivo PGPG para la interacción de Nef con el dominio SH2 de Lck, y que este paso es primordial para la subsiguiente interacción del dominio PxxP de Nef con el dominio SH3 de Lck, y por lo tanto, para la unión y estabilización del complejo Nef/Lck.

4.1.6 El motivo PGPG está implicado en el reclutamiento intracelular de Lck

La expresión de Nef en células T induce la acumulación de Lck en un compartimento intracelular y afecta a su fosforilación y a su actividad quinasa (Thoulouze y col., 2006; Haller y col., 2007). Puesto que en el apartado anterior se ha mostrado que el motivo PGPG está implicado en la interacción con Lck, el siguiente objetivo fue estudiar si este motivo era también necesario para el reclutamiento intracelular y el estado de fosforilación de Lck mediados por Nef.

Para ello se transfectaron células Jurkat con plásmidos de expresión codificantes para Nef-GFP y tras 16 horas se realizó una tinción intracelular de la proteína Lck mediante técnicas de inmunohistoquímica empleando dos anticuerpos diferentes: un anticuerpo anti-Lck, para el marcaje total de Lck, y un anti-pY505/394Lck, que reconoce la forma fosforilada de Lck en los residuos Tyr 505/394. Como se muestra en la **figura 30**, en las células control no transfectadas, la proteína Lck se localizaba de forma mayoritaria en la capa interna de la membrana plasmática, y escasamente en un compartimento pericentriolar. La expresión de la proteína Nef-WT o de la proteína



mutante Nef LL/AA promovió una reducción significativa de la expresión de Lck en la membrana plasmática, induciendo su secuestro en un compartimento intracelular. Es de destacar que este acúmulo intracelular corresponde mayoritariamente a la forma pY505/394Lck tal y como lo delata la tinción con el anticuerpo específico empleado en este ensayo. La proteína mutante Nef-PG1/AA también fue capaz de acumular Lck en el compartimento intracelular, dato que está en relación con los resultados de

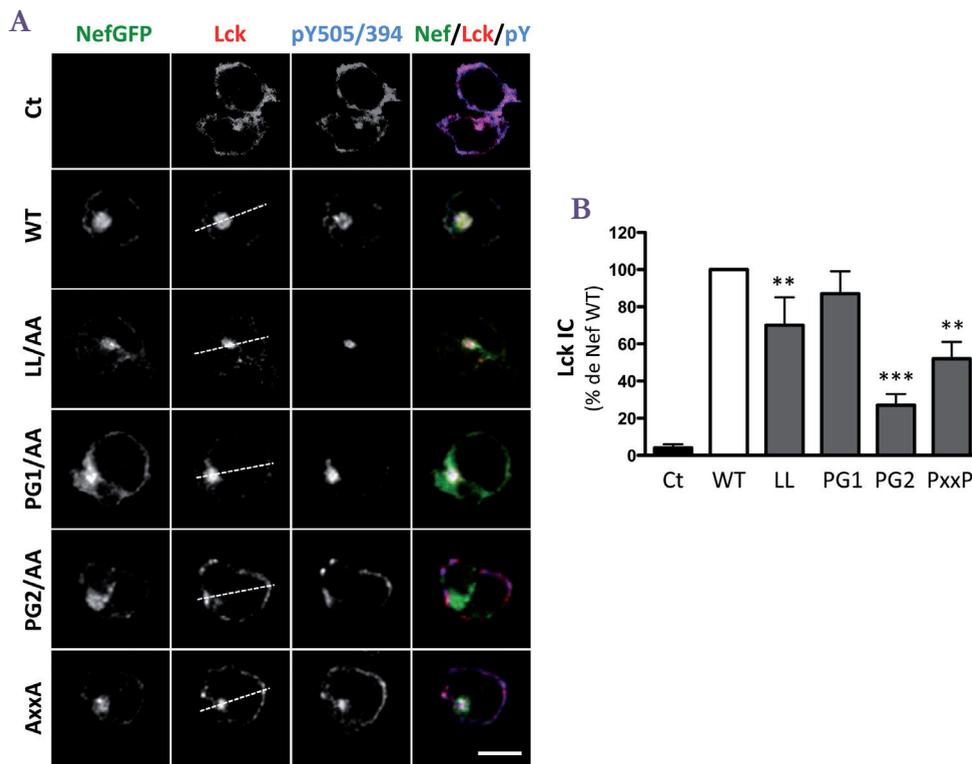


Figura 30. Papel del motivo PGPG en el reclutamiento intracelular de Lck mediado por Nef. Las células Jurkat se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG, en el Di-Leu (LL/AA) o en el poli-prolina (AxxA) y 16 h después se analizó por inmunofluorescencia indirecta la distribución subcelular de Lck (Alexa555) endógena total o fosforilada en Y505 (pY505Lck) (Alexa647). **A**) Sección óptica media de una célula representativa. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B**) El porcentaje de células con altos niveles de Lck intracelular se cuantificó como se describe en Materiales y Métodos. Los histogramas representan las células con localización de Lck predominantemente intracelular y se normalizó a 100% para el punto de células transfectadas con NefGFP-WT. Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron 25 células por condición. Ct, célula control sin transfectar (barra negra). La estadística se realizó entre los valores obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



interacción obtenidos entre la proteína Nef-PG1/AA y la proteína GST-Lck-SH3SH2. Por el contrario, la mutación PG2/AA así como la mutación en el dominio poli-prolina (AxxA) provocaron una pérdida de la capacidad de Nef de secuestrar a Lck en el compartimento intracelular. De hecho, el 75% de las células transfectadas con Nef-PG2/AA y el 50% de las transfectadas con Nef-AxxA presentaron un patrón de expresión de Lck, mayoritariamente fosforilada en Y505/394, en membrana.

Estos resultados se confirmaron en linfocitos T primarios (**figura 31**) y se demostró que la integridad de los aminoácidos centrales P131G132 del motivo PGPG de Nef también se requiere para el reclutamiento intracelular de pY505/394Lck.

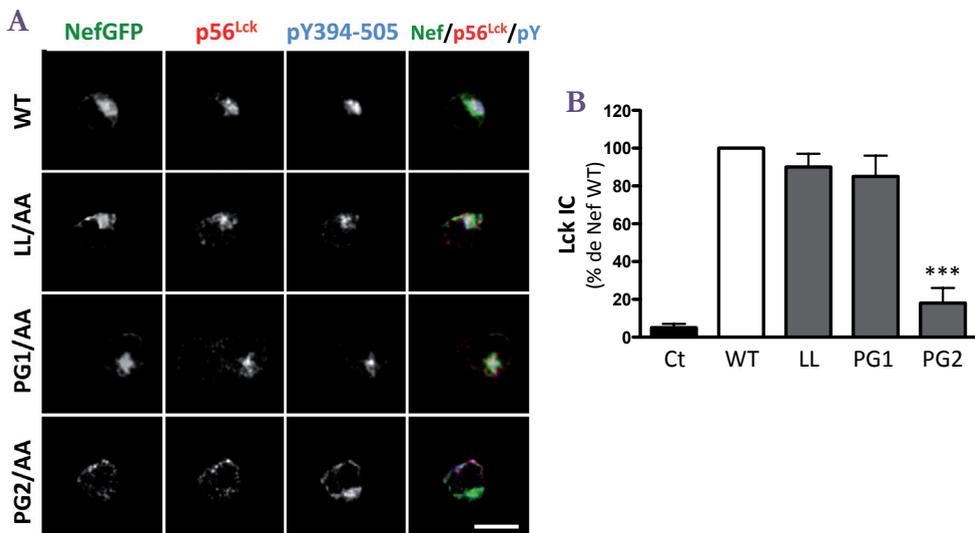


Figura 31. Papel del motivo PGPG en el reclutamiento intracelular de Lck mediado por Nef en linfocitos T primarios. Las CMSP se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG o en el Di-Leu (LL/AA) y 16 h después se analizó por inmunofluorescencia indirecta la distribución subcelular de Lck (Alexa555) endógena total o fosforilada en Y505/394 (pY505/394Lck) (Alexa647). **A)** Sección óptica media de una célula representativa. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B)** El porcentaje de células con altos niveles de Lck intracelular se cuantificó como se describe en Materiales y Métodos. Los histogramas representan las células con localización de Lck predominantemente intracelular y se normalizó a 100% para el punto de células transfectadas con NefGFP-WT. Los valores son la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron 25 células por condición. Ct, célula control sin transfectar (barra negra). La estadística se realizó entre los valores obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. ***, $p \leq 0,001$.



4.1.7 Papel del motivo PGGP en funciones dependientes del dominio PxxP: inhibición de la reorganización de actina tras la inducción del TCR y disminución de la expresión en superficie del CMH-I

Los resultados obtenidos en los experimentos de interacción Nef/Lck indican que el motivo Nef-PGGP podría cooperar con el dominio Nef-PxxP a la hora de estabilizar el complejo de interacción Nef/Lck, y en el reclutamiento intracelular de la quinasa. El siguiente objetivo fue estudiar si el motivo PGGP podría estar implicado en otras funciones de Nef dependientes del dominio PxxP como la reorganización de los filamentos de actina subcortical en el establecimiento de la sinapsis inmunológica (Fackler y col., 2007), y la inducción de la disminución de la expresión en la membrana plasmática del CMH-I (Greenberg y col., 1998; Roeth y col., 2004).

En linfocitos T infectados por el VIH-1, Nef inhibe la reorganización de actina que ocurre tras la estimulación exógena del TCR debido al reconocimiento de antígenos expuestos por células presentadoras, impidiendo así la formación de anillos ricos en F-actina. Desde el punto de vista molecular, la unión de Nef con Pak2 a través del dominio PxxP de Nef, impide la fosforilación de Cofilina y, por tanto, su activación, inhibiendo así la reorganización de actina (Stolp y col., 2009; Stolp y col., 2010; Stolp y col., 2012). Para reproducir este efecto *in vitro*, células Jurkat que expresaban de forma transitoria la proteína Nef-GFP se estimularon con un anticuerpo anti-CD3. Tras 5 min de incubación, se realizó un marcaje de filamentos de actina en células fijadas y permeabilizadas con la toxina faloidina marcada con TRITC (**figura 32**). En células control, no transfectadas o que expresaban sólo la proteína GFP, se observó la formación del característico anillo de F-actina en todo el contorno de la célula. En células que expresaban la proteína Nef-WT se observó la práctica desaparición de dicho anillo de F-actina y la célula se redondeaba por la inhibición del *spreading* celular. Las mutaciones PG2/AA y AxxA produjeron la pérdida de función de Nef en este sentido, observándose en las células transfectadas con estos mutantes el mismo fenotipo de las células control. La expresión del mutante Nef-PG1/AA tuvo un efecto intermedio sobre la distribución de este marcador.

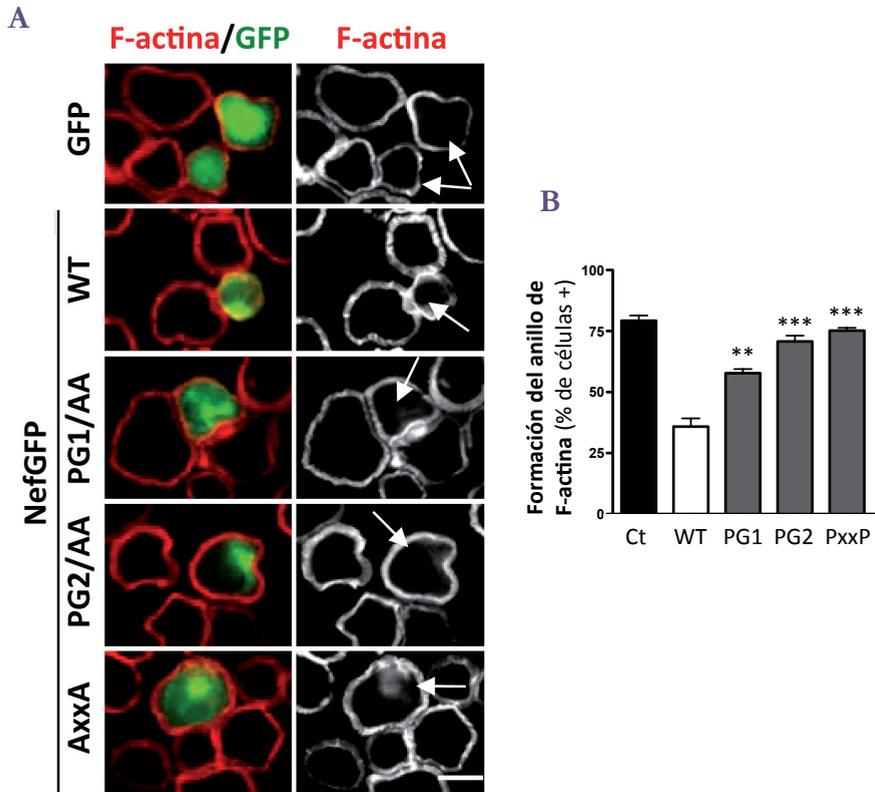


Figura 32. Papel del motivo PGPG en la inhibición de la reorganización de actina mediada por Nef. Las células Jurkat se transfectaron con pGFP (barra negra) o con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG o en el poli-prolina (AxxA). 16 h después se incubaron durante 5 min en cubre-objetos recubiertos con anti-CD3 y posteriormente se realizó la tinción de F-actina con Faloidina-TRITC. **A)** Sección óptica media de una célula representativa. Las células transfectadas se indican con una flecha en los paneles que muestran sólo el canal perteneciente a F-actina. Ct, formación del anillo de actina en una célula control transfectada sólo con GFP. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B)** Se cuantificó por densitometría el porcentaje de células transfectadas que mostraban la formación del anillo de F-actina pronunciado. Los histogramas representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes en los que se contaron 50 células por condición. La estadística se realizó entre los valores de interacción obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



Por otro lado se evaluó si el dominio PGPG podría participar, junto al motivo PxxP, en el efecto de la expresión del CMH-I en superficie por parte de Nef. Para analizar este aspecto se transfectaron transitoriamente células CEM con plásmidos de expresión de la proteína Nef-GFP y se analizó la expresión en superficie de la molécula CMH-I por citometría de flujo. Según se observa en la **figura 33**, la expresión de la proteína Nef WT provocó una notable disminución de los niveles de CMH-I en superficie. De acuerdo con la dependencia de la integridad del motivo PxxP en este efecto, el mutante correspondiente, Nef-AxxA, mostraba una reducción del 83% de la actividad de Nef. Sin embargo, la mutación del motivo PGPG causó un discreto pero significativo efecto sobre la actividad basal de Nef, mostrando los mutantes PG1/AA y PG2/AA una disminución en torno a un 40% y un 60%, respectivamente.

Estos resultados indican que el motivo PGPG, en especial los aminoácidos centrales P131G132, podrían también colaborar con el dominio PxxP en la desregulación de la reorganización de F-actina y la disminución de la expresión de CMH-I en la superficie celular.

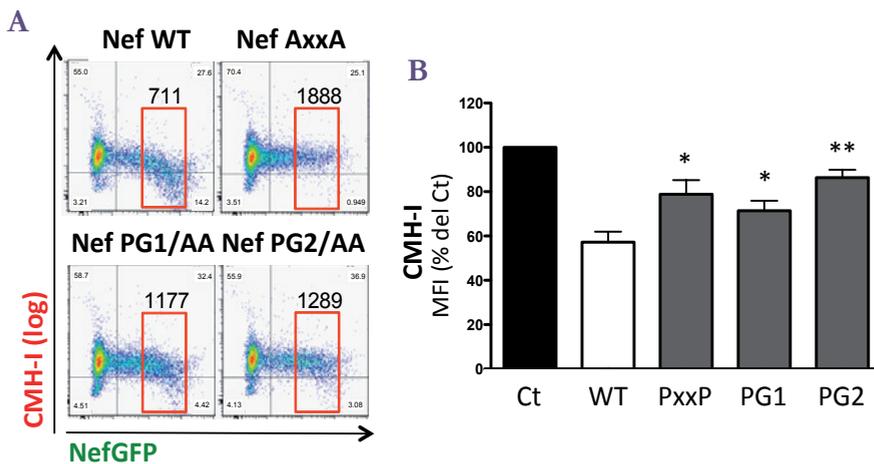


Figura 33. Papel del motivo PGPG en la disminución de la expresión en superficie de CMH-I mediada por Nef. Las células CEM se transfectaron con pNef-GFP WT (barra blanca), mutado (barras grises) en el dominio PGPG o en el poli-prolina (AxxA) y 16 h después se analizó por citometría de flujo la expresión de CMH-I (Alexa-555) en la superficie de las células GFP positivas. **A)** Gráficas representativas de un experimento en las que se muestra la MFI de la población GFP positiva. **B)** Los histogramas representan la MFI de CMH-I normalizada a 100% para el punto de células control sin transfectar (Ct, barra negra). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre los valores obtenidos con Nef-WT y los obtenidos con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.



4.1.8 El motivo PGGG es necesario para la mejora de la infectividad viral mediada por Nef mediante un mecanismo dependiente de la expresión de Lck

Teniendo en cuenta el crucial papel que juega la proteína Lck durante los procesos de ensamblaje y la salida del VIH-1 (Briand y col., 1997; Strasner y col., 2008) y la estrecha relación entre el motivo PGGG de Nef y Lck que han mostrado los resultados de esta Memoria, se estudió el potencial papel de este motivo en la infectividad viral mediada por Nef, así como su relación funcional con Lck

Para ello, se determinó la infectividad de virus libres que expresaban la proteína Nef WT o los diferentes mutantes del motivo PGGG, producidos en células T (Jurkat) y células no T (HEK293T), carentes de Lck. Estos virus se obtuvieron co-transfectando células Jurkat o HEK293-T con el plásmido pNL4.3 Δ Nef junto con un plásmido control vacío o plásmidos pCDNA-Nef-HA codificantes para Nef WT, mutada en el dominio PGGG o mutada en el dominio PxxP. Los virus producidos se recogieron, filtraron y normalizaron por ELISA-p24 previo al ensayo de infectividad. Además, se lisaron las células productoras para comprobar por *western-blot* la correcta expresión de las proteínas virales Gag y Nef, utilizando anticuerpos anti-p24 y anti-HA respectivamente, así como anti- γ -Adaptina como control de carga (figura 34).

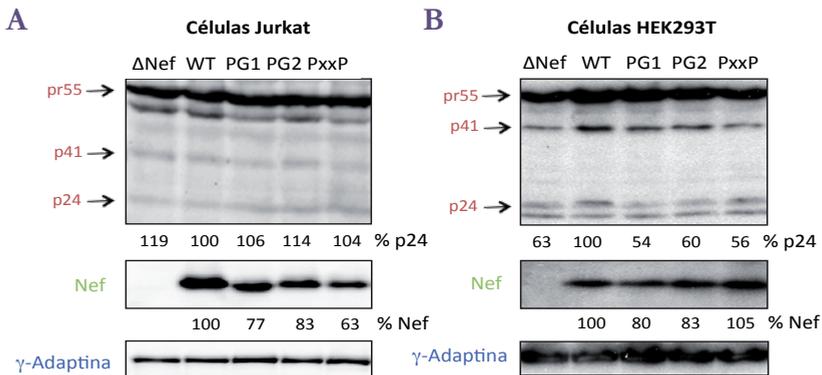


Figura 34. Producción viral en células Jurkat o células HEK293T. Las células Jurkat (A) o HEK293T (B) se co-transfectaron con el plásmido proviral pNL4.3 Δ Nef junto con un plásmido vacío o con un plásmido codificante para la proteína Nef-HA WT, mutada en el motivo PGGG o en el dominio poli-prolina (PxxP). 72 h después se analizó por *western-blot* el procesamiento intracelular de pr55 y la expresión de Nef utilizando anticuerpos anti-p24 o anti-HA respectivamente, y fue cuantificada por densitometría y expresada normalizando el valor de expresión de las células transfectadas con Nef-WT a 100%. Los niveles de expresión de γ -Adaptina se utilizaron como control de carga.



En ambos casos se detectó la poli-proteína Gag (pr55) de forma abundante y homogénea en cada transfección, aunque el procesamiento de la misma parecía ser más eficaz cuando la producción viral tuvo lugar en células HEK293-T, ya que se observó más cantidad de las proteínas procesadas: p41 y p24. Se analizó la infectividad en células reporteras TZM-bl 48 h post-infección (**figura 35**). Como se muestra en la **figura 35**, los virus Δ Nef fueron defectivos en infectividad respecto a los virus WT, independientemente de si habían sido producidos en células Jurkat o en células HEK293-T, mostrando una reducción del 50% en su capacidad infectiva. Por el contrario, cabe destacar que los virus con mutaciones en el dominio PGPG de Nef presentaron un fenotipo diferencial dependiendo del sistema celular donde habían sido producidos. Así, mientras los virus Nef-PG1/AA o -PG2/AA de células T Jurkat mostraban valores de infectividad muy similares a los de virus Δ Nef, su producción en células HEK-293T dieron lugar a viriones con niveles de infectividad que no fueron significativamente diferentes a los de virus WT. Sin embargo, los virus mutantes PxxP producidos en células Jurkat o HEK293T fueron tan infectivos como los virus silvestres.

En resumen, estos resultados definen al motivo PGPG como un nuevo determinante molecular en Nef implicado en la infectividad viral en células T y remarcan el papel central de la interacción entre Nef y Lck-SH2 en las etapas tardías del ciclo de replicación del VIH-1.

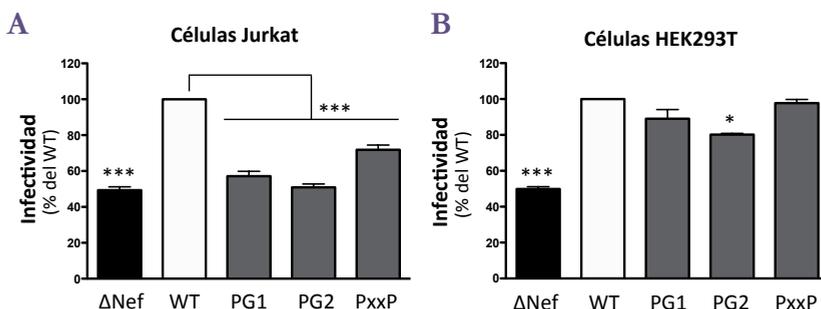


Figura 35. Infectividad de los virus con mutaciones en el motivo PGPG de Nef. Las células TZM.bl se infectaron durante 3 h con 20 ng de Agp24Gag/10⁶ células de los virus VIH-1_{NL4.3} WT (barras blancas), VIH-1_{NL4.3} Δ Nef (barras negras), VIH-1_{NL4.3} Nef-PG1/AA, VIH-1_{NL4.3} Nef-PG2/AA o VIH-1_{NL4.3} Nef-PxxP/AxxA (barras grises) obtenidos por transfección transitoria de células Jurkat (**A**) o HEK293T (**B**). 48 h después se midió la actividad luciferasa. Los resultados se expresan como el porcentaje de infectividad relativa a la del virus WT normalizado a 100%. Los valores son la media \pm SEM de tres infecciones independientes, cada una medida por duplicado. La estadística se realizó entre las células transfectadas con Nef-WT y las transfectadas con el plásmido vacío o con los distintos mutantes de Nef. *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$.

4.2 Resultados

Sección 2

**LA BRIOSTATINA-1 COMO
FÁRMACO ANTI-LATENCIA**



4.2. LA BRIOSTATINA-1 COMO FÁRMACO ANTI-LATENCIA

4.2.1 Efectos de la briostatina-1 en combinación con maraviroc y Atripla® en la reactivación del LTR del VIH-1

Para estudiar el efecto de los compuestos sobre la inducción de la activación del promotor viral LTR se utilizaron las células JLTRG-R5, que poseen el gen codificante para la proteína GFP bajo el control del LTR integrado en el genoma e inhibido a nivel transcripcional, de forma que se puede determinar la reactivación del LTR analizando la expresión de GFP célula a célula por técnicas de citometría de flujo. Además, las células JLTRG-R5 expresan el correceptor viral CCR5 en la superficie, que es la molécula diana del MVC.

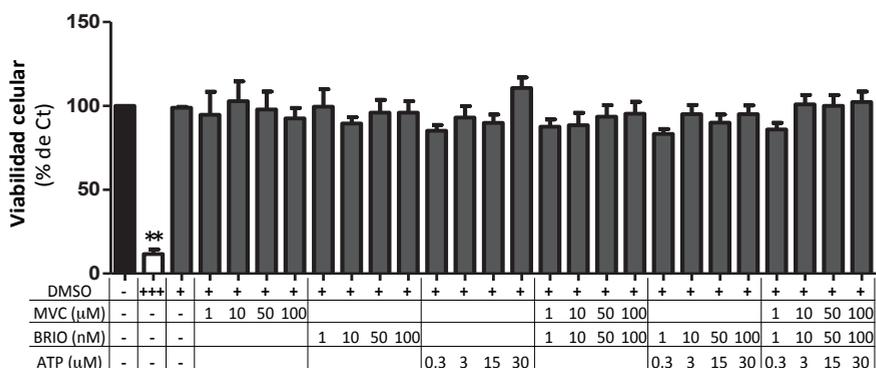


Figura 36. Viabilidad celular de las células JLTRG-R5 tratadas con briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales. Ensayo MTT realizado en las células JLTRG-R5 24 h después del tratamiento independiente o combinado con BRIO (de 1 a 100 nM), MVC (de 1 a 100 µM) y/o ATP (de 0,3 a 30 µM) (barras grises). Los histogramas representan el porcentaje de viabilidad celular normalizando a 100% la condición de células sin tratar (barra negra). DMSO+++ (10% DMSO) se utilizó como control positivo de muerte celular (barra blanca). DMSO+ (0,001% DMSO) representa la concentración de DMSO del vehículo de los tratamientos. Los histogramas representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células control no tratadas y las células tratadas. **, $p \leq 0,01$.

Para estudiar cómo podría afectar la capacidad de reactivación de la BRIO en combinación con fármacos AR como MVC y ATP, las células JLTRG-R5 se trataron durante 24 h con distintas concentraciones de fármacos, utilizados de forma independiente o en combinación: BRIO, rango de 1 a 100 nM, MVC, rango de 1 a 100 µM y ATP, rango de 0,3 a 30 µM. Aunque los rangos de concentraciones se seleccionaron teniendo en



cuenta los datos de toxicidad previamente publicados (Bousquet y col., 2009; Pérez y col., 2010; Arberas y col., 2013), se estudió la viabilidad de las células JLTRG-R5 tras su tratamiento con los diferentes fármacos por ensayo MTT. Como se muestra en la **figura 36**, ninguno de los fármacos utilizados ni sus combinaciones resultaron tóxicos a las concentraciones utilizadas. Con el fin de analizar el efecto de los tratamientos sobre la reactivación del LTR viral se cuantificó por citometría de flujo la expresión de GFP. El tratamiento con BRIO es el único con la capacidad de reactivar el promotor viral, efecto que se hace significativamente más importante a partir de 50 nM de BRIO (**figura 37**). La **figura 37B** muestra que la combinación de BRIO y MVC o de BRIO y ATP no afectan a los valores de reactivación del promotor viral observados tras el tratamiento único con BRIO. Un dato muy interesante, es que hay una tendencia a incrementar la capacidad de reactivación con la combinación BRIO-MVC-ATP a las concentraciones más altas, duplicando el valor causado por BRIO sola a la máxima concentración. En resumen, la combinación de los AR con BRIO no antagoniza el efecto reactivador de la BRIO.

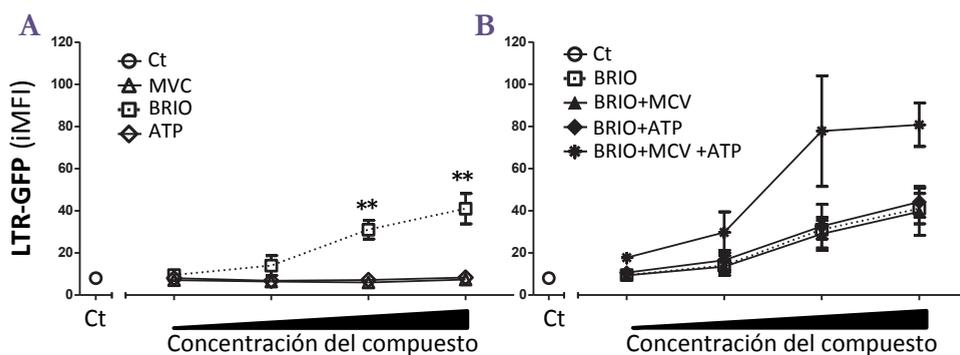


Figura 37. Efectos de la briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales en la reactivación del LTR del VIH-1. Las células JLTRG-R5 se trataron con BRIO 1, 10, 50, 100 nM, MVC 1, 10, 50, 100 μ M y ATP 0,3, 3, 15, 30 μ M solos (símbolos blancos) o en combinación (símbolos negros). 24 h después del tratamiento se analizó por citometría de flujo la expresión de GFP como reflejo de la activación del LTR viral. Los valores representan la media aritmética \pm SEM de la iMFI de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células control no tratadas (Ct) y las células tratadas con los compuestos independientes (**A**) o entre las células tratadas con BRIO y las tratadas con BRIO en combinación con los antirretrovirales (**B**). **, $p \leq 0,01$.



4.2.2 Efectos de la briostatina-1 en combinación con maraviroc y Atripla® en la expresión del receptor CD4 y de los correceptores CXCR4 y CCR5

El efecto de la BRIO en la disminución de la expresión en superficie del receptor y correceptor viral CD4 y CXCR4 respectivamente, es bien conocido (Mehla y col., 2010; Pérez y col., 2010). Por ello, se analizó el posible efecto de la combinación de los AR sobre la capacidad de la BRIO de disminuir la expresión de CD4 y CXCR4 en la superficie de las células T. Además, y como MVC se une específicamente a CCR5, también se analizó si estos tratamientos causaban alguna alteración en la expresión del este correceptor.

Se trataron las células JLTRG-R5 con el mismo rango de concentraciones de fármacos descritos anteriormente, como tratamientos independientes o en combinación: BRIO, rango de 1 a 100 nM, MVC, rango de 1 a 100 μ M y ATP, rango de 0,3 a 30 μ M. Tras 24 h de tratamiento se realizó un marcaje de superficie con los anticuerpos anti-CD4-PC7, anti-CXCR4-APC y anti-CCR5-PE y se analizó por citometría de flujo la expresión de estas moléculas en las células tratadas. En la **figura 38** se observa una disminución de la MFI de CD4 en superficie con el tratamiento con BRIO, que es dependiente de concentración, alcanzando valores de expresión de aproximadamente un 20% cuando

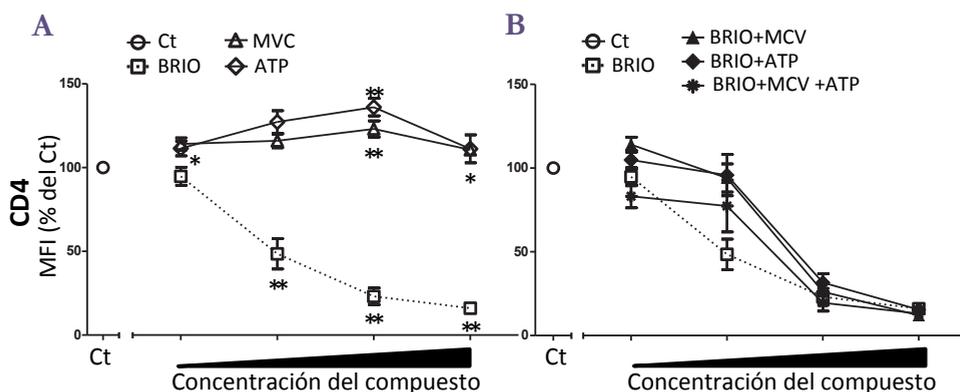


Figura 38. Efectos de la briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales en la expresión en superficie del receptor viral CD4. Las células JLTRG-R5 se trataron con BRIO 1, 10, 50, 100 nM, MVC 1, 10, 50, 100 μ M y ATP 0,3, 3, 15, 30 μ M solos (símbolos blancos) o en combinación (símbolos negros). 24 h después se analizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD4-PC7 la expresión de CD4 en la superficie celular. Los resultados representan la MFI normalizada a 100% para el punto de células control no tratadas (Ct). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células control no tratadas (Ct) y las células tratadas con los fármacos independientes (**A**) o entre las células tratadas con BRIO y las tratadas con BRIO combinada con los AR (**B**). *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.



se comparó con la expresión de CD4 en células no tratadas (Ct). A pesar de que el tratamiento con MVC y con ATP incrementaba ligeramente la expresión de CD4 en superficie, en las combinaciones de BRIO con MCV y/o ATP se observó un mismo perfil de disminución de la expresión de CD4 que en las células JLTRG-R5 tratadas solamente con BRIO.

El efecto de la BRIO en la expresión de CXCR4 fue bastante similar al observado en CD4, observándose una disminución significativa de dicho correceptor. Así, incluso a la concentración más baja de BRIO se observó una disminución del 40% en la expresión de CXCR4 en comparación con las células no tratadas (Ct) (figura 39A, B).

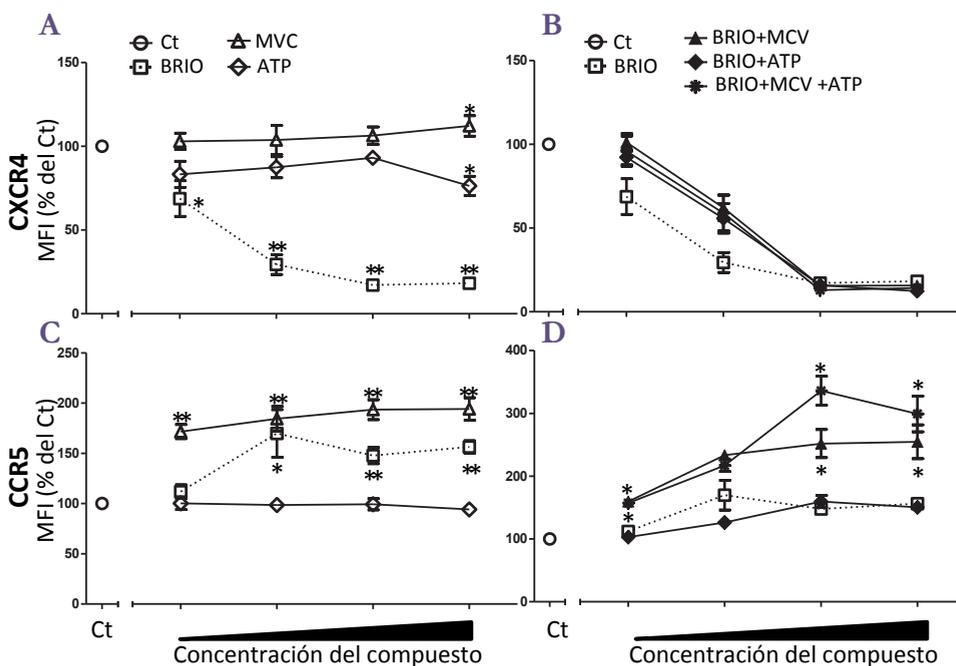


Figura 39. Efectos de la briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales en la expresión en superficie de los correceptores CXCR4 y CCR5. Las células JLTRG-R5 se trataron con BRIO 1, 10, 50, 100 nM, MVC 1, 10, 50, 100 μ M y ATP 0,3, 3, 15, 30 μ M solos (símbolos blancos) o en combinación (símbolos negros). 24 h después se analizó por citometría de flujo la expresión de CXCR4 (A,B) y CCR5 (C,D) en la superficie celular utilizando los anticuerpos anti-CXCR4-APC y anti-CCR5-PE. Los resultados representan la MFI normalizada a 100% para el punto de células control no tratadas (Ct). Los valores representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células control no tratadas (Ct) y las células tratadas con los fármacos independientes (A,C) o entre las células tratadas con BRIO y las tratadas con BRIO combinada con los antirretrovirales (B,D). *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.



Como en el caso de la expresión de CD4, en las células JLTRG-R5 tratadas con las combinaciones de BRIO con MCV y/o ATP se observó un mismo perfil de disminución de la expresión de CXCR4 que en las células tratadas solamente con BRIO (**figura 39A, B**).

Por último, se evaluó el efecto del tratamiento con BRIO, MVC y ATP de forma independiente o en combinación sobre la expresión en superficie de CCR5. El tratamiento con MVC en células JLTRG-R5 produjo un aumento del 60% en la expresión de CCR5 en la superficie en comparación con las células sin tratar (Ct), incluso empleando la concentración más baja de 1 μM (**figura 39C, D**), tal y como está descrito (Arberas y col., 2013). A la concentración máxima analizada de 100 μM , el tratamiento con MVC produjo un aumento del 90% en la expresión de CCR5. Por primera vez se muestra que el tratamiento con BRIO a concentraciones superiores a 1 nM también aumentó hasta un 50% la expresión en superficie de CCR5. La combinación de BRIO con ATP presentó un perfil similar a la BRIO sola, sin embargo, las combinaciones BRIO-MVC o BRIO-MVC-ATP alcanzaron valores de expresión de CCR5 en superficie de 3 veces superior a las células Ct.

4.2.3 Reactivación de la latencia viral mediada por briostatina-1 sola y en combinación con maraviroc y Atripla®

Una vez confirmado que la BRIO y su combinación con los AR estudiados reactivaban el LTR viral, se estudió si la reactivación del LTR podría dar lugar a una producción de partículas virales en células latentemente infectadas. El estudio se centró en los reservorios celulares más importantes del VIH-1: las células T CD4 de memoria y los monocitos/macrófagos. Se utilizó la línea celular J89GFP como modelo de linfocitos y la línea THP89GFP como modelo de monocitos, ambas latentemente infectadas por el aislado VIH-1_{89.6} (X4/R5 trópico), que codifica en su genoma para la proteína EGFP (Kutsch y col., 2002) (**figura 11**). 48 h después de tratar las células J89GFP o las THP89GFP con 100 nM de BRIO se analizó por citometría de flujo la expresión de EGFP como reflejo de la reactivación del genoma viral (**figura 40A**). Se observó que un 17% de las células J89GFP y prácticamente un 100% de las células THP89GFP fueron positivas para EGFP. En paralelo se trataron ambas líneas celulares con TNF- α a 3 ng/ml como control positivo de reactivación. Como se observa en la **figura 40** este tratamiento promovió una reactivación viral total en ambos tipos celulares. Estos resultados se confirmaron mediante microscopía de fluorescencia (**figura 40B**). Además, se observó la formación de sincitios en las células J89GFP tratadas con TNF- α , indicativo inequívoco de la reactivación viral, aunque no se observaron en las J89GFP tratadas con BRIO.



Comprobada la validez de estos modelos celulares para analizar la reactivación viral mediada por BRIO se estudió el efecto del tratamiento combinado de la BRIO con los AR (MVC y ATP). Se trataron las células J89GFP o THP89GFP con BRIO a 100 nM, MVC a 100 μ M y ATP a 30 μ M solos o en combinación.

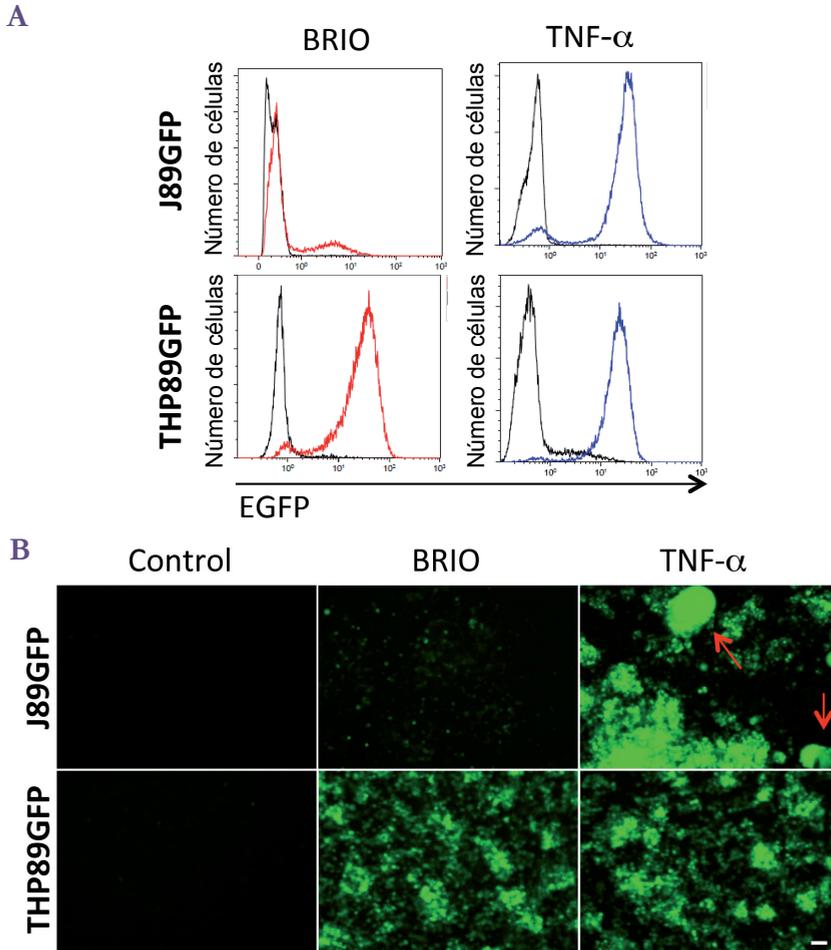


Figura 40. Inducción de la expresión de EGFP en las células J89GFP y THP89GFP tras la estimulación con briostatina-1. Las células J89GFP y THP89GFP se trataron con BRIO (100 nM) o con TNF- α (3 ng/ml) como control positivo de inducción. 48 h después se analizó la expresión de EGFP por citometría de flujo (**A**) y se tomaron imágenes de las células en cultivo con un microscopio de fluorescencia (**B**). Los histogramas muestran un ejemplo de la expresión de EGFP en células sin tratar (línea gris), tratadas con BRIO (línea roja) o tratadas con TNF- α (línea azul). Las flechas rojas de las imágenes señalan los sincitios formados tras el tratamiento con TNF- α . la barra de escala corresponde a 50 μ m. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.



La reactivación viral se analizó 2 y 4 días después del tratamiento mediante la cuantificación de la expresión intracelular de EGFP por citometría de flujo (**figura 41A, B**) y la producción en sobrenadante de Ag24Gag por ELISA (**figura 41C, D**). Se observó que el tratamiento combinado de BRIO con MVC y/o ATP mantenía los valores de reactivación viral observados en el tratamiento sólo con BRIO.

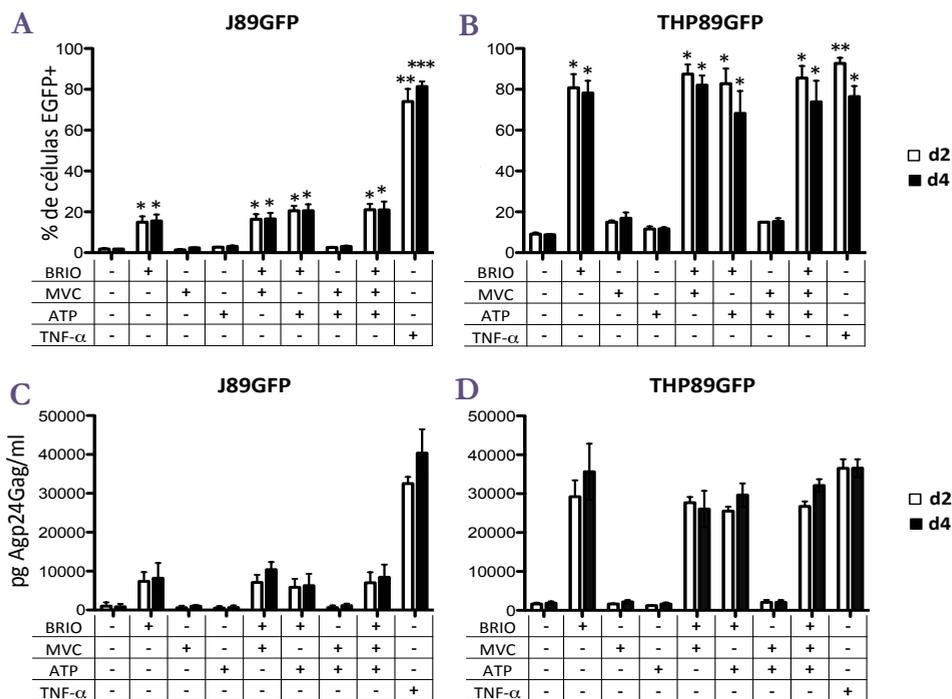


Figura 41. Reactivación viral en las células J89GFP y THP89GFP tras la estimulación con briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales. Las células J89GFP (**A,C**) y THP89GFP (**B,D**) se trataron con BRIO (100 nM), MVC (100 μM) y/o ATP (30 μM). Después de 2 y 4 días (d2, barras blancas y d4, barras negras), se analizó la reactivación viral como expresión de EGFP por citometría de flujo (**A,B**) o la producción de Agp24Gag en el sobrenadante de los cultivos por ELISA (**C,D**). El tratamiento con TNF-α (3 ng/ml) se realizó como control positivo de reactivación. Los histogramas representan el porcentaje de células EGFP positivas (**A,B**) o la concentración de Agp24Gag detectado (**C,D**). Los valores representan la media aritmética ± SEM de cuatro experimentos independientes (A,B) o de un experimento realizado por triplicado (C,D). La estadística se realizó entre las células control no tratadas y las células tratadas, independiente para cada tiempo del experimento. *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001.



de la infección por los distintos aislados virales. Los valores obtenidos en las TZM-bl infectadas por el VIH-1 pero no tratadas con los fármacos se normalizaron al 100% de infección, relativizando el resto de los valores a éste (figura 43).

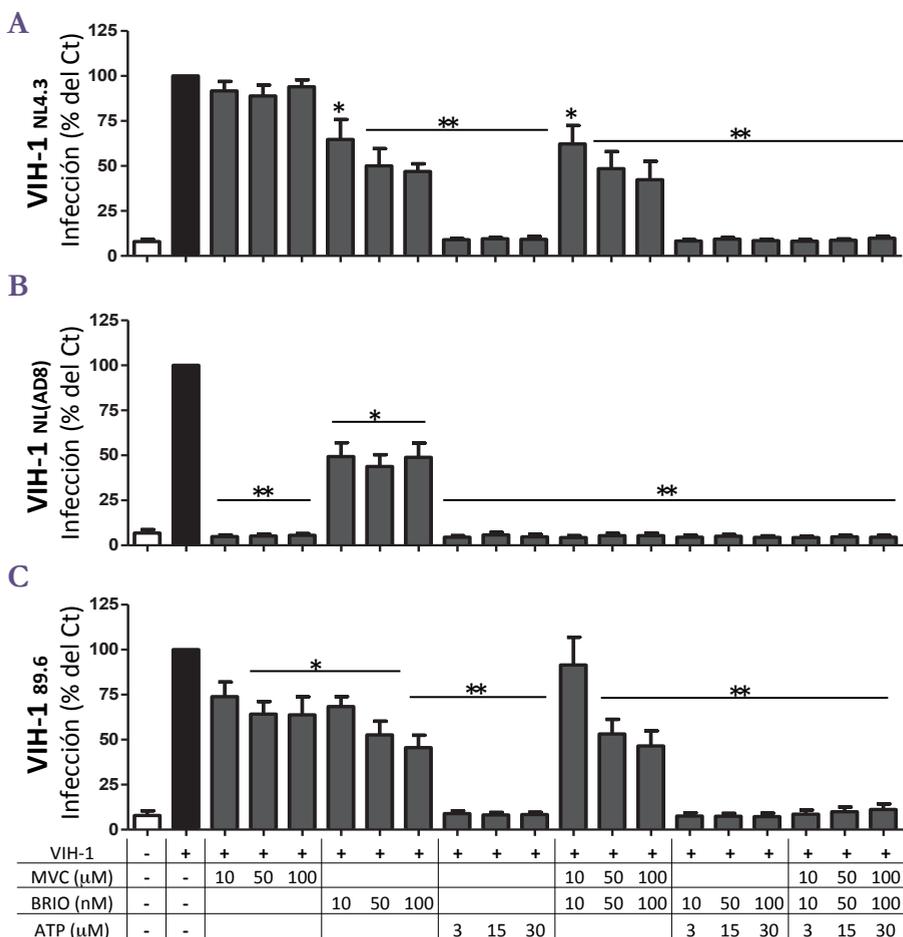


Figura 43. Inhibición de la infección del VIH-1 debida al tratamiento con briostatina-1 y a su combinación con antirretrovirales. Las células reporteras TZM-bl se pretrataron durante 1 h con BRIO (10, 50 o 100 nM), MVC (10, 50 o 100 μM) y ATP (3, 15 o 30 μM) solos o en combinación. Después se infectaron durante 3 h con el VIH-1 de tropismo X4 (VIH-1_{NL4.3}) (A), R5 (VIH-1_{NL(AD8)}) (B) o dual-trópico, X4/R5 (VIH-1_{89.6}) (C) a 40, 20 o 40 ng p24Gag/ 10⁶ células respectivamente y se volvieron a tratar las células con los distintos fármacos o sus combinaciones al mismo rango de concentraciones. Tras 48 h se cuantificó la actividad luciferasa como reflejo de la infección viral. Los histogramas muestran el porcentaje de infección normalizando a 100% el valor de las células control (Ct) infectadas no tratadas (barras negras). Las barras blancas reflejan la actividad luciferasa basal de las células sin infectar. Los resultados representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes con medidas por duplicado. La estadística se realizó entre las células Ct y las células tratadas (barras grises). *, p ≤ 0,05 **, p ≤ 0,01.



Tal y como se esperaba, el tratamiento de las TZM-bl con MVC, inhibidor específico de VIH-1 con tropismo R5, no inhibió la infección del aislado X4-VIH-1_{NL4.3}, produjo una inhibición de aproximadamente el 40% frente al aislado dual trópico R5/X4 VIH-1_{89.6} e inhibió por completo la infección por el aislado R5-VIH-1_{NL(AD8)}. El tratamiento con ATP inhibió la infección de los tres aislados VIH-1 independientemente de su tropismo, obteniéndose en los tres casos valores muy bajos, próximos al 100% de inhibición.

Puesto que la BRIO disminuye la expresión del receptor CD4 y del correceptor CXCR4, el pre-tratamiento de las TZM-bl con BRIO produjo una inhibición de la infección por el VIH-1 aproximadamente del 50%, independientemente del tropismo del aislado viral utilizado. Además, se observó un efecto dosis dependiente en la inhibición de los aislados VIH-1 con tropismo X4 o dual trópicos R5/X4, posiblemente debido a la disminución de la expresión del correceptor CXCR4 que se produce en presencia de BRIO. Al analizar el efecto de inhibición de la infección por el VIH-1 de las combinaciones BRIO-MVC, BRIO-ATP o BRIO-MVC-ATP se observó que el MVC o el ATP mantenían su efecto antiviral cuando se combinaron con la BRIO, alcanzándose en cada combinación estudiada los porcentajes de inhibición correspondiente al fármaco con mayor efecto cuando se utiliza de forma independiente.

4.2.5 Inhibición de la infección del virus reactivado

Hasta ahora se ha demostrado que la reactivación viral debida al efecto de la BRIO provocaba la producción de partículas virales, pero no si eran infectivas. Para evaluar este aspecto se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales en las que se estudió al mismo tiempo el efecto de reactivación (descritos en los apartados 4.2.1 y 4.2.3) y el efecto de inhibición viral (descrito en el apartado 4.2.4). De esta manera, en el caso de observarse una inhibición del virus reactivado, se podría decir que las partículas virales producidas tras la reactivación del VIH-1 mediada por el tratamiento con BRIO eran infectivas.

La primera aproximación experimental consistió en tratar las células monocíticas THP89GFP latentemente infectadas con BRIO a 100 nM durante 24 h. Posteriormente se co-cultivaron las células (200.000 células/pocillo) o el sobrenadante del cultivo con las células TZM-bl (10.000 células/pocillo) pre-tratadas o no con MVC a 100 μ M y/o ATP a 30 μ M y se analizó la actividad luciferasa a las 48 h de tratamiento (**figura 44**). Los valores se normalizaron tomando como valor de 100% de infección el obtenido con las células TZM-bl sin tratar co-cultivadas con las THP89GFP reactivadas con BRIO. También se incluyó un punto con las células TZM-bl sin tratar co-cultivadas con las



THP89GFP sin tratar, para analizar la producción viral basal de las células THP89GFP. Las células reactivadas y las partículas virales libres aumentaron significativamente la actividad luciferasa en las células reporteras sin tratar, efecto que disminuyó de forma significativa cuando se pre-trataron con MVC, ATP o MVC-ATP, aunque el perfil de inhibición fue distinto. Así, con el pre-tratamiento con MVC se alcanzó un 50% de inhibición y con el pre-tratamiento con ATP la inhibición fue cercana al 80% (figura 44).

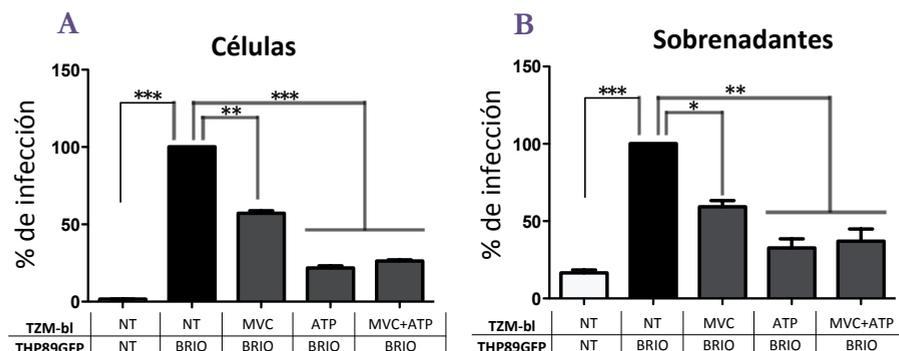


Figura 44. Inhibición del VIH-1 reactivado por la briostatatin-1 tras el tratamiento con antirretrovirales. Se estimularon las células THP89GFP con BRIO a 100 nM. 24 h después del tratamiento, las células (A) o su sobrenadante (B) se añadieron a células TZM-bl pretratadas con MVC a 100 μ M y/o ATP a 30 μ M (barras grises). Tras 48 h se cuantificó la actividad luciferasa como reflejo de la infección viral. Los histogramas muestran el porcentaje de infección normalizando a 100% el valor de las TZM-bl no tratadas a las que se les añadieron las THP89GFP tratadas con BRIO o su sobrenadante (barras negras). Las barras blancas reflejan la actividad luciferasa correspondiente a las TZM-bl no tratadas cultivadas con las células THP89GFP sin tratar o su sobrenadante. Los resultados representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes con medidas por duplicado. La estadística se realizó entre las células TZM-bl no tratadas a las que se les añadieron las THP89GFP tratadas con BRIO o su sobrenadante y el resto de las condiciones. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

En la segunda aproximación experimental se puso a punto un modelo de infección latente en CMSP humanas, simulando un modelo más fisiológico. Las CMSP se activaron durante 72 h con PHA y se infectaron con el aislado viral X4-VIH-1_{NL4.3} durante 3 h y se mantuvo el cultivo durante cuatro semanas. Cada semana se retiraba el sobrenadante y se añadían CMSP autólogas previamente activadas y tratadas con IL-2 a 50 U/ml durante las tres primeras semanas. Durante la última semana las células se mantuvieron con IL-2 a concentración baja (20 U/ml) para establecer un estado de reposo de las CMSP. Para comprobar el estado de activación/reposo de las CMSP se analizó la expresión en superficie de los marcadores de activación CD69, CD25 y HLA-DR por citometría de flujo (figura 45). Aunque un 10% de las CMSP expresaron



el marcador de activación temprana CD25, prácticamente no se detectó CD69 y HLA-DR, lo cual indicaba que las células estaban en reposo.

Para ajustar la concentración máxima de BRIO y/o ATP con la que se podrían tratar estas células se realizó un ensayo de viabilidad celular por MTT durante 24 h tras el tratamiento. En este experimento se mostró que la concentración máxima de BRIO previamente utilizada en las líneas celulares (100 nM) era tóxica en los cultivos primarios de CMSP, por lo que se disminuyó la concentración máxima de BRIO a 50 nM (figura 46). A esta concentración, tanto en tratamiento per se como en combinación con ATP a 30 μ M, no se produjo disminución alguna en la viabilidad de las CMSP. El ensayo de viabilidad celular también se realizó con MVC, aunque no se estudió el efecto del MVC en esta aproximación experimental ya que el virus que se utilizó para infectar las CMSP fue un aislado de tropismo X4. Sin embargo, si se utilizó MVC para analizar su efecto en el fenotipo celular (apartado 4.2.6).

Una vez en estado de reposo, las CMSP infectadas por el X4-VIH-1_{NL4.3} se trataron con BRIO, ATP o BRIO-ATP y se cuantificó la producción de Agp24Gag en el sobrenadante de las CMSP por ELISA a días 1, 3 o 6 post-tratamiento. Las CMSP sin tratamiento o control presentaron valores residuales de producción viral que aumentó con el tiempo de cultivo. Aún así, se observó que el tratamiento con BRIO incrementó la producción viral aproximadamente un 50% y un 30% después de 3 y 6 días respectivamente, mientras que el tratamiento combinado con ATP disminuyó en un 50% y un 80% los valores de Agp24Gag en el sobrenadante de las CMSP tratadas con BRIO (figura 47).

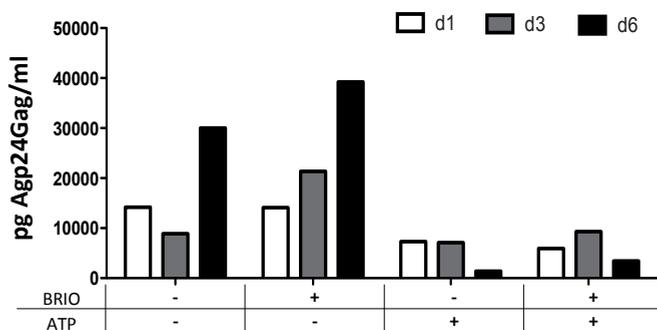


Figura 47. Efecto de la briostatina-1 en la reactivación viral de CMSP infectadas. Las CMSP infectadas en estado de reposo se trataron con BRIO (50 nM) y ATP (30 μ M) de forma independiente o en combinación. 1, 3 y 6 días post-tratamiento se cuantificó el Agp24Gag del VIH-1 en el sobrenadante de los cultivos. La gráfica representa la concentración de Agp24Gag en pg/ml. d1, día 1 (barras blancas); d3, día 3 (barras grises); d6, día 6 (barras negras).



Teniendo en cuenta que la BRIO es capaz de activar la vía del factor de transcripción NF- κ B y que el gen para el CD69 posee tres sitios de unión a NF- κ B en su región promotora (Lopez-Cabrera y col., 1995) se analizó la expresión de CD69 en la superficie de las CMSP por citometría de flujo como medida indirecta de la activación mediada por BRIO a días 1 y 6 después del tratamiento. El porcentaje de células CD69 positivas aumentó de un 10% en las CMSP no tratadas hasta más de un 40% cuando éstas habían sido tratadas con BRIO sola o en combinación con ATP, a 1 y 6 días (**figura 48**). Además, en los dos tiempos de medida, la MFI también estaba notablemente incrementada, aunque se observó una disminución a día 6, probablemente debido a la dilución del efecto del fármaco que se añadió sólo a día 0. Aún así, es de resaltar que la activación de la vía de NF- κ B fue prominente y prolongada en el tiempo.

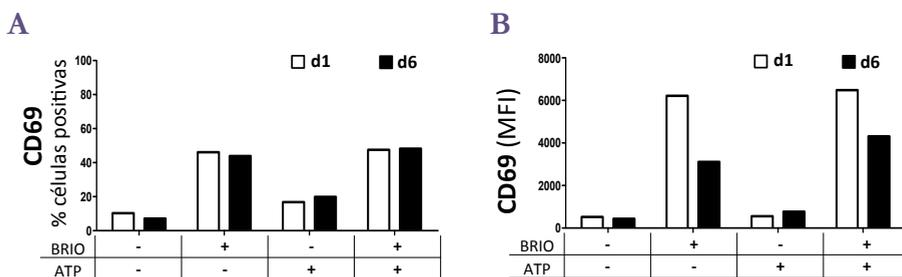


Figura 48. Inducción de la expresión de CD69 en superficie tras el tratamiento de CMSP infectadas tratadas con briostatina-1. Las CMSP infectadas en estado de reposo se trataron con BRIO a 50 nM y ATP a 30 μ M de forma independiente o en combinación. A día 1 y 6 post-tratamiento se analizó la expresión en superficie de CD69 por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CD69-PE. Las gráficas representan el porcentaje de células CD69 positivas (**A**) o la MFI de CD69 (**B**). d1, día 1 (barras blancas); d6, día 6 (barras negras).

Puesto que la expresión en membrana de CD69 es un marcador de activación celular, los datos obtenidos sugieren que la BRIO podría producir una activación general de las células latentemente infectadas. Para evaluar esta hipótesis se estudió la expresión de otros dos marcadores de activación celular en superficie: CD25 y HLA-DR. Aunque la MFI aumentó ligeramente a día 1 cuando las células se trataron con BRIO o la combinación BRIO-ATP, el porcentaje de células positivas para ambos marcadores fue muy bajo en las CMSP sin tratar y además, no aumentó tras el tratamiento con BRIO o con la combinación BRIO-ATP (**figura 49**). En resumen, estos datos indican que la BRIO no produce una activación generalizada en las CMSP infectadas por el VIH-1 en estado de reposo.

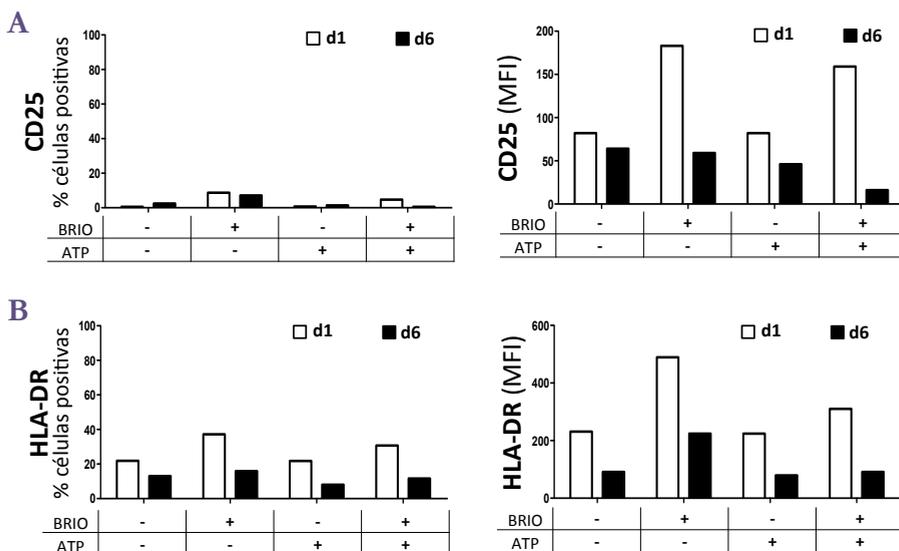


Figura 49. Activación celular de las CMSP infectadas por el VIH-1 y tratadas con briostatina-1. Las CMSP infectadas en estado de reposo se trataron con BRIO a 50 nM y ATP a 30 μ M de forma independiente o en combinación. A 1 y 6 días post-tratamiento se analizó el estado de activación celular midiendo la expresión en superficie de CD25 (A) y HLA-DR (B) por citometría de flujo usando los anticuerpo anti-CD25-FITC y anti-HLA-DR-ECD. Las gráficas representan el porcentaje de células positivas (paneles izquierdos) o la MFI (paneles derechos). d1, día 1 (barras blancas); d6, día 6 (barras negras).

4.2.6 Efectos de la briostatina-1 combinada con maraviroc y Atripla® en el fenotipo de CMSP y linfocitos T CD4

Por último, puesto que todos los datos indicaban que la combinación de BRIO con MVC y/o ATP podría ser eficiente tanto a nivel de reactivación viral como de inhibición viral, se estudió el posible efecto que tendrían estas combinaciones en el fenotipo de las CMSP y los linfocitos T CD4, células diana por excelencia del VIH-1. Se trataron las CMSP aisladas de *buffy coat* de donante sano (estimuladas o no con PHA a 2 μ g/ml durante 3 días) con la máxima concentración no tóxica de cada fármaco, estudiada por el ensayo de viabilidad celular MTT (figura 46), BRIO a 50 nM, MVC a 100 μ M y ATP a 30 μ M durante 24 h y posteriormente se analizó por citometría de flujo la expresión de superficie del receptor CD4, los correceptores CXCR4 y CCR5 (figura 50) y los marcadores de activación celular CD38 y HLA-DR utilizando anticuerpos específicos de estas moléculas conjugados a los fluorocromos PC7, APC, PE, FITC y ECD, respectivamente (figura 51). Se añadió el marcador CD3-PC5 para seleccionar la subpoblación de linfocitos T CD4 (CD3+CD4+) y analizar el efecto de los distintos fármacos en esta subpoblación. Debido a la variabilidad entre donantes, la MFI se



representó normalizada respecto a la condición de células sin tratar. Se observó una disminución significativa de la expresión en superficie del receptor CD4 tras el tratamiento con BRIO (**figura 50A**). La combinación de BRIO con MVC y/o ATP también disminuyó significativamente la expresión de CD4. Sin embargo, aunque se observó una tendencia descendente en la expresión de CD4 con los tratamientos BRIO-MVC y en células activadas tratadas con BRIO-MVC-ATP los resultados no fueron estadísticamente significativos. El tratamiento con BRIO provocó una disminución de aproximadamente el 50% en la expresión en superficie de CXCR4 en las CMSP (**figura 50B**), que aunque también se observó con el tratamiento combinado BRIO con MVC y/o ATP, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en la mayoría de las combinaciones.

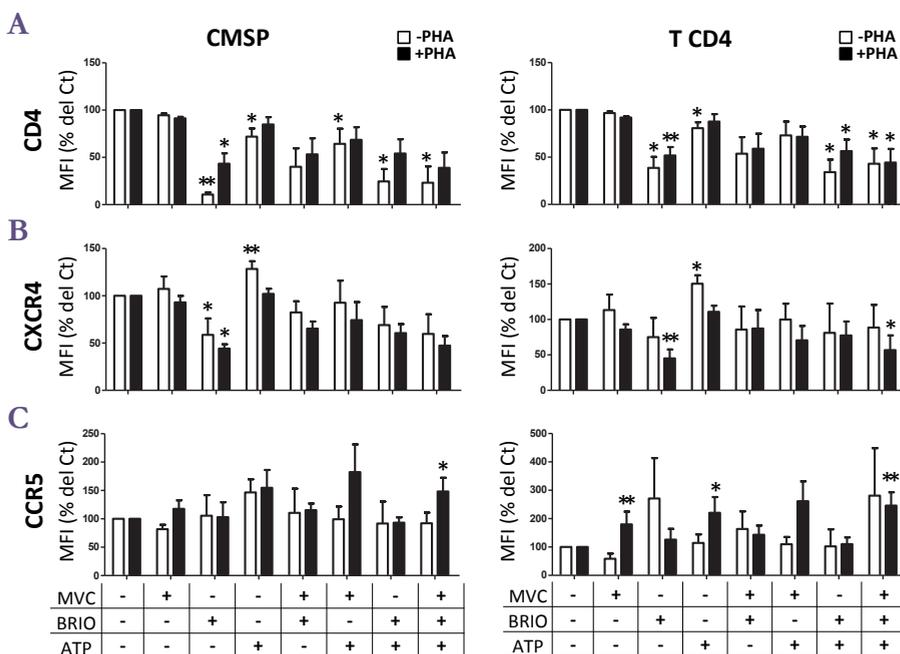


Figura 50. Expresión en superficie de CD4, CXCR4 y CCR5 en células primarias tratadas con briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales. Las CMSP purificadas de *buffy-coat* de donantes sanos se activaron o no con PHA (2 µg/ml) durante 3 días y posteriormente se trataron con BRIO a 50 nM, MVC a 100 µM y/o ATP a 30 µM. Tras 24 h de tratamiento, la expresión de CD4 (**A**), CXCR4 (**B**) y CCR5 (**C**) en la superficie celular se analizó por citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD4-PC7, anti-CXCR4-APC y anti-CCR5-PE. El análisis se realizó tanto en CMSP totales, definidas por su tamaño y complejidad (paneles izquierdos) como en linfocitos T CD4 (CD3-PC5 positivos, CD4-PC7 positivos) (paneles derechos) no activados (barras blancas) o activados con PHA (barras negras). Los histogramas representan el % de MFI normalizando a 100% el valor de las células control (Ct) no tratadas. Los resultados representan la media aritmética ± SEM de cinco experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células Ct y las células tratadas. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.



En cuanto a la expresión de CCR5, es difícil interpretar los resultados, debido a que las células analizadas poseen un porcentaje muy bajo de expresión de CCR5, aproximadamente un 5%. De tal forma que variaciones muy pequeñas (+/-2%) suponen casi el doble del valor de expresión respecto a la condición de no tratadas. Sin embargo, es importante señalar algunos de los efectos observados tras los tratamientos independientes con MVC y ATP. MVC aumenta la expresión de CCR5 en linfocitos T CD4 activados, tal y como está descrito (Arberas y col., 2013). ATP podría disminuir ligeramente la expresión de CD4 y aumentar la de CXCR4 en células no activadas, y aumentar CCR5 en células activadas.

Aunque los resultados anteriores indicaban que la BRIO no producía una hiperactivación de las células infectadas por el VIH-1, se estudió el efecto en la activación en CMSP y linfocitos T previamente sin activar o activados.

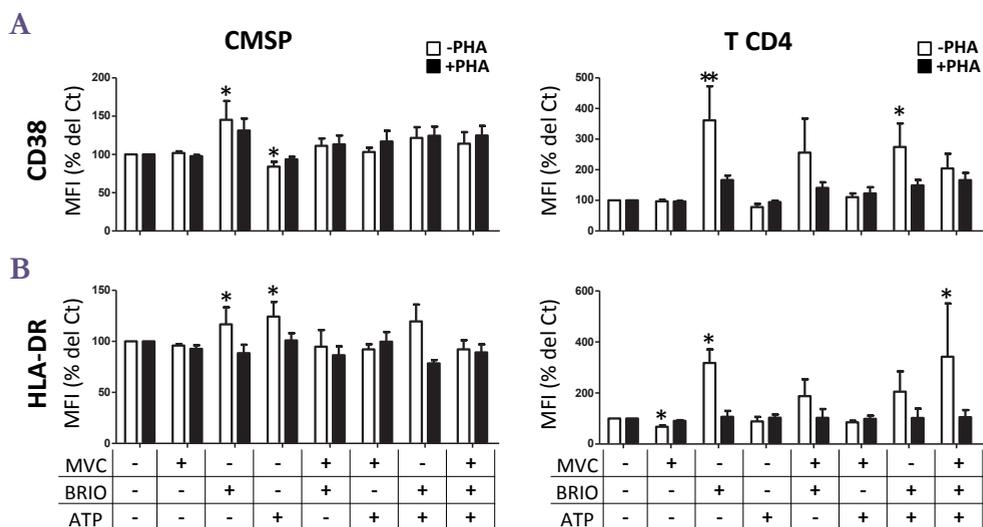


Figura 51. Activación celular de las células primarias tratadas con briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales. Las CMSP purificadas de *buffy-coat* de donantes sanos se activaron o no con PHA (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 3 días y posteriormente fueron tratadas con BRIO (50 nM), MVC (100 μM) y/o ATP (30 μM). Tras 24 h de tratamiento, se evaluó el estado de activación celular analizando la expresión en superficie de CD38 (A) y HLA-DR (B) por citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD38-FITC y anti-HLA-DR-ECD. El análisis se realizó tanto en CMSP totales, definidas por su tamaño y complejidad (paneles izquierdos) como en linfocitos T CD4 (CD3-PC5 positivos, CD4-PC7 positivos) (paneles derechos) no activados (barras blancas) o activados con PHA (barras negras). Los histogramas representan el % de MFI normalizando a 100% el valor de las células control (Ct) no tratadas. Los resultados representan la media aritmética \pm SEM de cinco experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células Ct y las células tratadas. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.



El tratamiento con BRIO incrementó los valores de expresión de CD38 y HLA-DR en células no activadas, pero no modificó el patrón de estos marcadores en células activadas previamente con PHA (figura 51). Además, la combinación de BRIO con los AR, parecía atenuar el efecto de la BRIO en la activación de CMSP y de linfocitos T CD4, aunque en estos últimos se observó un incremento importante de CD38 y HLA-DR en células no activadas. En resumen, los resultados indican claramente que la BRIO no producía una hiperactivación de las CMSP o linfocitos T CD4 previamente activados.

Debido al aumento de los marcadores de activación CD38 y HLA-DR en las CMSP y linfocitos T CD4 no activados tras el tratamiento con BRIO, se estudió si la BRIO inducía la proliferación celular. A partir de CMSP se aislaron linfocitos T CD4 por selección negativa y se mantuvieron en cultivo a una concentración baja de 20 U/ml de IL-2, suficiente para mantener los linfocitos T CD4 en cultivo durante varios días sin sobre-estimularlos, y se trataron con BRIO a 50 nM, MVC a 100 µM y/o ATP a 30 µM. Después de 1 o 6 días de tratamiento, se cuantificó la incorporación de bromo-deoxiuridina (BrdU) por ELISA como reflejo de proliferación celular. Como control positivo de inducción de proliferación se utilizaron células tratadas con 2 µg/ml de PHA para el tratamiento de 1 día y 0,5 µg/ml de PHA para el tratamiento de 6 días. Los valores de proliferación celular se normalizaron frente a la condición de linfocitos T CD4 no tratados.

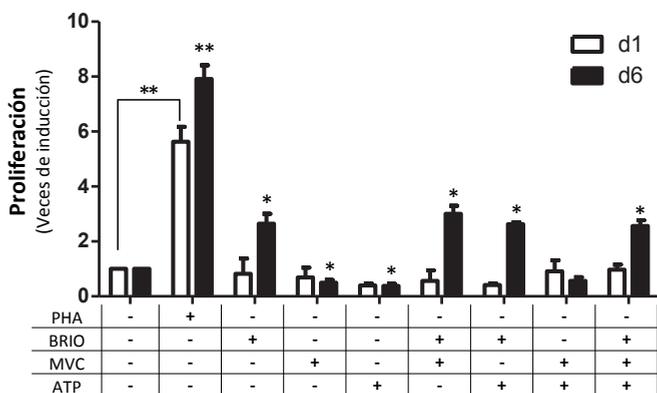


Figura 52. Proliferación celular de linfocitos T CD4 tratados con briostatina-1 y su combinación con antirretrovirales. Los linfocitos T CD4 se purificaron por selección negativa a partir de CMSP aisladas de buffy-coat de donantes sanos y se trataron con BRIO a 50 nM, MVC a 100 µM y ATP a 30 µM solos o en combinación, junto con IL-2 a 20 U/ml. Tras 1 o 6 días post-tratamiento (d1, barras blancas y d6, barras negras), se cuantificó mediante ELISA la incorporación de BrdU como reflejo de la proliferación celular. Cada experimento se realizó por triplicado, mostrándose en la gráfica la media aritmética ± SEM del valor de proliferación normalizando a 1 los valores obtenidos con las células control (Ct) no tratadas. La estadística se realizó entre las células Ct y las células tratadas, independiente para cada tiempo del experimento. *, p < 0,05 **; p < 0,001.



El tratamiento con PHA produjo un incremento en la proliferación de linfocitos T CD4 de 6 u 8 veces a 1 y 6 días respectivamente (**figura 52**). A día 1 ninguno de los tratamientos con BRIO, MVC y/o ATP produjo un aumento en la proliferación de los linfocitos T CD4. Sin embargo, a día 6 el tratamiento con BRIO sola o en combinación con los AR indujo cierta proliferación, observándose un aumento respecto al valor de la condición no tratada. Es importante señalar que estos valores de proliferación fueron significativamente mucho más bajos que cuando los linfocitos T CD4 se estimularon con PHA.

4.2.7 Efecto de la briostatina-1 en la activación viral en astrocitos y mecanismo de acción

Aunque las células T CD4 constituyen uno de los principales reservorios virales, lo ideal de un reactivador de latencia sería que fuera efectivo en diversos reservorios para así facilitar la eliminación o disminución de los mismos a nivel sistémico. El SNC es un reservorio importante para el VIH-1; en particular, el cerebro representa un santuario para el VIH-1 latente puesto que ofrece al virus un entorno protegido tanto del sistema inmunológico como de la penetración efectiva de fármacos, sirviendo así como un compartimento de replicación persistente del VIH-1. Aunque los macrófagos y microglía son las principales fuentes de replicación del VIH-1 en el SNC, los astrocitos también son capaces de soportar una baja pero consistente producción viral (Kramer-Hammerle y col., 2005). A pesar de que el porcentaje de astrocitos infectados *in vivo* es relativamente bajo (aproximadamente un 2,6%), son el tipo de células más abundante en el SNC y son críticos para su funcionamiento, por lo que pueden representar una fuente importante de la persistencia viral (Brack-Werner, 1999). Por ello se estudió si la BRIO podría también actuar como reactivador de la latencia viral en astrocitos.

En primer lugar se evaluó la toxicidad del tratamiento con BRIO. Para ello, los astrocitos humanos primarios (NHA) y las células de astroglioma U87 se trataron con un rango de BRIO entre 1 y 100 nM y tras 24 h se analizó por ensayo MIT la viabilidad celular. Como se puede observar en la **figura 53**, ninguna de las concentraciones utilizadas resultó ser tóxica, por lo que para los experimentos posteriores se eligió la concentración máxima de 100 nM.

Debido a la dificultad de establecer *in vitro* cultivos de astrocitos latentemente infectados, lo primero que se quiso evaluar fue si la BRIO era capaz de inducir la activación del promotor viral LTR. El LTR del VIH-1 se regula, en gran parte, por factores de transcripción celulares, incluyendo NF- κ B, AP1, SP-1 y NFAT (Jones y Peterlin, 1994). En consecuencia, los estímulos que activan estos factores de transcripción provocan la replicación del VIH-1 dirigida por el LTR (Duh y col., 1989).

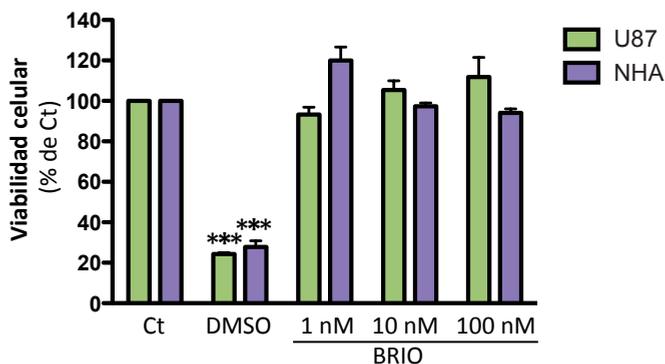


Figura 53. Viabilidad celular de las células U87 y NHA tratadas con briostatina-1. Ensayo MTT realizado en las células U87 y NHA 24 h después del tratamiento con BRIO 1, 10 o 100 nM. Los histogramas representan el porcentaje de viabilidad celular normalizando a 100% la condición de células control (Ct) sin tratar. DMSO (10% DMSO) se utilizó como control positivo de muerte celular. Los histogramas representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes. La estadística se realizó entre las células Ct y las células tratadas. ***, $p \leq 0,001$.

La activación de NF- κ B se inicia a través de la degradación inducida por señal de proteínas I κ B, que lo retienen inactivo en el citoplasma celular. Esto ocurre principalmente mediante la activación de una quinasa llamada I κ B quinasa (IKK). La IKK está formada por un heterodímero de las subunidades catalíticas de IKK α e IKK β y por una proteína reguladora “maestra” llamada NEMO o IKK γ . Cuando la proteína IKK es activada por distintas señales, fosforila dos residuos de Ser en el inhibidor I κ B (S32 y S36 en I κ B α humana), lo que provoca su ubiquitinación y posterior degradación por proteasoma. Con la degradación de I κ B, el complejo NF- κ B es libre para entrar al núcleo, donde puede activar la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión para NF- κ B (**figura 54A**) (Oeckinghaus y col., 2011).

Para evaluar si la BRIO inducía la activación del promotor viral LTR y si esta activación era dependiente del factor de transcripción NF- κ B las células U87 se co-transfectaron con el plásmido LTR-Luc junto con un plásmido vacío o con pIKK α , el plásmido de expresión que codifica para la expresión del inhibidor de NF- κ B. Posteriormente se trataron con BRIO y se analizó la actividad luciferasa como reflejo de la activación del LTR. Como se observa en la **figura 54B**, el tratamiento con BRIO indujo significativamente la activación del LTR viral, promoviendo un incremento de hasta tres veces de la actividad luciferasa basal. La sobreexpresión de I κ B α disminuyó drásticamente la activación del



LTR mediado por la BRIO, alcanzando valores de actividad luciferasa similares a las células no tratadas. Estos datos sugieren que la inducción del LTR viral mediada por BRIO en células U87 se produce a través de la activación de NF- κ B y, por tanto, es susceptible de inhibición por I κ B α .

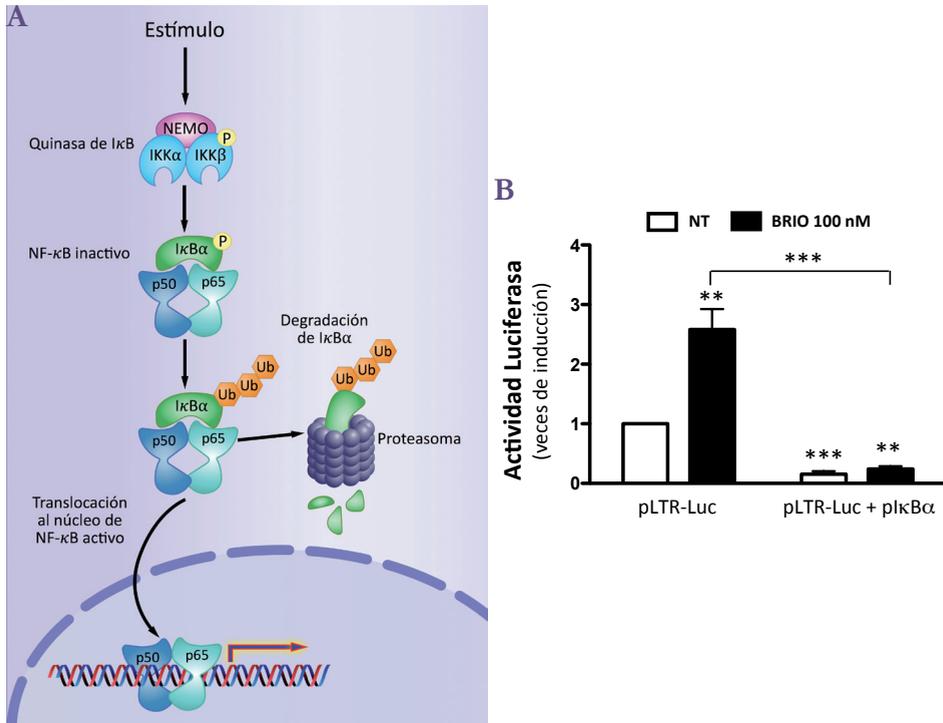


Figura 54. Activación del LTR viral mediada por briostatina-1. A) Representación esquemática de la vía de activación clásica de NF- κ B. Adaptada de Oeckinghaus y col., (2011). **B)** Las células U87 se co-transfectaron con pLTR-Luc junto con un plásmido vacío (pLTR-Luc) o con plásmido codificante para la proteína I κ B α (pLTR-Luc+pI κ B α), 5 h después de fueron tratadas (barras negras) o no (barras blancas) con BRIO a 100 nM. Tras 48 h, se cuantificó la actividad luciferasa como reflejo de la activación del promotor (LTR) viral. La gráfica muestra las veces de inducción con respecto al valor de las células control (Ct) transfectadas con pLTR-Luc no tratadas. Los resultados representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes con medidas por duplicado. La estadística se realizó entre las células Ct y las células del resto de condiciones y entre las células tratadas con BRIO trasfectadas con pLTR-Luc o con pLTR-Luc+pI κ B α . **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.



Para comprobar que la BRIO media la activación de NF- κ B, y su consiguiente translocación desde el citoplasma al núcleo, las células U87 y NHA se trataron con BRIO a 100 nM y se estudió la localización subcelular de NF- κ B, mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal en las células fijadas y permeabilizadas empleando un anticuerpo anti-p65 (subunidad del complejo NF- κ B). Como se muestra en la **figura 55**, en las células control no tratadas, el complejo NF- κ B se localizaba de forma mayoritaria en citoplasma celular, y escasamente en el compartimento nuclear.

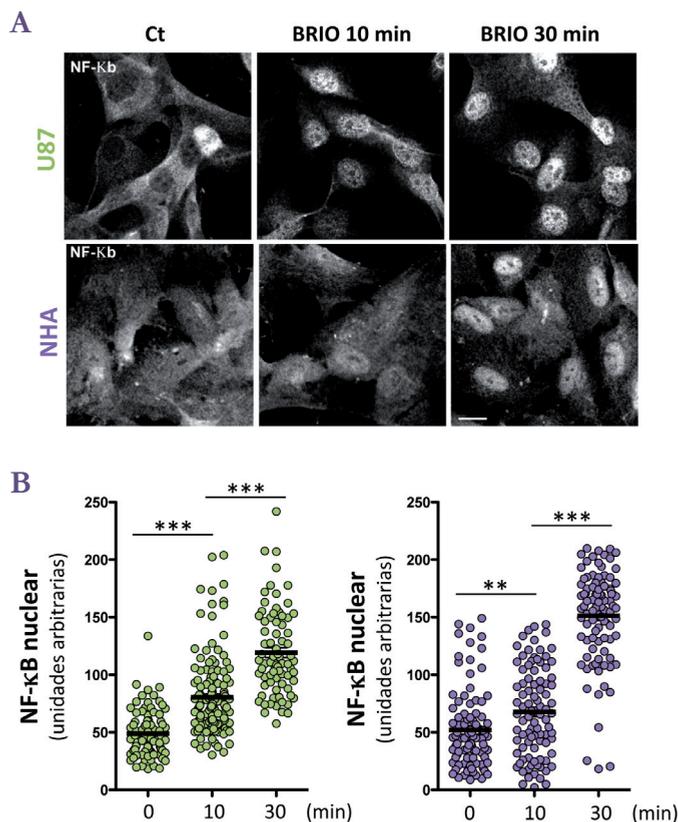


Figura 55. Translocación de NF- κ B a núcleo mediada por briostatina-1. Las células U87 y NHA fueron tratadas durante 10 o 30 min con BRIO a 100 nM. A continuación se analizó por inmunofluorescencia indirecta el patrón de expresión de NF- κ B utilizando un anticuerpo primario anti-p65 total y uno secundario marcado con Alexa 488. **A)** Imágenes representativas de cada condición. Células U87 en paneles superiores y células NHA en paneles inferiores. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B)** Las gráficas muestran los valores de intensidad de fluorescencia correspondiente a NF- κ B nuclear calculados por densitometría como se detalla en Materiales y Métodos y expresados como unidades arbitrarias y su SEM correspondiente. Representan dos experimentos independientes en los que se contaron más de 50 células por condición. **, $p \leq 0,001$; ***, $p \leq 0,001$.



El tratamiento con BRIO promovió una reducción de la expresión de NF- κ B en el citoplasma, induciendo un aumento significativo de su expresión en el núcleo durante los primeros 30 min de tratamiento con BRIO. El análisis por *western-blot* de la localización de NF- κ B en las fracciones citosólica y nuclear de las células NHA tratadas con BRIO (figura 56) confirmaron los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, mostrando una disminución de la expresión de NF- κ B en la fracción citoplasmática acompañada de un aumento en la fracción nuclear durante los primeros 15 min de tratamiento, efecto que se revertiría, casi en su totalidad, a los 60 min de tratamiento con BRIO.

En resumen, estos datos indican que la BRIO también induce translocación de NF- κ B en astrocitos humanos.

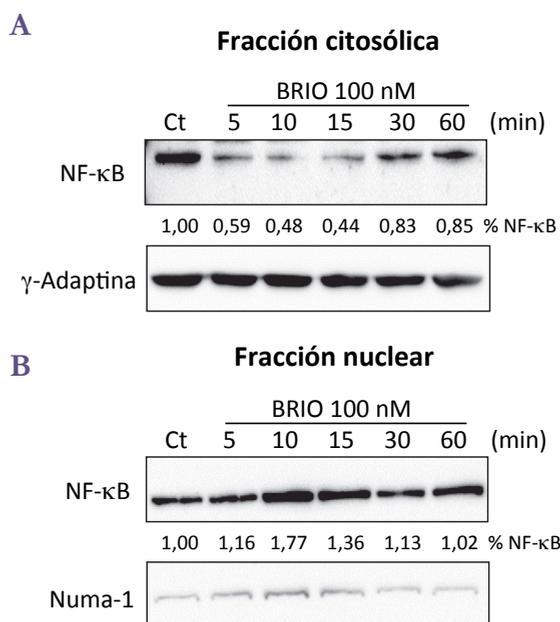


Figura 56. Translocación de NF- κ B a núcleo mediada por briostatina-1. Las células NHA fueron tratadas durante 5, 10, 15, 30 o 60 min con BRIO a 100 nM. Se separaron las fracciones citoplasmática (A) y nuclear (B) y se analizó por *western-blot* la expresión de NF- κ B utilizando un anticuerpo anti-p65 (subunidad activa), que fue cuantificada por densitometría y expresada normalizando el valor de expresión de NF- κ B de las células control (Ct) no tratadas a 1. Los niveles de expresión de γ -Adaptina y de Numa-1 se utilizaron como control de carga de las fracciones citosólica y nuclear respectivamente.



4.2.8 Reactivación viral en linfocitos T CD4 procedentes de individuos VIH-1+ con viremia suprimida

Debido a los resultados obtenidos en reactivación viral tras el tratamiento con BRIO sola o en combinación con los AR en los modelos celulares de latencia viral (J89GFP y THP89GFP) y en CMSP de donantes sanos infectadas *in vitro*, se estudió si estos efectos virológicos producidos por la BRIO serían reproducibles en células T CD4 procedentes de individuos VIH-1+ avirémicos. Se aislaron los linfocitos T CD4 de tres pacientes y se cultivaron con ATP (30 μ M) en presencia o no de BRIO a 50 nM. Después de 2 días de tratamiento se cuantificó el ARN viral en el sobrenadante de los cultivos como reflejo de una inducción de la replicación del VIH-1. Se observó que en dos de los individuos VIH-1+, la BRIO provocó la reactivación de gran cantidad de viriones (figura 57A). Como el ARN del VIH-1 fue indetectable en el sobrenadante de los cultivos celulares del tercer paciente, se mantuvo el cultivo hasta día 6, momento en que se observó un aumento del ARN viral en el sobrenadante de las células tratadas con BRIO, que fue tres veces mayor que en el de las células no tratadas (figura 57B). La variabilidad observada entre pacientes podría ser debido a diferencias de sensibilidad a la BRIO o al número de células con infección latente que podrían dar lugar a partículas del VIH-1. Este hallazgo es muy importante porque muestra que la actividad de la BRIO observada en los modelos de latencia utilizados en esta Memoria se traduce en una potente reactivación viral en células primarias de individuos VIH-1+ con infección latente.

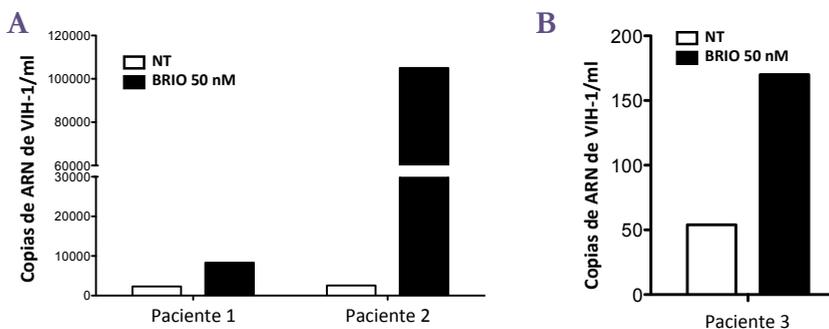


Figura 57. Reactivación viral en linfocitos T CD4 procedentes de pacientes VIH-1 positivos con viremia suprimida. Los linfocitos T CD4 se purificaron por selección negativa a partir de CMSP aisladas de tres pacientes VIH-1 infectados bajo TAR. Se cultivaron en presencia de ATP a 30 μ M con o sin BRIO a 50 nM. Después de 2 (A) o 6 (B) días de cultivo se cuantificó el ARN del VIH-1 en el sobrenadante de los cultivos utilizando el kit TaqMan HIV-1 Cobas AmpliPrep.

Discusión



5.1 EL MOTIVO PGPG DE LA PROTEÍNA NEF DEL VIH-1 COMO POSIBLE NUEVA DIANA TERAPÉUTICA

La formación y estabilización del complejo Nef/Lck es un paso clave para la infección viral y para el escape del control inmunitario de las células infectadas. En la proteína Nef del VIH-1 existen dos sitios independientes que interactúan de forma sinérgica con los dominios SH3 y SH2 de Lck: mientras que el dominio poli-prolina (PxxP) media la unión al dominio SH3 (Saksela y col., 1995; Collette y col., 1996), se desconoce el dominio de Nef implicado en la unión al dominio SH2. El único dato que se dispone a este respecto es que la unión de la proteína Nef del VIH-1 a Lck-SH2 no requiere de la fosforilación de residuos tirosina como en el caso de la proteína Nef del VIS (Dutartre y col., 1998).

En la Sección 1 se ha presentado la identificación del motivo PGPG como un determinante molecular nuevo implicado en la interacción Nef/Lck-SH2. Es de destacar que el motivo PGPG se encuentra en la región central de la proteína Nef, de aproximadamente 28 residuos, que abarca varios motivos importantes en la proteína Nef del VIH-1, como el bolsillo hidrofóbico (116HTQGY120), que participa en la interacción con el dominio SH3 de Hck (Choi y Smithgall, 2004), el dominio de dimerización (121FPD123) (Liu y col., 2000), el sitio de unión a la proteína AIP-1 (*Actin Interacting Protein-1*) (135YPLTF139) (Costa y col., 2006), y un posible sitio de ubiquitinación (K144) (Jin y col., 2008; Cai y col., 2011). Además, en 2011 Sarmady y colaboradores realizaron un algoritmo de predicción computacional en el que resaltaban al motivo PGPG como un sitio potencial de interacción con proteínas de la célula T hospedadora como ARF1, MAPK y Fyn, además de la proteína Lck (Sarmady y col., 2011).

En los experimentos de interacción se ha observado que el motivo PGPG parecía también estar implicado en la interacción con el dominio SH3 de Lck. Este resultado concuerda con el mecanismo de cooperación y sinergia propuesto para la interacción del complejo Nef/Lck a través de la unión a los dominios SH2 y SH3. De hecho, la unión a través del dominio SH2 de Lck parece insuficiente para soportar la interacción total Nef/Lck, ya que el mutante del dominio PxxP, aun interactuando con el dominio SH2, no interactúa bien con la proteína recombinante Lck-SH3SH2 (apartado 4.1.5) o con Lck completa (Greenway y col., 1999). A diferencia de lo que ocurre en la interacción Nef/Lck, la interacción de Nef con Hck, otra proteína de la familia tirosina quinasa, sólo parece implicar al dominio SH3 de Hck y al PxxP de Nef (Lee y col., 1995; Greenway y col., 1999). Sin embargo, Lee y colaboradores demostraron que la mayor afinidad del complejo Nef/Hck-SH3 se daba para la proteína Nef intacta (Lee



y col., 1995), indicando que, muy posiblemente, se necesitarían contactos adicionales para lograr una interacción óptima. Por ello, sería interesante estudiar la especificidad de unión del motivo Nef-PGPG con el dominio SH2 de otras proteínas tirosina quinasa, como Hck, Fyn o Lyn.

Los resultados obtenidos sugieren que la unión inicial de Nef con el dominio SH2 de Lck podría causar una serie de cambios conformacionales en la estructura de ambas proteínas (Nef y Lck) encaminados a favorecer la accesibilidad del dominio PxxP hacia el dominio SH3 de Lck y, como resultado, estabilizar el complejo Nef/Lck. En esta línea, se ha demostrado que el motivo PGPG de Nef es estrictamente necesario para la disminución de la expresión de CD4 en la membrana plasmática de linfocitos T (apartado 4.1.2) o HeLa-CD4/Lck, pero no en células HeLa-CD4 (apartado 4.1.3), por lo que su funcionalidad está estrictamente relacionada con la expresión de Lck en las células. Por otra parte, dado que las mutaciones en el motivo PGPG no afectaron a aquellas actividades dependientes del dominio di-leucina como la interacción Nef/AP-1 o la expresión en superficie del Tf-R y su tráfico (apartado 4.1.4), el motivo PGPG sería necesario para inducir el desacoplamiento CD4/Lck a través de la interacción Nef/Lck, favoreciendo la internalización de CD4 mediada por el dominio di-leucina en linfocitos T. Además, el fenotipo diferencial sobre la disminución de la expresión de CD4 en la membrana plasmática observada entre los distintos mutantes del dominio PGPG, sugieren claramente que las mutaciones en los aminoácidos centrales (129PGPG132) no promueven impacto alguno en la dimerización ni en la estructura global de proteína Nef del VIH-1. Sin embargo, mutaciones en los residuos Y127, T128, V133, R134, Y135 y P136 provocan una pérdida total de la funcionalidad de la proteína independientemente de la expresión o no de Lck, sugiriendo una pérdida global de estructura. Los resultados funcionales obtenidos concuerdan con estudios estructurales de Nef, que describen que el dominio PGPG forma un bucle en el que los aminoácidos centrales (129PGPG132) no parecen tener ninguna función estructural mientras que los aminoácidos flanqueantes (127YT128 y 133VRYP136) participan en los enlaces de hidrógeno que estabilizan las láminas beta ($\beta 2$ y $\beta 3$ respectivamente) que conforman (Grzesiek y col., 1997).

También se ha mostrado el requerimiento del motivo PGPG para el reclutamiento intracelular de Lck (apartado 4.1.6) y la mejora de la infectividad de virus formados en linfocitos T (apartado 4.1.8). El reclutamiento intracelular de Lck en endosomas de reciclaje en linfocitos T infectados por el VIH-1 es una función conservada de las proteínas Nef (Rudolph y col., 2009) y afecta principalmente a su forma fosforilada en las Tyr 505/394 (Lck pTyr505/394) (Pan y col., 2012). Este efecto fue dependiente de la integridad del motivo PGPG y, en menor medida, del motivo PxxP. Dado que



los dominios SH2 y SH3 de Lck son necesarios tanto para la dimerización como para la actividad catalítica de la quinasa (Lee-Fruman y col., 1996), la proteína Nef podría afectar al correcto plegamiento de Lck debido a su interacción a través de los motivos PGPG y PxxP. Nef favorece la aparición de la forma pTyr505/394, doblemente fosforilada, en las células en reposo debido posiblemente al antagonismo del dominio SH2, sugiriendo que Nef podría desacoplar la señalización vía TCR antes incluso del proceso de reconocimiento del TCR. Este antagonismo también podría afectar a la fosforilación de los sustratos de Lck. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que Nef inhibe la activación TCR-dependiente de linfocitos T infectados por el VIH-1 (Thoulouze y col., 2006), pero activa de forma remota la vía de Ras-Erk a través de una porción de Lck catalíticamente activa acumulada en los compartimentos internos (Pan y col., 2012). De hecho, este podría ser el mecanismo molecular que Nef emplea para favorecer una óptima replicación viral y la diseminación célula-célula que tiene lugar en la sinapsis virológica (Sol-Foulon y col., 2007; Rudnicka y Schwartz, 2009).

Por último, se ha demostrado la necesidad del motivo PGPG para la óptima infectividad viral de virus aislados. Así, los virus con mutaciones en el motivo PGPG fueron tan deficientes como los virus Δ Nef, que no expresan la proteína, siempre y cuando fueran producidos en linfocitos T. Se ha descrito que Lck es capaz de interactuar y dirigir la proteína viral Gag hacia la membrana plasmática con el fin de conectar con Nef y otros componentes virales, dando lugar al ensamblaje y la liberación del virus (von Schwedler y col., 2003; Costa y col., 2006; Strasner y col., 2008). Por lo tanto, Nef podría reclutar Lck a través de, entre otras, la interacción del motivo PGPG con el dominio SH2 de Lck, y alterar el perfil de sustratos fosforilados por la quinasa, asegurando así el correcto direccionamiento de las proteínas virales a las plataformas de ensamblaje viral en la célula infectada.

Sin duda, el mayor avance ha sido la identificación del motivo PGPG como un determinante molecular específico en la proteína Nef del VIH-1 necesario para la óptima infectividad viral en células T. Es muy interesante destacar que el dominio PGPG identificado en esta Memoria se ha encontrado en otras proteínas virales como en la proteína Tax del virus T linfotrópico humano (HTLV1 y 2) o en la proteína EP402R del virus de la fiebre porcina (ASFV), dos proteínas virales auxiliares implicadas en la replicación viral. Estas proteínas muestran una identidad de secuencia con el bucle PGPG de Nef del 70% y el 78% respectivamente.

Al igual que ocurre con otros motivos lineales cortos (Davey y col., 2011; Sarmady y col., 2011), la recurrencia de motivos PGPG en especies virales no relacionadas sugiere un mecanismo evolutivo para la adquisición de regiones funcionales necesarias para



adaptarse o modificar los mecanismos de la célula huésped. Este hecho permitiría el diseño de estrategias terapéuticas de amplio espectro, que pudieran tener actividad sobre diferentes virus infecciosos. En lo que se refiere a la infección por el VIH-1, los resultados obtenidos podrían ser la base para el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas para superar la aparición de cepas de VIH-1 resistentes a los medicamentos actuales. En esta línea, se podrían diseñar fármacos dirigidos específicamente contra el dominio SH2 de Lck para bloquear la interacción Nef/Lck e inhibir así las funciones centrales de Nef durante el ciclo replicativo del VIH-1, como el reclutamiento de CD4, de Lck y la infectividad de los viriones.

5.2 LA BRIOSTATINA-1 COMBINADA CON MARAVIROC Y/O ATRIPLA® COMO FÁRMACO ANTI-LATENCIA

Las limitaciones de la TAR actual y la falta de una vacuna eficaz contra el VIH-1 subrayan la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la erradicación del VIH-1, lo cual representa hoy en día un gran desafío para la investigación en la lucha contra el SIDA. El bajo número de células latentemente infectadas por el VIH-1 *in vivo* así como la falta de marcadores consenso para esta subpoblación, hace que el aislamiento y el análisis bioquímico de estas células sean difíciles y controvertidos. Por ello, para explorar el impacto de la combinación de MVC y/o ATP con BRIO sobre el VIH-1 latente se han empleado las líneas celulares JLTRG-R5, J89GFP y THP89GFP como modelos experimentales de latencia de post-integración del VIH-1. Similar a lo que ocurre en los linfocitos T CD4 latentemente infectados, en estas células el promotor (JLTRG-R5) o el genoma (J89GFP y THP89GFP) del VIH-1 se inhibe en el nivel transcripcional y la reactivación viral se puede medir mediante la detección por citometría de flujo de la expresión de GFP. Numerosos investigadores han estudiado los efectos de la BRIO sobre el VIH-1 latente, así como sus efectos sobre la expresión de las moléculas CD4 y CXCR4 en la superficie de la membrana plasmática (Mehla y col., 2010; Pérez y col., 2010; Sanchez-Duffhues y col., 2011). En esta Memoria se ha investigado el potencial efecto de BRIO en combinación con MVC y/o ATP en la reactivación viral utilizando modelos linfocíticos (JLTRG-R5 y J89GFP) o monocíticos (THP89GFP) de infección latente. Además, se ha evaluado la actividad anti-VIH-1 de estas combinaciones en modelos de infección aguda de VIH-1 con distinto tropismo (X4, R5 y dual trópicos).

Un aspecto atractivo de la BRIO es que es un fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y que ya ha sido probado en ensayos clínicos en humanos para el tratamiento del cáncer y de la enfermedad de Alzheimer, por lo que se dispone de los datos sobre su farmacocinética y la toxicidad en humanos (Filipp y col., 2004; Sun y



Alkon, 2006; Irie y col., 2012). De hecho, el suministro de BRIO a concentraciones entre 2 y 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en sangre se ha asociado con efectos secundarios como mialgia, fatiga, náusea y vómitos (Zonder y col., 2001), aunque algunos ensayos clínicos en fase II mostraron que la BRIO a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en sangre fue razonablemente bien tolerada (Madhusudan y col., 2003). A pesar de que hay cierta controversia en la tolerabilidad de la BRIO, en ambos casos, la concentración del fármaco utilizado (alrededor de 2 μM) supera entre 20 y 40 veces la concentración de BRIO que se ha utilizado en este estudio, 100 nM en las líneas celulares y 50 nM en las células primarias. De hecho, se ha demostrado que la BRIO a 50 nM es capaz de reactivar el VIH-1 latente, por lo que existiría la posibilidad de realizar ensayos clínicos con dosis más bajas de BRIO. Existen varias aproximaciones que se podrían llevar a cabo para mejorar no sólo los efectos de la BRIO en cuanto a reactivación y eliminación del virus del organismo, sino también en aspectos como la farmacodinámica y tolerabilidad en los pacientes. Por ejemplo, el trabajo llevado a cabo por DeChristopher y colaboradores (DeChristopher y col., 2012) es el primero en el que se describe el diseño de moléculas análogas a la BRIO, comparables a este compuesto en actividad, pero con la posibilidad de adaptarse a las necesidades clínicas. También Kovoichich y colaboradores (Kovoichich y col., 2011) han desarrollado una nanopartícula lipídica cargada con briostatina-2 y el inhibidor de la proteasa viral nelfinavir. En conjunto, estos trabajos demuestran la potencialidad de las aproximaciones nanotecnológicas para proporcionar mejores métodos para activar el VIH-1 latente e inhibir la propagación viral.

Los mecanismos moleculares que subyacen a la latencia del VIH-1 están lejos de ser completamente entendidos, por lo que cada vez es más necesaria la identificación de nuevos fármacos capaces de reactivar el VIH-1 latente. Los iHDAC como el vorinostato, los agentes demetilantes como la 5-azacitidina y los agonistas de PKC como la prostatina y la BRIO, se han propuesto como candidatos para purgar los reservorios virales a través de la reactivación y eliminación del VIH-1. Debido a la complejidad de los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento y mantenimiento de la latencia viral, es probable que se necesite una actividad combinada o sinérgica entre distintos compuestos que actúen en diversas vías para reactivar de forma efectiva el VIH-1 latente en los diferentes reservorios. Por ejemplo, se ha demostrado la sinergia de la BRIO con los iHDAC para antagonizar el VIH-1 latente (Pérez y col., 2010). Además, existe una línea de investigación centrada en la terapia de inmunoactivación (IAT) que defiende que la reactivación se podría lograr mediante ciclos alternativos de IAT más intensificación del TAR, seguido de ciclos estándar de TAR. En esta línea, la administración de MVC en el cóctel de intensificación podría mejorar la actividad anti-latencia de la BRIO, pudiendo, llegado el caso, disminuir más aún las dosis de este



fármaco, y por ende, sus efectos secundarios.

Los AR que se han utilizado como combinaciones posibles con la BRIO han sido ATP y MVC. Cada componente activo de ATP (efavirenz, tenofovir y emtricitabina) inhibe la actividad retrotranscriptasa del VIH-1, resultando en la inhibición de la replicación viral (Bousquet y col., 2009), por lo tanto, este fármaco por sí sólo es eficaz contra la infección por el VIH-1 como un régimen completo y su tratamiento está indicado en adultos y pacientes pediátricos a partir de 12 años de edad. MVC es un agente AR que bloquea la interacción entre el VIH-1 y el correceptor CCR5, un paso crucial en el ciclo viral (Dorr y col., 2005); su seguridad, tolerabilidad y eficacia se ha demostrado en ensayos clínicos en pacientes tanto *naive* como experimentados en TAR (Dorr y col., 2005; Cooper y col., 2010). Las características de estos dos fármacos indican su idoneidad para su uso cotidiano en la práctica clínica y, por tanto, para su combinación con compuestos de reactivación.

Sin embargo, la combinación ATP-MVC no está muy extendida en la práctica clínica, por lo que sería de gran interés estudiar la potencial actividad de la BRIO combinada con otros AR, especialmente aquellos que actúan en las etapas finales del ciclo del VIH-1, como inhibidores de la proteasa, en la reactivación del virus latente. Este diseño, impediría la maduración de los virus reactivados, un paso previo a la inhibición de la infección (en la entrada y en la retrotranscripción) utilizado en esta Memoria. También sería de gran interés analizar el efecto de la combinación de la BRIO con fármacos que se han desarrollado recientemente, como el BMS663068, pro-fármaco que da lugar al primer inhibidor de la unión CD4-gp120, el MK-1439, un nuevo ITINAN o el GSK744 (Spreen y col., 2013), nuevo compuesto inhibidor de la integrasa, cuyos resultados preliminares presentados en la conferencia sobre retrovirus y enfermedades oportunistas (CROI) que tuvo lugar en Boston en marzo de 2014 indican que tienen una gran actividad antiviral y por lo tanto su combinación con un fármaco anti-latencia como la BRIO podría tener un efecto mayor en la disminución/eliminación de la latencia viral.

Los modelos experimentales que se han desarrollado en esta Memoria con el objetivo de evaluar al mismo tiempo la reactivación viral y la inhibición de la infección de los nuevos viriones han proporcionado información muy relevante, aunque presentan algunas limitaciones. En primer lugar, en el modelo de co-cultivo entre las células THP89GFP tratadas con BRIO o sus sobrenadantes con las células reporteras TZM-bl (apartado 4.2.5) no se ha logrado la inhibición total de la infección de las células TZM-bl pre-tratadas con ATP, probablemente debido a la súper infección del sistema, pero parece ser un modelo reportero preciso para evaluar la infectividad del VIH-1



reactivado. En segundo lugar, el modelo *in vitro* de CMSP en reposo infectadas, no se generó exactamente como se ha descrito previamente (Gondois-Rey y col., 2001). En éste, se infectaron CMSP totales en vez de linfocitos T CD4 previamente purificados; además, tampoco se eliminaron las células activadas tras el periodo de infección y reposo, aunque la activación celular fue mínima, tal como mostraron los análisis de expresión de los marcadores de activación celular CD25, CD69 y HLA-DR. Lo más interesante es que este sistema se aproxima más a una situación fisiológica, en la que se detecta cierta viremia residual que, en ausencia de TAR, se incrementa durante el tiempo de cultivo debido a la activación gradual causada por el propio virus o por la infección de nuevas células. En este contexto, el tratamiento con BRIO aumentó aún más la liberación de Agp24Gag a los 3 y 6 días post-tratamiento, aumento que se invirtió claramente cuando se combinó con ATP (apartado 4.2.5). Es importante resaltar que el tratamiento con BRIO no indujo niveles altos de expresión de marcadores de activación temprana como CD25, ni del marcador de activación tardía HLA-DR. Estos datos sugieren claramente que la BRIO y su combinación con ATP generan niveles bajos de activación celular global, así como de proliferación de células T CD4, incluso a 6 días post-tratamiento (apartado 4.2.6).

El SNC es un importante reservorio para el VIH-1; en particular, el cerebro representa un santuario para el virus latente, puesto que ofrece un entorno protegido tanto del sistema inmunológico como de la penetración efectiva de fármacos, sirviendo así como un compartimento de replicación persistente del VIH-1. Debido a la capacidad de la BRIO de atravesar la BHE (Zhang y col., 1996; Sun y Alkon, 2006), utilizar este compuesto como reactivador de latencia, podría no ser únicamente eficaz en la reactivación del reservorio en linfocitos T CD4, sino también en células del SNC. De hecho, los resultados muestran cómo la BRIO activa la vía del factor de transcripción NF- κ B, promoviendo su translocación al núcleo celular tanto en células de astrocitoma como en astrocitos primarios humanos, mecanismo que podría mediar el aumento de la actividad del promotor viral en las células U87 (apartado 4.2.7).

Hasta la fecha no existen datos para priorizar el grado de penetrabilidad en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a la hora de escoger una pauta de TAR excepto en pacientes en los que se sospeche una encefalopatía por VIH-1 o presenten síntomas de trastornos neurocognitivos; pero si se planteara una terapia de reactivación con BRIO combinada con TAR habría que tener en cuenta que los fármacos antivirales que la acompañaran deberían de tener una penetrabilidad suficiente en el LCR, de forma que alcanzaran la concentración necesaria para inhibir nuevas infecciones por parte del virus reactivado por la BRIO en este compartimento. Según los datos disponibles actualmente, los



análogos de nucleósido poseen en general buena penetración, siendo la zidovudina (van Praag y col., 2002), el abacavir (Capparelli y col., 2005) y la emtricitabina (Calcagno y col., 2011) los AR que alcanzan mayores concentraciones en el SNC. La excepción es el análogo de nucleótido tenofovir, que a pesar de presentar una escasa unión a proteínas, es una molécula altamente polar con relativa baja liposolubilidad, lo que interfiere en su penetrabilidad al LCR, alcanzando concentraciones inferiores a la IC50 en un 23% de los pacientes (Best y col., 2012). Por su parte, MVC es un fármaco con una baja afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que facilitarí su paso por la BHE, pero sus concentraciones en el SNC, aunque superan la IC90, se ven afectadas por mecanismos de eflujo como la glicoproteína-p de la cual MVC es sustrato (Yilmaz y col., 2009; Tiraboschi y col., 2010). Por tanto, a la hora de realizar estudios similares *in vitro* de efectividad en la combinación de BRIO con otros fármacos AR, el grado de penetrabilidad de los AR debería ser un factor a tener en consideración.

Es muy importante resaltar que los resultados obtenidos *in vitro* en modelos de infección por el VIH-1 latente se han corroborado *ex vivo* en células T CD4 de pacientes infectados por el VIH-1, en TAR y con viremia suprimida durante al menos dos años. El tratamiento con BRIO de las células procedentes de pacientes VIH-1+ bajo TAR indujo de manera excepcional la replicación viral (apartado 4.2.8), alcanzando niveles de reactivación muy superiores a los obtenidos por Beans y colaboradores con análogos potentes de prostatina (Beans y col., 2013).

La idea de combinar agentes reactivadores con AR ya ha sido desarrollada con anterioridad aunque no con mucho éxito. De hecho numerosos estudios han mostrado el fracaso en la disminución del reservorio viral latente tras el tratamiento con ácido valproico en presencia o no de TAR (Siliciano y col., 2007; Archin y col., 2008; Sagot-Lerolle y col., 2008). Es probable que la falta de pruebas de concepto *in vitro* o *ex vivo* sobre la eficacia de las combinaciones sea una de las causas del fracaso de estos ensayos.

Este trabajo es el primero en demostrar que la combinación de BRIO con MVC y/o ATP no interfiere con las funciones que ejerce la BRIO en la reactivación de las células con infección latente y en la inhibición parcial de la infección debido a la disminución de la expresión de CD4 y CXCR4, ni en la capacidad antiviral de los AR. Es de suponer, pero hay que demostrarlo, que suceda lo mismo entre otras combinaciones de AR más potentes y otros fármacos anti-latencia, y hay que buscar la mejor combinación para poder llevarla a la práctica clínica. Puede que estudios como éste sienten la base para futuros ensayos clínicos de reactivación en combinación con TAR para poder, en un futuro, conseguir la destrucción selectiva de las células con infección latente y la “purga” del reservorio latente.

Conclusiones



1. El dominio PGPG comprende los aminoácidos 125-136 de la secuencia de la proteína Nef del VIH-1_{NL4.3} y está altamente conservado entre las proteínas Nef del VIH-1, VIH-2 y VIS. En su conformación tridimensional forma un bucle en el que los aminoácidos centrales 129PGPG132 quedan expuestos en la superficie de la proteína y los aminoácidos que lo flanquean forman dos láminas beta antiparalelas.
2. El motivo central PGPG participa en la interacción entre Nef y Lck, principalmente a través de la interacción con el motivo SH2, aunque también podría cooperar con el motivo poli-prolina de Nef en la interacción con el dominio SH3.
3. El motivo central PGPG es un determinante funcional nuevo en la proteína Nef del VIH-1 necesario para la disminución de la expresión de CD4 en la superficie celular, el reclutamiento intracelular de Lck y el incremento de infectividad de los viriones en linfocitos T.
4. Como consecuencia de la posible cooperación entre el dominio PGPG y el dominio poli-prolina, el motivo central PGPG también está implicado en funciones de Nef asociadas al dominio poli-prolina, como la reorganización de F-actina y la disminución de la expresión de CMH-I en la superficie celular.
5. El tratamiento con briostatina-1 induce la reactivación del VIH-1 en modelos linfocíticos y monocíticos de células latentemente infectadas y en CMSP infectadas *in vitro*, dando lugar a nuevos viriones infectivos. Además, aumenta la actividad del promotor viral tanto en células de astrocitoma como en astrocitos humanos primarios a través de un mecanismo NF- κ B dependiente.
6. La briostatina-1 produce una disminución de la expresión en superficie de CD4 y CXCR4, receptor y correceptor viral respectivamente, por lo que posee un efecto antiviral independientemente del tropismo del virus.
7. La combinación de la briostatina-1 con maraviroc y/o Atripla® no antagoniza el efecto que ejerce cada uno de los compuestos de forma independiente, bien sea en reactivación o en inhibición de la replicación viral.
8. El tratamiento de CMSP con briostatina-1 sola o combinada con los AR activa a las CMSP no activadas, aunque no produce hiperactivación en CMSP previamente activadas ni induce una proliferación significativa de linfocitos T CD4.



9. La briostatina-1 induce la reactivación viral *ex vivo* en linfocitos T CD4 aislados de individuos infectados por el VIH-1 bajo TAR y con viremia suprimida.
10. Se proponen dos herramientas que podrían contribuir a un mejor tratamiento de la infección por el VIH-1: el motivo central PGGG de Nef como potencial diana terapéutica frente al VIH-1 y el tratamiento con briostatina-1 combinada con las TAR actuales como posible estrategia para purgar los reservorios virales y conseguir erradicar el VIH-1 del organismo de individuos VIH-1+.

Referencias



~A~

- Alexander, M., Bor, Y.-C., Ravichandran, K.S., Hammarskjold, M.-L., Rekosh, D., 2004. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Associates with Lipid Rafts To Downmodulate Cell Surface CD4 and Class I Major Histocompatibility Complex Expression and To Increase Viral Infectivity. *Journal of virology* 78(4), 1685-1696.
- Allers, K., Hutter, G., Hofmann, J., Loddenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E., Schneider, T., 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood* 117(10), 2791-2799.
- Arberas, H., Guardo, A.C., Bargallo, M.E., Maleno, M.J., Calvo, M., Blanco, J.L., García, F., Gatell, J.M., Plana, M., 2013. In vitro effects of the CCR5 inhibitor maraviroc on human T cell function. *J Antimicrob Chemother* 68(3), 577-586.
- Archin, N.M., Eron, J.J., Palmer, S., Hartmann-Duff, A., Martinson, J.A., Wiegand, A., Bandarenko, N., Schmitz, J.L., Bosch, R.J., Landay, A.L., Coffin, J.M., Margolis, D.M., 2008. Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS* 22(10), 1131-1135.
- Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., Richman, D.D., Hudgens, M.G., Bosch, R.J., Coffin, J.M., Eron, J.J., Hazuda, D.J., Margolis, D.M., 2012. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487(7408), 482-485.
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., Leibowitch, J., 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277(5322), 112-116.

~B~

- Bagasra, O., Lavi, E., Bobroski, L., Khalili, K., Pestaner, J.P., Tawadros, R., Pomerantz, R.J., 1996. Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS* 10(6), 573-585.



- Banks, W.A., Freed, E.O., Wolf, K.M., Robinson, S.M., Franko, M., Kumar, V.B.,** 2001. Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. *J Virol* 75(10), 4681-4691.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautquet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L.,** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599), 868-871.
- Barton, K.M., Burch, B.D., Soriano-Sarabia, N., Margolis, D.M.,** 2013. Prospects for treatment of latent HIV. *Clinical pharmacology and therapeutics* 93(1), 46-56.
- Beans, E.J., Fournogerakis, D., Gauntlett, C., Heumann, L.V., Kramer, R., Marsden, M.D., Murray, D., Chun, T.W., Zack, J.A., Wender, P.A.,** 2013. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(29), 11698-11703.
- Bernardini, C., Maggiolo, F.,** 2013. Triple-combination rilpivirine, emtricitabine, and tenofovir (Complera/Eviplera) in the treatment of HIV infection. Patient preference and adherence 7, 531-542.
- Best, B.M., Letendre, S.L., Koopmans, P., Rossi, S.S., Clifford, D.B., Collier, A.C., Gelman, B.B., Marra, C.M., McArthur, J.C., Mccutchan, J.A., Morgello, S., Simpson, D.M., Capparelli, E.V., Ellis, R.J., Grant, I., Group, C.S.,** 2012. Low cerebrospinal fluid concentrations of the nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitor, tenofovir. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59(4), 376-381.
- Birch, M.R., Learmont, J.C., Dyer, W.B., Deacon, N.J., Zaunders, J.J., Saksena, N., Cunningham, A.L., Mills, J., Sullivan, J.S.,** 2001. An examination of signs of disease progression in survivors of the Sydney Blood Bank Cohort (SBBC). *J Clin Virol* 22(3), 263-270.
- Bomsel, M.,** 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3(1), 42-47.



- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Oldstone, M.B.**, 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68(9), 6103-6110.
- Bouchat, S., Gatot, J.S., Kabeya, K., Cardona, C., Colin, L., Herbein, G., De Wit, S., Clumeck, N., Lambotte, O., Rouzioux, C., Rohr, O., Van Lint, C.**, 2012. Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS* 26(12), 1473-1482.
- Bousquet, L., Pruvost, A., Guyot, A.C., Farinotti, R., Mabondzo, A.**, 2009. Combination of tenofovir and emtricitabine plus efavirenz: in vitro modulation of ABC transporter and intracellular drug accumulation. *Antimicrob Agents Chemother* 53(3), 896-902.
- Brack-Werner, R.**, 1999. Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS* 13(1), 1-22.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., Elledge, S.J.**, 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319(5865), 921-926.
- Bresnahan, P.A., Yonemoto, W., Ferrell, S., Williams-Herman, D., Geleziunas, R., Greene, W.C.**, 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol* 8(22), 1235-1238.
- Briand, G., Barbeau, B., Corbeil, J., Tremblay, M.**, 1997. Enhancement of HIV-1-induced syncytium formation in T cells by the tyrosyl kinase p56lck. *Virology* 231(1), 10-19.
- Bruisten, S.M., Frissen, P.H., Van Swieten, P., Harrigan, P.R., Kinghorn, I., Larder, B., Weigel, H.M., De Vries, E., Regez, R.M., Henrichs, J.H., Koot, M., Huisman, J.G.**, 1997. Prospective longitudinal analysis of viral load and surrogate markers in relation to clinical progression in HIV type 1-infected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(4), 327-335.
- Busch, M.P., Satten, G.A.**, 1997. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *The American journal of medicine* 102(5B), 117-124; discussion 125-116.



~C~

- Cai, C.Y., Zhang, X., Sinko, P.J., Burakoff, S.J., Jin, Y.-J.**, 2011. Two Sorting Motifs, a Ubiquitination Motif and a Tyrosine Motif, Are Involved in HIV-1 and Simian Immunodeficiency Virus Nef-Mediated Receptor Endocytosis. *J Immunol* 186(10), 5807-5814.
- Calcagno, A., Bonora, S., Simiele, M., Rostagno, R., Tettoni, M.C., Bonasso, M., Romito, A., Imperiale, D., D'avolio, A., Di Perri, G.**, 2011. Tenofovir and emtricitabine cerebrospinal fluid-to-plasma ratios correlate to the extent of blood-brainbarrier damage. *AIDS* 25(11), 1437-1439.
- Cannon, P., June, C.**, 2011. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Current opinion in HIV and AIDS* 6(1), 74-79.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., Ho, D.D.**, 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 332(4), 201-208.
- Capparelli, E.V., Letendre, S.L., Ellis, R.J., Patel, P., Holland, D., Mccutchan, J.A.**, 2005. Population pharmacokinetics of abacavir in plasma and cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6), 2504-2506.
- Carl, S., Greenough, T.C., Krumbiegel, M., Greenberg, M., Skowronski, J., Sullivan, J.L., Kirchhoff, F.**, 2001. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J Virol* 75(8), 3657-3665.
- Choi, H.J., Smithgall, T.E.**, 2004. Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase. *Journal of molecular biology* 343(5), 1255-1268.
- Chowers, M.Y., Spina, C.A., Kwoh, T.J., Fitch, N.J., Richman, D.D., Guatelli, J.C.**, 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 68(5), 2906 - 2914.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., Diguseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P., Siliciano, R.F.**, 1997a. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387(6629), 183-188.



- Chun, T.W., Davey, R.T., Jr., Engel, D., Lane, H.C., Fauci, A.S., 1999a. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* 401(6756), 874-875.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., Fauci, A.S., 1998. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15), 8869-8873.
- Chun, T.W., Engel, D., Mizell, S.B., Hallahan, C.W., Fischette, M., Park, S., Davey, R.T., Jr., Dybul, M., Kovacs, J.A., Metcalf, J.A., Mican, J.M., Berrey, M.M., Corey, L., Lane, H.C., Fauci, A.S., 1999b. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 5(6), 651-655.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., Siliciano, R.F., 1995. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* 1(12), 1284-1290.
- Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., Fauci, A.S., 1997b. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24), 13193-13197.
- Clay, P.G., Taylor, T.A., Glaros, A.G., Mcrae, M., Williams, C., Mccandless, D., Oelklaus, M., 2008. "One pill, once daily": what clinicians need to know about Atriplatrade mark. *Ther Clin Risk Manag* 4(2), 291-302.
- Collette, Y., Dutartre, H., Benziane, A., Ramos, M., Benarous, R., Harris, M., Olive, D., 1996. Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects. *J Biol Chem* 271(11), 6333-6341.
- Cooper, D.A., Heera, J., Goodrich, J., Tawadrous, M., Saag, M., Dejesus, E., Clumeck, N., Walmsley, S., Ting, N., Coakley, E., Reeves, J.D., Reyes-Teran, G., Westby, M., Van Der Ryst, E., Ive, P., Mohapi, L., Mingrone, H., Horban, A., Hackman, F., Sullivan, J., Mayer, H., 2010. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 201(6), 803-813.
- Costa, L., Chen, N., Lopes, A., Aguiar, R., Tanuri, A., Plemenitas, A., Peterlin, B.M., 2006. Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1. *Retrovirology* 3(1), 33.



- Craig, H.M., Pandori, M.W., Guatelli, J.C.**, 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19), 11229-11234.
- Craig, H.M., Reddy, T.R., Riggs, N.L., Dao, P.P., Guatelli, J.C.**, 2000. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology* 271(1), 9-17.

~D~

- Davey, N.E., Trave, G., Gibson, T.J.**, 2011. How viruses hijack cell regulation. *Trends in biochemical sciences* 36(3), 159-169.
- Davey, R.T., Jr., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., Kovacs, J.A., Polis, M.A., Walker, R.E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D.S., Fauci, A.S., Lane, H.C.**, 1999. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26), 15109-15114.
- De Clercq, E.**, 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International journal of antimicrobial agents* 33(4), 307-320.
- Dechristopher, B.A., Loy, B.A., Marsden, M.D., Schrier, A.J., Zack, J.A., Wender, P.A.**, 2012. Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nat Chem* 4(9), 705-710.
- Deeks, S.G., Autran, B., Berkhout, B., Benkirane, M., Cairns, S., Chomont, N., Chun, T.W., Churchill, M., Di Mascio, M., Katlama, C., Lafeuillade, A., Landay, A., Lederman, M., Lewin, S.R., Maldarelli, F., Margolis, D., Markowitz, M., Martínez-Picado, J., Mullins, J.I., Mellors, J., Moreno, S., O'doherty, U., Palmer, S., Penicaud, M.C., Peterlin, M., Poli, G., Routy, J.P., Rouzioux, C., Silvestri, G., Stevenson, M., Telenti, A., Van Lint, C., Verdin, E., Wolfrey, A., Zaia, J., Barre-Sinoussi, F.**, 2012. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nature reviews. Immunology* 12(8), 607-614.



- Dejesus, E., Rockstroh, J.K., Henry, K., Molina, J.M., Gathe, J., Ramanathan, S., Wei, X., Yale, K., Szwarcberg, J., White, K., Cheng, A.K., Kearney, B.P., Team, G.S.S., 2012. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate versus ritonavir-boosted atazanavir plus co-formulated emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* 379(9835), 2429-2438.
- Del Real, G., Jimenez-Baranda, S., Mira, E., Lacalle, R.A., Lucas, P., Gómez-Mouton, C., Alegret, M., Pena, J.M., Rodriguez-Zapata, M., Alvarez-Mon, M., Martínez, A.C., Manes, S., 2004. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *The Journal of experimental medicine* 200(4), 541-547.
- Didigu, C.A., Wilen, C.B., Wang, J., Duong, J., Secreto, A.J., Danet-Desnoyers, G.A., Riley, J.L., Gregory, P.D., June, C.H., Holmes, M.C., Doms, R.W., 2014. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood* 123(1), 61-69.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., Webster, R., Armour, D., Price, D., Stammen, B., Wood, A., Perros, M., 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11), 4721-4732.
- Douek, D.C., 2003. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS reviews* 5(3), 172-177.
- Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S., Rabson, A.B., 1989. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15), 5974-5978.
- Dutartre, H., Harris, M., Olive, D., Collette, Y., 1998. The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein binds the Src-related tyrosine kinase Lck SH2 domain through a novel phosphotyrosine independent mechanism. *Virology* 247(2), 200-211.



~E~

- Emmelkamp, J.M., Rockstroh, J.K.,** 2007. CCR5 antagonists: comparison of efficacy, side effects, pharmacokinetics and interactions--review of the literature. *European journal of medical research* 12(9), 409-417.
- Engelman, A., Cherepanov, P.,** 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews. Microbiology* 10(4), 279-290.

~F~

- Fackler, O.T., Alcover, A., Schwartz, O.,** 2007. Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nature reviews. Immunology* 7(4), 310-317.
- Fackler, O.T., D'aloja, P., Baur, A.S., Federico, M., Peterlin, B.M.,** 2001. Nef from human immunodeficiency virus type 1(F12) inhibits viral production and infectivity, pp. 6601 - 6608.
- Fackler, O.T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A.S., Peterlin, B.M.,** 1999. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions, pp. 729 - 739.
- Filipp, D., Leung, B.L., Zhang, J., Veillette, A., Julius, M.,** 2004. Enrichment of lck in lipid rafts regulates colocalized fyn activation and the initiation of proximal signals through TCR alpha beta. *J Immunol* 172(7), 4266-4274.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T.C., Chaisson, R.E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J., Siliciano, R.F.,** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5(5), 512-517.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A., Dustin, M.L.,** 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology* 28, 79-105.
- Frankel, A.D., Young, J.A.,** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67, 1-25.



Freund, J., Kellner, R., Houthaeve, T., Kalbitzer, H.R., 1994. Stability and proteolytic domains of Nef protein from human immunodeficiency virus (HIV) type 1. *European journal of biochemistry / FEBS* 221(2), 811-819.

~G~

Gendelman, H.E., Lipton, S.A., Tardieu, M., Bukrinsky, M.I., Nottet, H.S., 1994. The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *Journal of leukocyte biology* 56(3), 389-398.

Geyer, M., Fackler, O.T., Peterlin, B.M., 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO J* 2(7), 580 - 585.

Geyer, M., Munte, C.E., Schorr, J., Kellner, R., Kalbitzer, H.R., 1999. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *Journal of molecular biology* 289(1), 123-138.

Geyer, M., Peterlin, B.M., 2001. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Letters* 496(2-3), 91-95.

Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K., Sawaya, B.E., 2006. HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* 3, 28.

Gondois-Rey, F., Biancotto, A., Pion, M., Chenine, A.L., Gluschankof, P., Horejsi, V., Tamalet, C., Vigne, R., Hirsch, I., 2001. Production of HIV-1 by resting memory T lymphocytes. *AIDS* 15(15), 1931-1940.

Gorry, P.R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K.A., Gatignol, A., Vesselingh, S.L., Purcell, D.F., 2003. Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Current HIV research* 1(4), 463-473.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., Saxon, A., 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305(24), 1425-1431.

Greenberg, M.E., Lafrate, A.J., Skowronski, J., 1998. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J* 17(10), 2777-2789.



- Greene, W.C., Peterlin, B.M.,** 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8(7), 673-680.
- Greenway, A.L., Dutartre, H., Allen, K., Mcphee, D.A., Olive, D., Collette, Y.,** 1999. Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation. *J Virol* 73(7), 6152-6158.
- Grzesiek, S., Bax, A., Hu, J.S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S.J., Tjandra, N., Wingfield, P.T.,** 1997. Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef, pp. 1248 - 1263.
- Grzesiek, S., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Bax, A.,** 1996. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 35(32), 10256-10261.
- Gutiérrez, C., Díaz, L., Vallejo, A., Hernández-Novoa, B., Abad, M., Madrid, N., Dahl, V., Rubio, R., Moreno, A.M., Dronda, F., Casado, J.L., Navas, E., Pérez-Elias, M.J., Zamora, J., Palmer, S., Muñoz, E., Muñoz-Fernández, M.A., Moreno, S.,** 2011. Intensification of antiretroviral therapy with a CCR5 antagonist in patients with chronic HIV-1 infection: effect on T cells latently infected. *PloS one* 6(12), e27864.
- Gutiérrez, C., Hernández-Novoa, B., Vallejo, A., Serrano-Villar, S., Abad-Fernández, M., Madrid, N., Díaz, L., Moreno, A., Dronda, F., Zamora, J., Muñoz-Fernández, M.A., Moreno, S.,** 2013. Dynamics of the HIV-1 latent reservoir after discontinuation of the intensification of antiretroviral treatment: results of two clinical trials. *AIDS* 27(13), 2081-2088.

~H~

- Haase, A.T.,** 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322(6075), 130-136.
- Hale, K.J., Hummersone, M.G., Manaviazar, S., Frigerio, M.,** 2002. The chemistry and biology of the bryostatin antitumour macrolides. *Nat Prod Rep* 19(4), 413-453.
- Haller, C., Rauch, S., Fackler, O.T.,** 2007. HIV-1 Nef Employs Two Distinct Mechanisms to Modulate Lck Subcellular Localization and TCR Induced Actin Remodeling. *PLoS ONE* 2(11), e1212.



- Hamer, D.H., Bocklandt, S., Mchugh, L., Chun, T.W., Blumberg, P.M., Sigano, D.M., Márquez, V.E.**, 2003. Rational design of drugs that induce human immunodeficiency virus replication. *Journal of virology* 77(19), 10227-10236.
- Hao, M., Maxfield, F.R.**, 2000. Characterization of Rapid Membrane Internalization and Recycling. *J. Biol. Chem.* 275(20), 15279-15286.
- Haseltine, W.A.**, 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5(10), 2349-2360.
- He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C.R., Sodroski, J., Gabuzda, D.**, 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385(6617), 645-649.
- Henrard, D.R., Phillips, J.F., Muenz, L.R., Blattner, W.A., Wiesner, D., Eyster, M.E., Goedert, J.J.**, 1995. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 274(7), 554-558.
- Hezareh, M., Moukil, M.A., Szanto, I., Pondarzewski, M., Mouche, S., Cherix, N., Brown, S.J., Carpentier, J.L., Foti, M.**, 2004. Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. *Antivir Chem Chemother* 15(4), 207-222.
- Hodge, D.R., Dunn, K.J., Pei, G.K., Chakrabarty, M.K., Heidecker, G., Lautenberger, J.A., Samuel, K.P.**, 1998. Binding of c-Raf1 kinase to a conserved acidic sequence within the carboxyl-terminal region of the HIV-1 Nef protein. *J Biol Chem* 273(25), 15727-15733.
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kucherer, C., Blau, O., Blau, I.W., Hofmann, W.K., Thiel, E.**, 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360(7), 692-698.

~I~

- Irie, K., Yanagita, R.C., Nakagawa, Y.**, 2012. Challenges to the development of bryostatin-type anticancer drugs based on the activation mechanism of protein kinase Cdelta. *Medicinal research reviews* 32(3), 518-535.



~J~

- Janssen, R.S., Nwanyanwu, O.C., Selik, R.M., Stehr-Green, J.K.,** 1992. Epidemiology of human immunodeficiency virus encephalopathy in the United States. *Neurology* 42(8), 1472-1476.
- Janvier, K., Craig, H., Hitchin, D., Madrid, R., Sol-Foulon, N., Renault, L., Cherfils, J., Cassel, D., Benichou, S., Guatelli, J.,** 2003. HIV-1 Nef Stabilizes the Association of Adaptor Protein Complexes with Membranes. *J Biol Chem* 278(10), 8725-8732.
- Jin, Y.-J., Cai, C.Y., Zhang, X., Burakoff, S.J.,** 2008. Lysine 144, a Ubiquitin Attachment Site in HIV-1 Nef, Is Required for Nef-Mediated CD4 Down-Regulation. *J Immunol* 180(12), 7878-7886.
- Jones, K.A., Peterlin, B.M.,** 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 63, 717-743.

~K~

- Kahn, J.O., Walker, B.D.,** 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339(1), 33-39.
- Katlama, C., Deeks, S.G., Autran, B., Martínez-Picado, J., Van Lunzen, J., Rouzioux, C., Miller, M., Vella, S., Schmitz, J.E., Ahlers, J., Richman, D.D., Sekaly, R.P.,** 2013. Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. *Lancet* 381(9883), 2109-2117.
- Keele, B.F., Tazi, L., Gartner, S., Liu, Y., Burgon, T.B., Estes, J.D., Thacker, T.C., Crandall, K.A., McArthur, J.C., Burton, G.F.,** 2008. Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82(11), 5548-5561.
- Kestier, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C.,** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65(4), 651-662.
- Khanlou, H., Salmon-Ceron, D., Sicard, D.,** 1997. [Characteristics of rapid progressors in HIV infection]. *Annales de medecine interne* 148(2), 163-166.



- Kinter, A.L., Poli, G., Maury, W., Folks, T.M., Fauci, A.S.,** 1990. Direct and cytokine-mediated activation of protein kinase C induces human immunodeficiency virus expression in chronically infected promonocytic cells. *Journal of virology* 64(9), 4306-4312.
- Kirchhoff, F.,** 2009. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nature reviews. Microbiology* 7(6), 467-476.
- Kovochich, M., Marsden, M.D., Zack, J.A.,** 2011. Activation of latent HIV using drug-loaded nanoparticles. *PloS one* 6(4), e18270.
- Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J.E., Brack-Werner, R.,** 2005. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus research* 111(2), 194-213.
- Kulkosky, J., Culnan, D.M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Boyd, M.R., Pomerantz, R.J.,** 2001. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* 98(10), 3006-3015.
- Kulkosky, J., Nunnari, G., Otero, M., Calarota, S., Dornadula, G., Zhang, H., Malin, A., Sullivan, J., Xu, Y., Desimone, J., Babinchak, T., Stern, J., Cavert, W., Haase, A., Pomerantz, R.J.,** 2002. Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 186(10), 1403-1411.
- Kutsch, O., Benveniste, E.N., Shaw, G.M., Levy, D.N.,** 2002. Direct and quantitative single-cell analysis of human immunodeficiency virus type 1 reactivation from latency. *Journal of virology* 76(17), 8776-8786.

~L~

- Lafeuillade, A., Poggi, C., Chadapaud, S., Hittinger, G., Chouraqui, M., Pisapia, M., Delbeke, E.,** 2001. Pilot study of a combination of highly active antiretroviral therapy and cytokines to induce HIV-1 remission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(1), 44-55.
- Laguette, N., Bregnard, C., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., Basmaciogullari, S.,** 2009. Nef-Induced CD4 Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Host Cells: Role of p56lck Kinase. *J Virol* 83(14), 7117-7128.



- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., Saksela, K., 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *Embo J* 14(20), 5006-5015.
- Lee-Fruman, K.K., Collins, T.L., Burakoff, S.J., 1996. Role of the Lck Src homology 2 and 3 domains in protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 271(40), 25003-25010.
- Lehrman, G., Ylisastigui, L., Bosch, R.J., Margolis, D.M., 2004. Interleukin-7 induces HIV type 1 outgrowth from peripheral resting CD4+ T cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36(5), 1103-1104.
- Levy, Y., Lacabaratz, C., Weiss, L., Viard, J.P., Goujard, C., Lelievre, J.D., Boue, F., Molina, J.M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoel, V., Crougths, T., Beq, S., Thiebaut, R., Chene, G., Morre, M., Delfraissy, J.F., 2009. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest* 119(4), 997-1007.
- Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., Haase, A.T., 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 434(7037), 1148-1152.
- Liu, L.X., Heveker, N., Fackler, O.T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., Peterlin, B.M., Dumas, C., Schwartz, O., Benichou, S., Benarous, R., 2000. Mutation of a Conserved Residue (D123) Required for Oligomerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Abolishes Interaction with Human Thioesterase and Results in Impairment of Nef Biological Functions. *J Virol* 74(11), 5310-5319.
- Llibre, J.M., Buzón, M.J., Massanella, M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M.C., Domingo, P., Gatell, J.M., Larrouse, M., Gutiérrez, M., Palmer, S., Stevenson, M., Blanco, J., Martínez-Picado, J., Clotet, B., 2012. Treatment intensification with raltegravir in subjects with sustained HIV-1 viraemia suppression: a randomized 48-week study. *Antiviral therapy* 17(2), 355-364.
- López-Cabrera, M., Muñoz, E., Blázquez, M.V., Ursa, M.A., Santis, A.G., Sánchez-Madrid, F., 1995. Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem* 270(37), 21545-21551.



Lu, X., Yu, H., Liu, S.H., Brodsky, F.M., Peterlin, B.M., 1998. Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity* 8(5), 647-656.

~M~

Mackall, C.L., Fry, T.J., Gress, R.E., 2011. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature reviews. Immunology* 11(5), 330-342.

Madhusudan, S., Protheroe, A., Propper, D., Han, C., Corrie, P., Earl, H., Hancock, B., Vasey, P., Turner, A., Balkwill, F., Hoare, S., Harris, A.L., 2003. A multicentre phase II trial of bryostatin-1 in patients with advanced renal cancer. *British journal of cancer* 89(8), 1418-1422.

Madrid, R., Janvier, K., Hitchin, D., Day, J., Coleman, S., Noviello, C., Bouchet, J., Benmerah, A., Guatelli, J., Benichou, S., 2005. Nef-induced Alteration of the Early/Recycling Endosomal Compartment Correlates with Enhancement of HIV-1 Infectivity. *J Biol Chem* 280(6), 5032-5044.

Márquez, N., Calzado, M.A., Sánchez-Duffhues, G., Pérez, M., Minassi, A., Pagani, A., Appendino, G., Díaz, L., Muñoz-Fernández, M.A., Muñoz, E., 2008. Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. *Biochem Pharmacol* 75(6), 1370-1380.

Mehla, R., Bivalkar-Mehla, S., Zhang, R., Handy, I., Albrecht, H., Giri, S., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Chauhan, A., 2010. Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PloS one* 5(6), e11160.

Mellors, J.W., Muñoz, A., Giorgi, J.V., Margolick, J.B., Tassoni, C.J., Gupta, P., Kingsley, L.A., Todd, J.A., Saah, A.J., Detels, R., Phair, J.P., Rinaldo, C.R., Jr., 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine* 126(12), 946-954.

Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O.T., Keppler, O.T., 2005. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4, pp. 714 - 723.



Mitsuyasu, R., Gelman, R., Cherng, D.W., Landay, A., Fahey, J., Reichman, R., Erice, A., Bucy, R.P., Kilby, J.M., Lederman, M.M., Hamilton, C.D., Lertora, J., White, B.L., Tebas, P., Duliege, A.M., Pollard, R.B., Team, A.C.T.G.S., 2007. The virologic, immunologic, and clinical effects of interleukin 2 with potent antiretroviral therapy in patients with moderately advanced human immunodeficiency virus infection: a randomized controlled clinical trial--AIDS Clinical Trials Group 328. *Archives of internal medicine* 167(6), 597-605.

Muñoz-Fernández, M.A., Fresno, M., 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in neurobiology* 56(3), 307-340.

Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., Cathomen, T., 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic acids research* 39(21), 9283-9293.

~N~

Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Hofer, T., Viola, A., Acuto, O., 2010. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 32(6), 766-777.

~O~

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12(8), 695-708.

Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D.D., Nixon, D.F., Mcmichael, A.J., 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279(5359), 2103-2106.

~P~

Pan, X., Rudolph, J.M., Abraham, L., Habermann, A., Haller, C., Krijnse-Locker, J., Fackler, O.T., 2012. HIV-1 Nef compensates for disorganization of the immunological synapse by inducing trans-Golgi network-associated Lck signaling. *Blood* 119(3), 786-797.



- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents Department of Health and Human Services;** [updated February 12, 2013]. Available from: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>.
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., Ventura, P.,** 1985. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147(1), 231-236.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D.,** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271(5255), 1582-1586.
- Pérez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.L., Guschin, D.Y., Rupniewski, I., Waite, A.J., Carpenito, C., Carroll, R.G., Orange, J.S., Urnov, F.D., Rebar, E.J., Ando, D., Gregory, P.D., Riley, J.L., Holmes, M.C., June, C.H.,** 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 26(7), 808-816.
- Pérez, M., De Vinuesa, A.G., Sánchez-Duffhues, G., Márquez, N., Bellido, M.L., Muñoz-Fernández, M.A., Moreno, S., Castor, T.P., Calzado, M.A., Muñoz, E.,** 2010. Bryostatín-1 synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactivate HIV-1 from latency. *Current HIV research* 8(6), 418-429.
- Pierson, T.C., Zhou, Y., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C., Siliciano, R.F.,** 2002. Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 76(17), 8518-8531.
- Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demareux, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.L., Trono, D.,** 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 97(1), 63-73.
- Piguet, V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demareux, N., Thomas, G., Trono, D.,** 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* 2(3), 163-167.



Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15(8), 871-872.

Prins, J.M., Jurriaans, S., Van Praag, R.M., Blaak, H., Van Rij, R., Schellekens, P.T., Ten Berge, I.J., Yong, S.L., Fox, C.H., Roos, M.T., De Wolf, F., Goudsmit, J., Schuitemaker, H., Lange, J.M., 1999. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS* 13(17), 2405-2410.

Pushker, R., Jacque, J.-M., Shields, D.C., 2010. Meta-analysis to test the association of HIV-1 nef amino acid differences and deletions with disease progression. *Journal of Virology*, 1959-1909.

~Q~

Qatsha, K.A., Rudolph, C., Marme, D., Schachtele, C., May, W.S., 1993. Go 6976, a selective inhibitor of protein kinase C, is a potent antagonist of human immunodeficiency virus 1 induction from latent/low-level-producing reservoir cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(10), 4674-4678.

Qi, M., Aiken, C., 2008. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology* 373(2), 287-297.

~R~

Reger, M., Welsh, R., Razani, J., Martin, D.J., Boone, K.B., 2002. A meta-analysis of the neuropsychological sequelae of HIV infection. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 8(3), 410-424.

Renkema, G.H., Manninen, A., Mann, D.A., Harris, M., Saksela, K., 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol* 9(23), 1407-1410.

Richman, D.D., Margolis, D.M., Delaney, M., Greene, W.C., Hazuda, D., Pomerantz, R.J., 2009. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323(5919), 1304-1307.

Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martínez-Padial, M., Benito, J.M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., Soriano, V., 2004. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS* 18(8), 1109-1116.



- Roeth, J.F., Williams, M., Kasper, M.R., Filzen, T.M., Collins, K.L.**, 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 167(5), 903-913.
- Rowland-Jones, S.L.**, 2003. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nature reviews. Immunology* 3(4), 343-348.
- Rudd, C., Helms, S., Barber, E.K., Schlossman, S.F.**, 1989. The CD4/CD8:p56lck complex in T lymphocytes: a potential mechanism to regulate T-cell growth. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 67(9), 581-589.
- Rudnicka, D., Schwartz, O.**, 2009. Intrusive HIV-1-infected cells. *Nat Immunol* 10(9), 933-934.
- Rudolph, J.M., Eickel, N., Haller, C., Schindler, M., Fackler, O.T.**, 2009. Inhibition of T cell receptor induced actin remodeling and relocalization of Lck are evolutionarily conserved activities of lentiviral Nef proteins. *J Virol* 82, 11528-11539.

~S~

- Sagot-Lerolle, N., Lamine, A., Chaix, M.L., Boufassa, F., Aboulker, J.P., Costagliola, D., Goujard, C., Pallier, C., Delfraissy, J.F., Lambotte, O., Study, A.E.**, 2008. Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir. *AIDS* 22(10), 1125-1129.
- Saksela, K., Cheng, G., Baltimore, D.**, 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J* 14(3), 484-491.
- Saksena, N.K., Potter, S.J.**, 2003. Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy. *AIDS reviews* 5(1), 3-18.
- Saksena, N.K., Wang, B., Zhou, L., Soedjono, M., Ho, Y.S., Conceicao, V.**, 2010. HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites. *Hiv/Aids* 2, 103-122.
- Sánchez-Duffhues, G., Vo, M.Q., Pérez, M., Calzado, M.A., Moreno, S., Appendino, G., Muñoz, E.**, 2011. Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists. A novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs. *Curr Drug Targets* 12(3), 348-356.



- Sarmady, M., Dampier, W., Tozeren, A.**, 2011. Sequence- and Interactome-Based Prediction of Viral Protein Hotspots Targeting Host Proteins: A Case Study for HIV Nef. *PLoS ONE* 6(6), e20735.
- Sattentau, Q.J.**, 1988. The role of the CD4 antigen in HIV infection and immune pathogenesis. *AIDS* 2 Suppl 1, S11-16.
- Sattentau, Q.J., Weiss, R.A.**, 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52(5), 631-633.
- Sax, P.E., Dejesus, E., Mills, A., Zolopa, A., Cohen, C., Wohl, D., Gallant, J.E., Liu, H.C., Zhong, L., Yale, K., White, K., Kearney, B.P., Szwarcberg, J., Quirk, E., Cheng, A.K., Team, G.-U.-S.**, 2012. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet* 379(9835), 2439-2448.
- Schiffer, J.T., Aubert, M., Weber, N.D., Mintzer, E., Stone, D., Jerome, K.R.**, 2012. Targeted DNA mutagenesis for the cure of chronic viral infections. *J Virol* 86(17), 8920-8936.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., Heard, J.M.**, 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2(3), 338-342.
- Sharp, P.M., Hahn, B.H.**, 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1(1), a006841.
- Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V., Verdin, E.**, 2013. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends in microbiology* 21(6), 277-285.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., Siliciano, R.F.**, 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9(6), 727-728.
- Siliciano, J.D., Lai, J., Callender, M., Pitt, E., Zhang, H., Margolick, J.B., Gallant, J.E., Cofrancesco, J., Jr., Moore, R.D., Gange, S.J., Siliciano, R.F.**, 2007. Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J Infect Dis* 195(6), 833-836.



- Smith, B.A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A.S., Stilianakis, N.I., Keele, B.F., Kerkering, T.M., Ferreira-González, A., Szakal, A.K., Tew, J.G., Burton, G.F., 2001. Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* 166(1), 690-696.
- Sol-Foulon, N., Sourisseau, M., Porrot, F., Thoulouze, M.I., Trouillet, C., Nobile, C., Blanchet, F., Di Bartolo, V., Noraz, N., Taylor, N., Alcover, A., Hivroz, C., Schwartz, O., 2007. ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. *EMBO J* 26(2), 516-526.
- Spreen, W., Min, S., Ford, S.L., Chen, S., Lou, Y., Bomar, M., St Clair, M., Piscitelli, S., Fujiwara, T., 2013. Pharmacokinetics, safety, and monotherapy antiviral activity of GSK1265744, an HIV integrase strand transfer inhibitor. *HIV clinical trials* 14(5), 192-203.
- Stolp, B., Abraham, L., Rudolph, J.M., Fackler, O.T., 2010. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *J Virol* 84(8), 3935-3948.
- Stolp, B., Imle, A., Coelho, F.M., Hons, M., Gorina, R., Lyck, R., Stein, J.V., Fackler, O.T., 2012. HIV-1 Nef interferes with T-lymphocyte circulation through confined environments in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45), 18541-18546.
- Stolp, B., Reichman-Fried, M., Abraham, L., Pan, X., Giese, S.I., Hannemann, S., Goulimari, P., Raz, E., Grosse, R., Fackler, O.T., 2009. HIV-1 Nef Interferes with Host Cell Motility by Deregulation of Cofilin. *Cell Host & Microbe* 6(2), 174-186.
- Strasner, A.B., Natarajan, M., Doman, T., Key, D., August, A., Henderson, A.J., 2008. The Src kinase Lck facilitates assembly of HIV-1 at the plasma membrane. *J Immunol* 181(5), 3706-3713.
- Sun, M.K., Alkon, D.L., 2006. Bryostatins: pharmacology and therapeutic potential as a CNS drug. *CNS drug reviews* 12(1), 1-8.
- Symons, J., Vandekerckhove, L., Hutter, G., Wensing, A.M., Van Ham, P.M., Deeks, S.G., Nijhuis, M., 2014. Dependence on the CCR5 co-receptor for viral replication explains the lack of rebound of CXCR4-predicted HIV-variants in the Berlin Patient. *Clin Infect Dis*.



~T~

- Takahashi, K., Wesselingh, S.L., Griffin, D.E., McArthur, J.C., Johnson, R.T., Glass, J.D.**, 1996. Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Annals of neurology* 39(6), 705-711.
- Thoulouze, M.I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., Alcover, A.**, 2006. Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24(5), 547-561.
- Tiraboschi, J.M., Niubo, J., Curto, J., Podzamczar, D.**, 2010. Maraviroc concentrations in cerebrospinal fluid in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55(5), 606-609.
- Tornatore, C., Chandra, R., Berger, J.R., Major, E.O.**, 1994. HIV-1 infection of subcortical astrocytes in the pediatric central nervous system. *Neurology* 44(3 Pt 1), 481-487.
- Tremblay, M., Meloche, S., Gratton, S., Wainberg, M.A., Sekaly, R.P.**, 1994. Association of p56lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO J* 13(4), 774-783.
- Trillo-Pazos, G., Diamanturos, A., Rislove, L., Menza, T., Chao, W., Belem, P., Sadiq, S., Morgello, S., Sharer, L., Volsky, D.J.**, 2003. Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain pathology* 13(2), 144-154.
- Trushin, S.A., Bren, G.D., Asin, S., Pennington, K.N., Paya, C.V., Badley, A.D.**, 2005. Human immunodeficiency virus reactivation by phorbol esters or T-cell receptor ligation requires both PKCalpha and PKCtheta. *Journal of virology* 79(15), 9821-9830.
- Turner, B.G., Summers, M.F.**, 1999. Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology* 285(1), 1-32.
- Tyagi, M., Bukrinsky, M.**, 2012. Human immunodeficiency virus (HIV) latency: the major hurdle in HIV eradication. *Molecular medicine* 18, 1096-1108.



~V~

- Vallejo, A., Gutiérrez, C., Hernández-Novoa, B., Díaz, L., Madrid, N., Abad-Fernández, M., Drona, F., Pérez-Elias, M.J., Zamora, J., Muñoz, E., Muñoz-Fernández, M.A., Moreno, S., 2012. The effect of intensification with raltegravir on the HIV-1 reservoir of latently infected memory CD4 T cells in suppressed patients. *AIDS* 26(15), 1885-1894.
- Van Lint, C., Bouchat, S., Marcello, A., 2013. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10, 67.
- Van Lunzen, J., Maggiolo, F., Arribas, J.R., Rakhmanova, A., Yeni, P., Young, B., Rockstroh, J.K., Almond, S., Song, I., Brothers, C., Min, S., 2012. Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naive adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. *The Lancet infectious diseases* 12(2), 111-118.
- Van Praag, R.M., Van Weert, E.C., Van Heeswijk, R.P., Zhou, X.J., Sommadossi, J.P., Jurriaans, S., Lange, J.M., Hoetelmans, R.M., Prins, J.M., 2002. Stable concentrations of zidovudine, stavudine, lamivudine, abacavir, and nevirapine in serum and cerebrospinal fluid during 2 years of therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(3), 896-899.
- Venzke, S., Michel, N., Allespach, I., Fackler, O.T., Keppler, O.T., 2006. Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol* 80(22), 11141-11152.
- Von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G., Sundquist, W.I., 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114(6), 701-713.

~W~

- Warrilow, D., Gardner, J., Darnell, G.A., Suhrbier, A., Harrich, D., 2006. HIV type 1 inhibition by protein kinase C modulatory compounds. *AIDS research and human retroviruses* 22(9), 854-864.



Wiley, C.A., Schrier, R.D., Nelson, J.A., Lampert, P.W., Oldstone, M.B., 1986. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18), 7089-7093.

~X~

Xing, S., Bullen, C.K., Shroff, N.S., Shan, L., Yang, H.C., Manucci, J.L., Bhat, S., Zhang, H., Margolick, J.B., Quinn, T.C., Margolis, D.M., Siliciano, J.D., Siliciano, R.F., 2011. Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Virol* 85(12), 6060-6064.

~Y~

Yilmaz, A., Watson, V., Else, L., Gisslen, M., 2009. Cerebrospinal fluid maraviroc concentrations in HIV-1 infected patients. *AIDS* 23(18), 2537-2540.

Yuan, J., Wang, J., Crain, K., Fearn, C., Kim, K.A., Hua, K.L., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Torbett, B.E., 2012. Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4(+) T cell resistance and enrichment. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20(4), 849-859.

~Z~

Zack, J.A., Arrigo, S.J., Weitsman, S.R., Go, A.S., Haislip, A., Chen, I.S., 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61(2), 213-222.

Zhang, X., Zhang, R., Zhao, H., Cai, H., Gush, K.A., Kerr, R.G., Pettit, G.R., Kraft, A.S., 1996. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent bryostatin 1, an activator of protein kinase C. *Cancer research* 56(4), 802-808.

Zhu, T., Muthui, D., Holte, S., Nickle, D., Feng, F., Brodie, S., Hwangbo, Y., Mullins, J.I., Corey, L., 2002. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 76(2), 707-716.

Zonder, J.A., Shields, A.F., Zalupski, M., Chaplen, R., Heilbrun, L.K., Arlauskas, P., Philip, P.A., 2001. A phase II trial of bryostatin 1 in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7(1), 38-42.

Publicaciones



Artículos que forman parte de la Tesis

La mayor parte de los resultados descritos en esta Memoria se recogen en tres artículos, que, actualmente se encuentran a la espera de ser aceptados:

- 1- **Martínez-Bonet M**, Palladino C, Briz V, Ridolph JM, Fackler OT, Reloso M, Muñoz-Fernández MA and Madrid R. “Identification of a conserved PGPG motif in the HIV-1 Nef core required for p56 Lck-SH2 interaction”. (Enviado a *Retrovirology*).
- 2- **Martínez-Bonet M**, **Clemente Mayoral M**, Álvarez S, Díaz L, García D, Muñoz E, Moreno S and Muñoz-Fernández MA. “Reactivation of latent HIV-1 by bryostatin-1 in the presence of antiretroviral drugs”. (En proceso de escritura).
- 3- Laura Díaz*, **Marta Martínez-Bonet***, Javier Sánchez, Alejandra Fernández-Pineda, José Luis Jiménez, Eduardo Muñoz, Santiago Moreno, Susana Álvarez and M^a Ángeles Muñoz-Fernández. “Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism”. (*, co-autores). (Enviado a *Neuromolecular Medicine*).

Artículos que no forman parte de la Tesis

Además, durante el periodo de Tesis se realizaron distintas colaboraciones, que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 1- María Mar Pozo-Balado, **Marta Martínez-Bonet**, Isaac Rosado, Ezequiel Ruiz Mateos, Gema Méndez-Lagares, María Mar Rodríguez-Méndez, Francisco Vidal, María Angeles Muñoz-Fernández, Yolanda María Pacheco and Manuel Leal. “Maraviroc reduces Regulatory T cells in ART-naïve HIV-infected subjects”. *J Infect Dis*. 2014 Mar 20. PMID: 24652492. (Pendiente de publicación impresa).
- 2- M^a Isabel Clemente, Susana Álvarez, M^a Jesús Serramía, **Marta Martínez-Bonet** and M^a Ángeles Muñoz-Fernández. “Prostaglandin E2 reduces the release and infectivity of new cell-free virions and cell-to-cell HIV-1 transfer”. (*, co-autores). *PLoS One*. 2014 Feb 25;9(2):e85230. PMID: 24586238.
- 3- Daniel Pérez-Núñez, **Marta Martínez-Bonet**, Eduardo García-Urdiales, Marisa Nogal, Susana Barroso, Yolanda Revilla and Ricardo Madrid. “ASFV-CD2v protein shares functional small linear motifs (SLiMs) with HIV- Nef”. (Enviado a *Journal Virology*).
- 4- Didiana Jaramillo-Ruiz, **Marta Martínez-Bonet**, Marjorie Pion, Manuel Leal, Yolanda M. Pacheco, M^a Angeles Muñoz-Fernandez and Rafael Correa-Rocha. “HIV-infected patients with uncontrolled viral load have decreased numbers and a disturbed phenotype of Treg cells, which is associated with an altered methylation pattern of Foxp3 gene”. (En proceso de escritura).

