



Departamento de Medicina Física y Farmacología
Facultad de Ciencias de la Salud
Sección de Medicina

“Procesos asociados al control de la infección por el virus VIH: Caracterización a nivel molecular/celular.”

Memoria de tesis para aspirar al título de Doctor por la Universidad de la Laguna, presentada por

Daniel Márquez Arce

Tutor y Director de Tesis: Agustín Valenzuela Fernández

La Laguna, 22 de marzo de 2021



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



D. Agustín Valenzuela Fernández, Profesor Titular del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna,

CERTIFICA:

Que D. Daniel Márquez Arce ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo titulado: “**Procesos asociados al control de la infección por el virus VIH: Caracterización a nivel molecular/celular**”, que presenta para optar al Grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en La Laguna a 22 de marzo de 2021.

Dr. Agustín Valenzuela Fernández
Profesor Titular del Departamento de Medicina Física y Farmacología
Unidad de Farmacología
Universidad de La Laguna

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

El autor de este trabajo ha sido beneficiario de un contrato correspondiente a la “Ayuda a la formación del personal investigador dentro de programas oficiales de doctorado en Canarias”, convocatoria 2017, referencia **TESIS2017010116**, financiado por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), de la Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento y, por el Fondo Social Europeo (FSE) Programa Operativo Integrado de Canarias 2014-2020, Eje prioritario 3 (cofinanciación del 85%).

El trabajo experimental ha contado con la financiación del Proyecto **RD16/0025/0011** de Red de Excelencia del Instituto Carlos III (ISCiii) en Investigación en SIDA (RETIC-RIS) y del proyecto del Plan Nacional RETOS, código **SAF2015-64118-R**, del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Agradecimientos

Para empezar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Agustín Valenzuela Fernández, la confianza que depositó en mí cuando entré en el laboratorio y la colaboración, especialmente al final, sin la que no hubiese sido posible terminar esta tesis doctoral.

Este trabajo tampoco podría haber sido posible sin el trabajo coordinado con nuestros grupos colaboradores de la Red Española de Investigación en SIDA (RETIC-RIS), dónde resultaría inestimable el trabajo, fruto del esfuerzo durante décadas, del equipo de la Unidad de Virología de los doctores Concha Casado y Cecilio López, identificando y realizando el seguimiento de pacientes de VIH-1 y, logrando extraer y analizar sus envueltas virales, para poder trabajar con ellas; así como los experimentos complementarios al primer objetivo de este trabajo, por parte del grupo del Dr. Julià Blanco, del Instituto de Investigación del Sida IrsiCaixa, que permitieron darle una explicación al fenómeno que estábamos describiendo conjuntamente.

Quiero agradecer también a los doctores de nuestra Unidad de Farmacología de la ULL, Ricardo Borges, David Machado y Federico Díaz que, durante los años que he estado trabajando en este laboratorio, me he sentido acogido y han estado siempre ahí para echar un cable, aportar sus enseñanzas, contar grandes anécdotas y por supuesto disfrutar de celebraciones juntos.

Por supuesto, uno de los mayores tesoros, que me llevo de todos estos años, son las personas maravillosas que he conocido y que se han convertido en grandes amigos.

Sara, no imaginas cuanto valoro la ayuda que me diste siempre, como estabas siempre cerca, atenta, recordándome muchas cosas que tenía que hacer y que seguramente, más de una vez, se me hubiesen pasado por alto si no llegas a estar ahí. Me enseñaste con paciencia al entrar, cuando no sabía nada y, disfruté cada experimento codo con codo. Siempre estabas para escuchar, desde mis momentos más aciagos, hasta todas esas veces que te quería enseñar algo gracioso o divertido y tú siempre lo agradecías. Y no solo estabas, sigues estando, aunque vivas ahora al otro lado del mundo, sigues escuchando y ayudando. Siempre lo agradeceré.

Judith, siento muchísima admiración por ti, no creo que sepas cuanta. Eres una persona que siempre se asegura de hacer las cosas lo mejor posible y pones todo tu esfuerzo y dedicación en ello, la ciencia necesita de más personas como tú. Desde que entraste a trabajar con nosotros has prestado tu valiosa ayuda siempre, sin pedir nada a cambio y, valoro mucho las charlas científicas contigo, en las que se me pasaba el tiempo volando, pero más aún valoro que siempre, aun en momentos duros, conseguías transmitir alegría y te podía arrancar esa risa contagiosa, que acababa inundando todo el departamento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Romina, siempre ayudando a todos, aunque estuvieses demasiado liada para poder prestar esa ayuda. Eres la persona con la que siempre sabía que podía contar para reírse al contar cualquier cosa, aunque fuese la broma más insignificante y espontánea. Te deseo que acabes también tu propia odisea científica de la mejor manera posible, como mereces, estoy seguro que así será.

Laura de Armas, mediante tu trabajo y gran esfuerzo se sentaron las bases para esta investigación y aunque coincidimos poco tiempo en el laboratorio, seguiste escuchando mis inquietudes y prestando consejo posteriormente, muchísimas gracias por todo.

No me olvido de Laura García y Jonathan, que dejaron un legado impresionante con su trabajo en nuestro laboratorio y, aunque no he tenido el placer aún de conocer en persona, parece que siempre han estado guiándonos, presentes en cada protocolo, en cada experimento.

Pablo y Javi, a veces la risa la mejor sensación que te puede aportar la vida y, no han sido pocas las que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. Estoy seguro que nos quedan muchas por disfrutar juntos por delante y, desde luego, más de una "Jam session" con Pablo, con el que comparto la pasión por la buena música.

Rebeca, Ana, Ayoze, Silvia, Chus, Soledad, Israel, Sergio, Michelle... por supuesto la lista de personas con las que he compartido momentos dentro y fuera del laboratorio es demasiado extensa y, este párrafo ni de lejos está cerca de hacerle justicia. Gracias por hacer que ir a trabajar fuese tan agradable, sintiéndome rodeado de buena gente y con un ambiente tan sano que, seguramente sea casi imposible de encontrar en otro lugar. Esta es una de las mayores venturas que siento que he tenido.

Ayoze y Borja, mis mejores amigos, que escuchaban mis anécdotas del laboratorio y más de una vez mis preocupaciones.

Sheila, encontrarte fue el descubrimiento más importante para mí, la razón por la que no cambiaría ninguna decisión del pasado. Mis mejores momentos son contigo, todos aquellos que hacen que hasta el camino más duro sea insignificante. Cambiaste mi vida por completo y te quiero mucho.

Mis padres y mi hermana, mi familia, me educasteis para valorar el esfuerzo y la honestidad y me habéis apoyado y cuidado siempre, ninguno de los logros de mi vida sería posible sin vosotros. Tengo una suerte que muy poca gente puede tener y os quiero muchísimo, estos sencillos agradecimientos no bastan para expresarlo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. INICIOS, DESCUBRIMIENTO, HISTORIA, CONTEXTO GLOBAL	5
1.2. ORIGENES DEL VIH COMO SALTO INTERESPECIE	9
1.3. EL VIH-2, EL "MENOR" DE LOS MALES	11
1.4. EL VIRUS VIH-1: ESTRUCTURA Y CARÁCTERÍSTICAS	13
1.4.1. Genoma viral	13
1.4.2. El Ciclo viral: una foto inicial	14
1.4.3. Genes <i>gag</i> y <i>pol</i>	16
1.4.3.1 Proteínas estructurales de Pr55-Gag	17
1.4.3.2. Evidencias de la importancia de la ubiquitinación de Pr55-Gag, para la maduración y salida de viriones	20
1.4.3.3. Proteínas estructurales y enzimas derivados de Gag-Pol	22
1.4.4 Proteínas reguladoras y accesorias	25
1.4.5. La envoltura viral (Env)	31
1.5. LOS RECEPTORES Y CORRECEPTORES CELULARES DEL VIH-1	34
1.5.1. Descubrimiento y características	34
1.5.2. Señalización de los correceptores en la entrada viral: El fenómeno del "capping"	37
1.6. LA INFECCIÓN DEL VIH-1: ENFERMEDAD Y FENOTIPOS CLÍNICOS	40
1.6.1. Desarrollo de la enfermedad por el virus VIH-1	40
1.6.2. Definiciones clínicas del control de la enfermedad	43
1.6.3. Características celulares y virales asociadas a los LTNP	44
1.7. LA ENZIMA HDAC6: UN FACTOR DE RESTRICCIÓN DE CRECIENTE IMPORTANCIA	50
1.7.1. Breve introducción a los factores de restricción	50
1.7.2. La enzima HDAC6	50
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. ANTICUERPOS	63
3.2. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES	64
3.3. SOLUCIONES DE TRABAJO	67

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Índice

3.4. PLÁSMIDOS	70
3.5. LÍNEAS CELULARES	74
3.6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	75
3.6.1. Mantenimiento de cultivos celulares	75
3.6.2. Transfección de plásmidos para ensayos bioquímicos	76
3.6.3. Producción de pseudovirus (partículas virales de un solo ciclo)	77
3.6.4. Análisis bioquímicos por <i>western blot</i>	78
3.6.5. Ensayos de infección viral	79
3.6.6. Ensayos de señalización en entrada viral	80
3.6.7. Ensayos de coinmunoprecipitación	82
3.6.8. Procesado de datos y análisis estadísticos	83
4. RESULTADOS	87
4.1. LAS PROTEÍNAS ENV DEL VIH-1, DE UN CLÚSTER DE PACIENTES LTNP-EC, SON FUNCIONALMENTE DEFICIENTES EN SU ACTIVIDAD SEÑALIZADORA SOBRE EL RECEPTOR CD4 E INFECTIVA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL CUCLLO VIRAL	87
4.1.1. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, producen una escasa infección, en comparación con Env control y de pacientes crónicos progresores	87
4.1.2. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, promueven una menor acetilación de la α -tubulina en el proceso de la entrada viral	88
4.1.3. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, promueven una insuficiente reorganización del citoesqueleto de actina hacia un polo de la célula ("capping"), fenómeno necesario para la correcta entrada viral	90
4.1.4. Revertir las mutaciones de una Env, que la diferenciaban del resto del clúster, hace que reduzca su infectividad a un nivel comparable a otra de las Env LTNP-EC estudiadas	92
4.2. HDAC6 INTERACCIONA CON PR55-GAG Y PROMUEVE SU DEGRADACIÓN, Y ESTE FENÓMENO OCURRE DE MANERA INDEPENDIENTE A SU DOMINIO BUZ DE UNIÓN A UBIQUITINA	94
4.2.1. Los constructos de HDAC6 delecionados en el dominio BUZ, inducen la degradación de Pr55-Gag con una eficiencia comparable a los constructos funcionales completos wt-HDAC6	94
4.2.2. Pr55-Gag interacciona (coinmunoprecipita) con HDAC6, así como con una forma carente del dominio BUZ (HDAC6- Δ BUZ)	100

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Índice

4.2.3. HDAC6- Δ BUZ promueve la degradación de Pr55-Gag por la ruta autofágica, de forma comparable a la enzima HDAC6	103
4.2.4. La presencia de APOBEC3G interfiere en la degradación de Pr55-Gag promovida por un constructo de HDAC6 carente del dominio BUZ, pero no en el caso de wt-HDAC6	105
4.2.5. La degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6, se ve comprometida en constructos mutados en las regiones NC, SP2 y p6 de Pr55-Gag	107
5. DISCUSIÓN	113
5.1. LAS PROTEÍNAS ENV DEL VIH-1, DE UN CLÚSTER DE PACIENTES LTNP-EC, SON FUNCIONALMENTE DEFICIENTES EN SU ACTIVIDAD SEÑALIZADORA SOBRE EL RECEPTOR CD4 E INFECTIVA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL CICLO VIRAL	113
5.2. HDAC6 INTERACCIONA CON PR55-GAG Y PROMUEVE SU DEGRADACIÓN, Y ESTE FENÓMENO OCURRE DE MANERA INDEPENDIENTE A SU DOMINIO BUZ DE UNIÓN A UBIQUITINA	120
6. CONCLUSIONES	131
7. BIBLIOGRAFÍA	135
8. ANEXO DE PUBLICACIONES	163

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Glosario de siglas y abreviaturas

3-MA	3 metiladenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _c	ADN complementario
ADN _{2c}	ADN bicatenario
AP-2	<i>Adaptor protein 2 complex</i> ,
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , célula presentadora de antígenos
APOBEC3G o A3G	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
Arf6	<i>ADP-ribosylation factor 6</i> , factor de ribosilación de ADP 6
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferente
ATP	Adenosín trifosfato
BUZ	<i>Binder of ubiquitin zinc finger</i>
BST-2	<i>Bone marrow stromal antigen 2</i> , antígeno estromal de la médula ósea 2
CA	Cápside
CDK9	<i>Cyclin dependent kinase 9</i> , quinasa dependiente de ciclina 9
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CROI	<i>Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections</i> , Conferencia de retrovirus e infecciones oportunistas
CT	<i>Cytoplasmic tail</i> , cola citoplasmática
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> , Linfocitos T citotóxicos
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus de 2019
DAUP	<i>Deacetylase-ubiquitin-specific protease</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
Dm	<i>Dead-mutant</i> o doble mutante
Ds-Red	<i>Dicosoma red fluorescente protein</i>
EC	<i>Elite controller</i> , controlador de élite
ERM	Ezrina/radixina/moesina
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i> , complejo de clasificación endosómica necesario para la maquinaria de transporte
FP	<i>Fusion peptide</i> , péptido de fusión
Gag	<i>Gen-specific antigen</i>
GalC	Esfigolípido galactosil-ceramida
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> , tejido linfoide asociado al intestino
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
HA	<i>Haemagglutinin</i> , hemaglutinina
HATs	Histona Acetilasa
HCP5	Complejo p5 de HLA
HDAC	Histona desacetilasa
HDAC6	Histona desacetilasa 6
HICs	<i>HIV-1 controllers</i> , controladores de VIH-1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Glosario de siglas y abreviaturas

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> , antígeno leucocitario humano
HMG	<i>High mobility group protein</i>
HR-1/-2	Heptad repeat regions -1/-2, regiones hepta repetidas 1 y 2
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i> , virus linfotrópico humano de células T
HUB	<i>HDAC6-, USP3- and BRAP2-related</i>
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IN	Integrasa
IP-10	<i>Interferon induced protein-10</i> , proteína 10 inducida por interferón
IQGAP1	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>
ISCiii	Instituto de Salud Carlos III
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i> , receptores tipo inmunoglobulina células NK
LAV	<i>Lymphadenopathy associated virus</i> , virus asociado a linfadenopatía
LC3	<i>Light chain 3</i>
LIMK	LIM quinasa
LTNP	<i>Long term non-progressor</i> , no progresor a largo plazo
LTR	<i>Long terminal repeat</i> , repetición terminal larga
MA	Matriz
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complejo mayor de histocompatibilidad
MIP	Macrophage inflammatory proteins, proteínas inflamatorias de macrófagos
MPER	<i>Membrane proximal external region</i> , región de membrana proximal-externa
MRCA	<i>Most recent common ancestor</i> , ancestro común más reciente
MSM	<i>Males who have sex with males</i> , varones que tienen sexo con otros varones
MTOC	<i>Microtubule-organizing center</i> , Centro organizador de microtúbulos
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NC	<i>Non-controller</i> , no controlador
NC	Nucleocápside
NDV	<i>Newcastle disease virus</i> , virus de la enfermedad de Newcastle
Nef	<i>Negative regulatory factor</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i> , señal de exporte nuclear
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , señal de localización nuclear
NNRTIs	<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i> , inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	<i>Progressor</i> , progresor
PACS-1	<i>Phosphofurin acidic cluster sorting protein-1</i>
PACIN2	<i>Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2</i>
PAK	<i>p21 activated kinase</i> , quinasa activada de p21

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Glosario de siglas y abreviaturas

PAZ	<i>Polyubiquitin-associated zinc finger</i>
pbs	<i>Primer binding site</i> , sitio de unión del primer
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , tampón fosfato salino
PEI	Polietilenimina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIC	<i>Pre-integration complex</i> , complejo de preintegración
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
Pol	Polimerasa
PR	Proteasa viral
QC	<i>Quality control</i>
Rbx1	<i>RING-box protein 1</i>
Rev	<i>Regulator of expression of virion proteins</i>
RETIC-RIS	Red temática de investigación cooperativa en salud-Red Española de Investigación del SIDA
RNasa A	Ribonucleasa A
RNasa H	Ribonucleasa H
ROCK	<i>Rho associated proteín kinase</i>
RP	<i>Rapid progressor</i> , progresor rápido
Rpd3	<i>Reduced potassium dependency 3</i>
RRE	<i>Rev response element</i> , elemento de respuesta a Rev
RT	Retrotranscriptasa o transcriptasa inversa
RUNX2	Factor de transcripción relacionado con Runt tipo 2
SARS-CoV-2	Coronavirus de tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i> , factor 1 derivado de células estromales
SERINC3	<i>Serine incorporator 3</i>
SERINC5	<i>Serine incorporator 5</i>
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de nucleótido único
SP1	<i>Spacer peptide 1</i> , péptido espaciador 1
SP2	<i>Spacer peptide 2</i> , Péptido espaciador 2
SPVL	<i>Set point viral load</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
STAT5A	<i>Signal transducer and activator of transcription 5A</i> , transductor de señales y activador transcripcional 5A
TAR	<i>Trans-activation responsive RNA</i>
Tat	Transactivador de la transcripción viral
TcR	<i>T-cell receptor</i> , Receptor de célula T
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i> , dominio transmembrana
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , factor de necrosis tumoral
TRIM5 α	<i>Tripartite-containing motif 5α</i>
Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
UBA	<i>Ubiquitin-associated domain</i> , dominio asociado a ubiquitina

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Glosario de siglas y abreviaturas

UBPs	Ubiquitín-proteasas
VC	<i>Viremic controller</i> , controlador virémico
VHS	Virus herpes simplex
Vif	<i>Viral infectivity factor</i> , factor de infectividad viral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia en simios
VLP	<i>Virus-like particles</i>
VNP	<i>Viremic nonprogressors</i> , no progresores virémicos
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral U
VSP	<i>Viremic slow progressors</i> , progresores lentos virémicos
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WNV	<i>West Nile virus</i> , Virus del Nilo Occidental
ZnF-UBP	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hidrolase zinc finger</i>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resumen

RESUMEN

En la búsqueda de dianas celulares que actúen contra el VIH-1 y permitan erradicar el virus del organismo, el estudio de factores genéticos tanto del hospedador como del virus, que condicionan el curso de la enfermedad, así como de factores de restricción en el huésped, proteínas celulares que interfieren con mecanismos del virus, suponen las estrategias más prometedoras. Desde el punto de vista de los factores virales, hemos estudiado la funcionalidad del gen *env* procedente virus VIH-1 de un clúster de pacientes LTNP-EC. Nuestro trabajo ha permitido identificar deficiencias en la señalización de dicho complejo de envoltura (Env) viral, a través de CD4, la cual es necesaria para la eficiente entrada viral, impidiéndoles promover la estabilización de los microtúbulos acetilados y la reorganización de la actina en el fenómeno del "capping", correspondiéndose dichos defectos con una menor entrada viral e infectividad. La secuencia conservada de estas Env condiciona estas deficiencias funcionales y es coherente con el fenotipo clínico LTNP-EC del clúster. Asimismo, estudiando la enzima celular HDAC6 como factor de restricción contra la poliproteína estructural Pr55-Gag del VIH-1, identificamos que la interacción entre estas proteínas y la consiguiente degradación de Pr55-Gag por ruta autofágica, no dependía del dominio BUZ de HDAC6. Mutaciones en los dominios NC, SP2 y p6 de Pr55-Gag, interferían con esta degradación. Estos resultados abren camino a identificar las regiones exactas de interacción entre estas proteínas, descartando el dominio BUZ de unión a ubiquitina.

1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

INTRODUCCIÓN



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.1. INICIOS, DESCUBRIMIENTO, HISTORIA, CONTEXTO GLOBAL:

La infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido contraída por más 75,7 millones de personas desde el comienzo de la epidemia en 1981 (registrada entonces como una enfermedad desconocida (Gottlieb 2006), situándose el número de personas que viven con la enfermedad globalmente en 38 millones y registrándose 1,7 millones de nuevas infecciones en todo el mundo, en 2019, siendo esta la última estimación hasta la fecha, realizada por la Organización de las Naciones Unidas (desde su programa ONUSIDA). El número de muertes causadas por esta enfermedad desde el inicio de la epidemia asciende a los 32,7 (se estima que entre 24,8 y 42,2) millones de personas ((UNAIDS) 2020). Con estos datos no cabe duda de que nos encontramos ante una de las pandemias más importantes de los siglos XX y XXI.

Fue a finales del año 1981 cuando sonaron las primeras voces de alarma en EEUU, de una enfermedad nueva que se estaba desarrollando. Los pacientes, en ese momento identificados como varones homosexuales previamente sanos, presentaban una serie de enfermedades oportunistas, de las cuales las más notables fueron infecciones respiratorias causadas por, el hongo *Pneumocystis jirovecii* (entonces clasificado erróneamente como un protista denominado *Pneumocystis carinii*), afecciones en las mucosas producidas por el hongo *Candida albicans* y en algunos casos, agresivas manifestaciones cutáneas y perianales del virus "herpes simplex" (VHS) (Siegal et al. 1981). Algunos de estos pacientes manifestaban un cuadro generalizado de pérdida de peso, pero todos presentaban linfocitopenia y anergia, por lo que se empezó a hablar de que estos defectos en el sistema inmune debían de ser adquiridos, ya que el historial médico de dichos pacientes no evidenciaba ni enfermedades infecciosas recurrentes, ni trastornos linfoproliferativos previos (Gottlieb et al. 1981; Siegal et al. 1981). A su vez, meses antes de estos casos, se habían reportado, también en Nueva York y la bahía de San Francisco, al menos 41 pacientes que manifestaban un tipo especialmente fulminante y agresivo de Sarcoma de Kaposi (relatado entonces como similar a variantes vistas en África), acompañado de hecho por algunas de las enfermedades oportunistas relatadas previamente (Friedman-Kien 1981). Cuadros similares siguieron apareciendo en los años posteriores en otras regiones, como por ejemplo California (Centers for Disease 1982). En un principio, como podemos ver, se consideró una enfermedad asociada a homosexuales, consumidores de drogas intravenosas y, posiblemente, receptores de transfusiones. Sin embargo, el cambio de paradigma epidemiológico no se produjo hasta 1984, cuando fueron identificados en África central diversos pacientes que no pertenecían a dichos grupos de riesgo, añadiéndose a la lista la promiscuidad sexual y la práctica de la prostitución, en estos casos, también en grupos heterosexuales, como factores de riesgo para la adquisición de este síndrome (Piot et al. 1984; Van de Perre et al. 1984). A pesar de que irrefutablemente se había demostrado, ya desde entonces,

5

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

que esta no era una condición médica exclusiva del colectivo homosexual, la discriminación y el estigma relacionado con el Síndrome de la Inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se ha seguido manteniendo hasta la actualidad, especialmente en países Africanos, donde incluso sufren persecución legal por su condición y dificultad para acceder a los servicios sanitarios y al tratamiento (Hagopian et al. 2017).

Dado que la nueva enfermedad bautizada en ese momento como SIDA estaba mostrando mucha relevancia, investigadores americanos y europeos iniciaron la carrera para identificar el agente causal de este mal. Dos grupos, en este momento, se destacarían como adalides del esfuerzo en la búsqueda de este desconocido virus, por un lado el grupo del Dr. Robert C. Gallo, de la Universidad de Bethesda (Maryland, EEUU) y al otro lado del charco, el grupo liderado por el Dr. Luc Montangier, en el Instituto Pasteur de París. Sería, sin embargo este último el que finalmente obtuviese el mayor reconocimiento y galardones, siendo recompensado, junto a su colaboradora, Françoise Barré-Sinoussi, con el Premio Nobel de Medicina en 2008 (compartido con el Dr. Harald zur Hausen, primer descubridor de cepas del Virus del Papiloma Humano causantes del Cáncer de Cervix) (NobelPrize.org 2008).

No obstante, las aportaciones e investigaciones del grupo del Dr. Gallo fueron también de suma importancia. A finales de la década de los 70, este grupo era uno de los pocos que mantenían su investigación en la búsqueda de retrovirus relacionados con cáncer en humanos, un campo que había decaído en popularidad por aquel entonces (Gallo and Montagnier 2003), desde el descubrimiento simultaneo de la enzima transcriptasa inversa por David Baltimore y Howard Temin en 1970 (Baltimore 1970; Temin and Mizutani 1970). El aislamiento e identificación de la interleucina 2 (IL-2, conocida entonces como “factor de crecimiento de células T”) les había abierto a su vez, el estudio de retrovirus linfotrópicos, al lograr el mantenimiento de líneas de cultivo de linfocitos T, el tiempo suficiente para la expresión de los mismos (Morgan, Ruscetti, and Gallo 1976; Ruscetti, Morgan, and Gallo 1977). El grupo del Dr. Gallo había identificado en 1980 un retrovirus que afectaba a linfocitos T, al cual denominó HTLV-1 (Virus linfotrópico humano de células T tipo 1) (Poiesz et al. 1980). En 1983 este grupo y sus colaboradores publicaron una serie de artículos donde aseguraban haber encontrado anticuerpos contra el HTLV-1 y secuencias integradas del mismo en pacientes de SIDA, postulando entonces que el nuevo retrovirus estaba relacionado con el virus causante de Leucemia de células T (Gallo et al. 1983; Essex et al. 1983; Gelmann et al. 1983). Es por esto que cuando aisló realmente el virus, lo identificó como HTLV-III y siguió manteniendo esta teoría hasta mediados de los 80, cuando se demostró que el virus que causaba el SIDA era un lentivirus y se desveló, mediante análisis de secuencia, que aquel virus que el Dr. Gallo identificaba como HTLV, había sido en todo momento el auténtico VIH-1 y provenía de unas muestras

6

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

de pacientes que habían salido del laboratorio del Dr. Luc Montagnier, en Pasteur (Rabson and Martin 1985). Hasta ese momento, el Dr. Gallo se había mantenido firme en que la identificación del supuesto HTLV-III era previa a la recepción de muestras de virus provenientes del grupo Francés y, fue esta revelación y la acérrima apuesta por identificar, erróneamente, el virus causante del SIDA como un miembro de la familia del HTLV, lo que minó, ciertamente de manera justa, su posterior reconocimiento como codescubridor del VIH-1, a favor del grupo del Dr. Montagnier, que había aislado el virus en primera instancia (Karpas 2004; Gallo and Montagnier 2003).

En la otra cara de la historia, por su parte, el mencionado grupo del Dr. Montagnier, trabajando también en la búsqueda de retrovirus, en concreto, había desarrollado un método usando suero anti-interferón, para incrementar notablemente la producción de retrovirus en cultivos celulares (Barre-Sinoussi et al. 1979), por lo que, viendo que había notables pruebas de que la nueva enfermedad afectaba a linfocitos T o alguna de sus subclases y conociéndose un retrovirus (su campo de estudio) que afectaba a dichas células, el recientemente descrito HTLV por el grupo de Gallo y sus colaboradores, se metió de lleno en la búsqueda del agente causal del SIDA, enfocándose en buscar un retrovirus. Curiosamente, encontró un retrovirus en las muestras de un paciente de SIDA de 33 años al que tuvo acceso y, a pesar de ver que tenía algunas similitudes con los previamente descritos HTLV-I y II, presentando además el suero del paciente respuesta contra antígenos de dicho virus (el HTLV-I), no quedó conforme con estos vagos indicios y profundizó más en su investigación, a diferencia del Dr. Gallo, viendo que los anticuerpos contra las p19 y p24, del mencionado HTLV-I, no inmunoprecipitaban el nuevo virus en el suero (Barre-Sinoussi et al. 1983). Un mes después, intentó publicar un artículo en el que identificaba a esta nueva entidad, en ese momento bautizada como virus asociado a linfadenopatía (“lymphadenopathy associated virus, LAV”), como perteneciente a un nuevo grupo de retrovirus diferente al grupo HTLV, apuntando además, por primera vez, a los linfocitos T CD4⁺ como diana de este virus. Desgraciadamente, este artículo, con información científica crucial, no fue aceptado por *Nature* en este momento, sino un año más tarde en *Science* (Karpas 2004; Klatzmann et al. 1984), pero, tal y como se relata previamente, sería esta serie de hechos lo que demostraría el descubrimiento pionero del VIH-1 por parte de este grupo y le otorgaría, lícitamente, el mayor mérito por dicho acontecimiento. Posteriormente y logrando, finalmente, traer orden a todo este lío de nombres e identificaciones, en el que numerosos laboratorios, a parte de los citados, estuvieron involucrados durante la primera mitad de la década de los 80; el Comité Internacional de Taxonomía de Virus adoptó, en 1986, la denominación común de Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH (HIV en inglés), quedando entonces, unificado el agente causal del SIDA (Case 1986). Sin embargo, a pesar de las sólidas pruebas que habían aportado las numerosas investigaciones, una pequeña facción disidente de la comunidad científica y algunos dirigentes políticos se mantuvieron alimentando la controversia, hasta que por fin, en el año 2000 quedase

7

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

consensuado que el VIH causaba, en efecto, el SIDA, tras la firma de la Declaración de Durban por más de 5.000 científicos de todo el planeta ('The Durban Declaration' 2000).

8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.2. ORIGENES DEL VIH COMO SALTO INTERESPECIE:

Las primeras sospechas del origen animal del recientemente identificado virus causante del SIDA, en ese momento, conocido por diversos nombres (LAV/HTLV-III), se expusieron cuando fueron aislados virus de dos pacientes de SIDA en África Occidental. Los investigadores observaron que estos virus, denominados entonces LAV-II (con la unificación de nombres, VIH del tipo 2 (VIH-2)), presentaban ciertas diferencias en el complejo de proteínas de la envoltura viral, frente a los identificados hasta el momento. Además de esto, era reconocido, el antígeno de la envoltura de estos virus, cuando se exponía a un suero perteneciente a ejemplares en cautiverio de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), los cuales estaban infectados por un virus, que causaba, en estos también, inmunodeficiencia, el entonces erróneamente denominado STLV-III_{mac} (Virus linfotrópico en Simios de células T tipo III) (Clavel et al. 1986). Pronto se sabría que estos macacos asiáticos no eran los hospedadores naturales de este virus, sino que se habían infectado, en los diferentes centros de investigación de primates, por virus originarios de monos mangabey grises, originarios de África (*Cercocebus atys*), los cuales, sin embargo, permanecían asintomáticos. Este virus se conocería a partir de entonces como VIS_{sm} (Apetrei et al. 2005; Fultz et al. 1986).

Poco después, en 1989, se descubriría en chimpancés salvajes de Gabón (*Pan troglodytes troglodytes*) otro nuevo retrovirus, denominado VIS_{cpz}, el primero que poseía notables similitudes con el VIH de tipo 1 (VIH-1), además de poseer el gen *vpu*, exclusivo de este y no presente en el VIH-2 ni en otros VIS conocidos hasta la fecha (Peeters et al. 1989; Huet et al. 1990). Transcurriría, sin embargo, una década hasta que certeramente se demostrase que era, este chimpancé, el reservorio original natural desde el que se habían generado los tres grupos M, N y O de la cepa VIH-1 (Gao et al. 1999), aunque, posteriormente se propuso que el grupo O, aun originariamente procedente del chimpancé, de hecho, habría saltado al gorila occidental (Gorilla gorilla) antes de pasar al ser humano (Van Heuverswyn et al. 2006; Van Heuverswyn and Peeters 2007). No obstante, aún no se ha encontrado un virus concreto que, actuando como ancestro directo en el gorila, pudiese dar lugar al grupo O y que confirmase definitivamente que este virus saltó de esta especie (Peeters, D'Arc, and Delaporte 2014). Un cuarto grupo, el grupo P, con solo 2 individuos identificados, parece también estar más emparentado en su secuencia al VIS_{gor} que al VIS_{cpz} (Plantier et al. 2009; Vallari et al. 2011). Aunque durante años el paradigma planteado ha sido que los hospedadores naturales de estos diferentes VIS permanecían asintomáticos, esto ha sido cuestionado en la última década tras encontrarse pruebas de cierta inmunosupresión y depleción de linfocitos T CD4⁺ en algunos grupos de chimpancés infectados, con una mortalidad incrementada asociada (Keele et al. 2009), así como alteraciones asociadas a enfermedades en la microbiota de algunos grupos de gorilas salvajes infectados (D'Arc et al. 2018).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Hasta la fecha se han descubierto al menos 45 especies de simios no humanos infectados por diferentes variantes de VIS, de las que se estima la existencia de al menos 40, con numerosos casos de infecciones y saltos interespecíficos (Peeters, D'Arc, and Delaporte 2014; Sharp and Hahn 2011).

A pesar de que la enfermedad causada por el VIH-1 se reportó en 1981 y el virus responsable no se aisló hasta 1983, como se explica previamente, los orígenes del primer salto exitoso del virus (VIH-1, grupo M en este caso, el más numeroso y extendido globalmente) de los simios al ser humano se han conseguido estimar, mediante el uso de relojes moleculares en torno a 1908 (1884-1924), valiéndose de las muestras más antiguas que se disponen de esta variante, las llamadas ZR59 y DCR60, obtenidas en 1959 y 1960 respectivamente, ambas provenientes de Kinshasa (República Democrática del Congo) (Worobey et al. 2008). Mediante el mismo tipo de técnicas se ha estimado, también, la fecha del origen del grupo O, alrededor de los años 1930 (1914-1944), pero poco se sabe de por qué, este grupo, teniendo una antigüedad similar al grupo M pandémico y aun habiendo infectado de decenas a cientos de miles de personas, ha mantenido su expansión, sin embargo, limitada geográficamente a la región de África Central Occidental, especialmente Camerún (Leoz et al. 2015). Se ha estimado que el grupo N podría haber realizado su salto más recientemente, en torno a 1963 (1948-1977) (Wertheim and Worobey 2009), no obstante, algunos investigadores consideran que los datos, sobre la secuencia de este grupo y la del grupo P, son demasiado limitados para emitir conclusiones sólidas al respecto de la fecha de su origen (Sharp and Hahn 2011).

A propósito de estos saltos interespecíficos, parece ser que la caza y la manipulación directa y frecuente de la carne fresca de estos simios, muy habitual en determinadas regiones de África Occidental, podrían haber sido, en el pasado, los mecanismos de contacto para las primeras infecciones en humanos, por los virus procedentes de los simios. Más aún, seguiría existiendo el riesgo de que se produzcan zoonosis con virus VIS de simios salvajes, derivables en nuevos saltos interespecie exitosos (Peeters et al. 2002).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

1.3. EL VIH-2, EL "MENOR" DE LOS MALES:

La infección producida por la cepa del tipo VIH-2 constituye un porcentaje mucho menor y más localizado geográficamente que la producida por el VIH-1, situándose prevalentemente en África Occidental y aunque casos aislados, se han reportado en regiones tan distantes como la India, Europa (principalmente Portugal y Francia, por sus relaciones coloniales con el Oeste Africano) o Estados Unidos (Campbell-Yesufu and Gandhi 2011).

En el caso del VIH-2, la subdivisión da lugar a 9 linajes, de los cuales los más abundantes son los grupos A y B, siendo el resto grupos representados solamente, en cada uno de los casos, por un único paciente (Visseaux et al. 2016). Su origen, desde su ancestro VIS (VISsm) más cercano se remonta a 1940 (1924-1956), para el linaje A y a 1945 (1931-1959), para el B (Lemey et al. 2003), los cuales, son orígenes posteriores a los citados previamente para el VIH-1.

Pese a estar estrechamente emparentados, el VIH-1 y VIH-2 poseen notables diferencias, con una homología de secuencia del 50 al 60% entre sus respectivos genes *gag* y *pol* y que llega a ser incluso menor en otros genes (Guyader et al. 1987), que conllevan en último término a una menor virulencia del segundo (Marlink et al. 1994), lo cual lo ha convertido durante los últimos 30 años en un interesante objeto de estudio para poder encontrar donde residen las claves de posibles estrategias terapéuticas contra su pariente pandémico.

En general, parece que los individuos infectados por el VIH-2 sufren un avance más lento de la enfermedad, donde el nivel de descenso anual de los linfocitos T CD4⁺ puede ser de tan solo un cuarto, si lo comparamos con los desarrollos en cohortes de individuos infectados con VIH-1 (Gottlieb et al. 2002). Mucho se ha escrito sobre la aparente evidencia de que esta menor patogenicidad, el pobre desarrollo de la enfermedad y declive inmune de los pacientes están relacionados, verdaderamente, con una menor carga viral o "set point" (Simon et al. 1993; Popper et al. 1999), en ocasiones 28 veces menor a la de casos de su pariente VIH-1, en pacientes recientemente seroconvertidos (Andersson et al. 2000). A su vez, también han sido relacionadas con esta inferior carga viral de los pacientes, reflejada a su vez en menor carga en semen y tracto genital femenino, las aparentemente mermadas eficiencias de transmisión del virus, tanto horizontal (De Cock et al. 1993; Gottlieb et al. 2006; Hawes et al. 2008) como vertical, de la madre al feto (O'Donovan et al. 2000).

Aunque a grandes rasgos, se observa que la menor carga viral tiene una notable importancia para el menor impacto general del VIH-2 sobre los humanos, dejar la explicación ahí sería solo rascar la superficie de los factores moleculares que pueden estar influyendo en ese fenómeno. Más aún, en contraste con el ser

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

humano, en los simios mangabey grises infectados por el ancestro y pariente más cercano del VIH-2, el VISsm, se suelen observar elevadas cargas virales, pero manteniendo un buen estado de salud y sin depleción de los linfocitos T CD4⁺ (Silvestri et al. 2003). Curiosamente, se podría encontrar un paralelismo con este fenómeno en humanos, donde existe un reducido grupo de personas, conocidos como controladores virémicos (en inglés, “viremic nonprogressors, VNP” o “viremic slow progressors, VSP”) que estando infectados con el VIH-1, mantienen niveles estables de linfocitos T CD4⁺, mientras, paradójicamente, presentan una elevada viremia, durante años (Shaw et al. 2013).

Otro factor que podría estar influyendo es la actividad retrotranscriptasa, ligeramente menor en el VIH-2 y, se ha descrito que podría deberse a una menor actividad RNasa H, fundamental para la eliminación de la hebra molde genómica de ARN y de los cebadores en la síntesis de la cadena de ADN (Hizi et al. 1991; Post et al. 2003). Además, la enzima transcriptasa reversa o retrotranscriptasa (RT) del VIH-2 tiene diferencias en su sitio de unión a ATP, que se reflejan en una resistencia mayor a los antirretrovirales del grupo de los “inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa” (siglas en inglés, NNRTIs) (Boyer et al. 2006).

Otra diferencia se ha descrito al nivel de la glicoproteína de superficie (“surface envelope protein, SU”) del complejo de la envoltura del VIH-2 (gp105), la cual, a diferencia de la de la envoltura del VIH-1 (gp120), puede unirse, no solo al receptor CD4, sino también a moléculas del receptor CD8 presentes en linfocitos T, lo cual activa una mayor producción de β -quimiocinas en comparación con la respuesta producida por el VIH-1, que no mediaría por este receptor (Kaneko et al. 1997; Akimoto et al. 1998). De todas formas, la diferencia entre el control de la infección por VIH-2 por parte de algunos pacientes, frente a los que presentan sintomatología, se ha descrito más dependiente de la magnitud de respuesta específica a la poliproteína estructural Pr55-Gag por parte de los linfocitos T CD8⁺, produciendo Interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que de la citada respuesta de CD8 ante la proteína de la envoltura gp105, que no parece manifestar diferencias significativas entre ambos grupos (de Silva et al. 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.4. EL VIRUS VIH-1: ESTRUCTURA Y CARÁCTERÍSTICAS:

1.4.1. Genoma viral:

El virus VIH-1, se encuentra clasificado en la familia *Retroviridae* (*Orthoretrovirinae*, a su vez), dentro del género *Lentivirus*, donde también se clasifican los previamente citados VIH-2 y los diferentes virus VIS (German Advisory Committee Blood 2016). El genoma del virus lo forman dos hebras homólogas de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo y de cadena simple, que habrá de ser convertido en ADN de doble cadena por la enzima transcriptasa inversa y posteriormente integrado en el genoma humano de la célula infectada, tal y como ocurre en el resto de los integrantes de la familia de los retrovirus (Hu and Temin 1990). Cabe destacar que, aunque normalmente estas dos hebras son homólogas y derivan del mismo progenitor, en ocasiones, debido a esta característica, pueden ocurrir recombinaciones en células infectadas simultáneamente con dos provirus diferentes, dando lugar a viriones heterocigotos, con una hebra de ARN de cada progenitor, que serán unificadas en nuevas variantes híbridas en posteriores ciclos de la retrotranscriptasa (RT), al infectar nuevas células y contribuyendo enormemente, como estrategia evolutiva del virus (Burke 1997). El genoma del VIH-1 consta, en concordancia con su familia de pertenencia, los retrovirus, de los genes *gag*, *pol*, *env*, aparte de los genes que codificarían para diversas proteínas reguladoras y accesorias, que serán explicados de forma breve, posteriormente. Flanqueando el genoma por ambos extremos encontramos las secuencias “long terminal repeat (LTR)”, que codificaría en su extremo 5’ para el promotor de la transcripción de los genes virales (**Imagen 1**). El extremo 3’ tiene la misma secuencia que el encontrado en 5’, pero curiosamente no actúa como promotor mientras el extremo 5’ esté presente y activo, sino como un extremo de terminación de la transcripción y región de poli-adenilación (Klaver and Berkhout 1994).

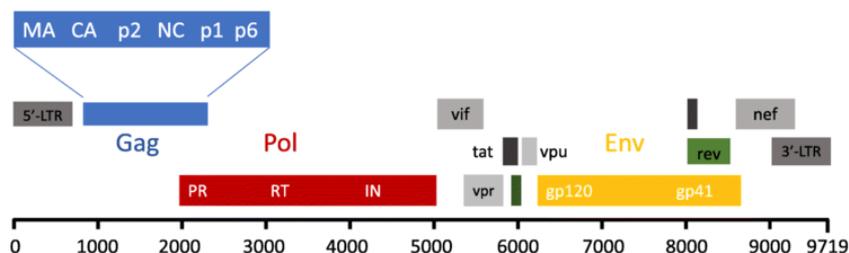


Imagen 1. El genoma del VIH-1 y las proteínas que codifica. Esta imagen está adaptada del trabajo de Cervera y colaboradores (Cervera et al. 2019).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

El virión del VIH-1 tiene un diámetro al microscopio electrónico de entre 100 y 120 nanómetros y está formado por la envoltura viral, proveniente de la membrana plasmática de la célula huésped y proteínas estructurales como la matriz (MA, p17), inmediatamente debajo de esta envuelta, que recubre la cápside (CA), compuesta de la proteína p24 y con una morfología troncocónica. Finalmente la nucleocapside (NC, p7) se encuentra en la zona más interna del virión, asociada e interactuando con el ARN genómico (Levy 2007). **(Imagen 2)**

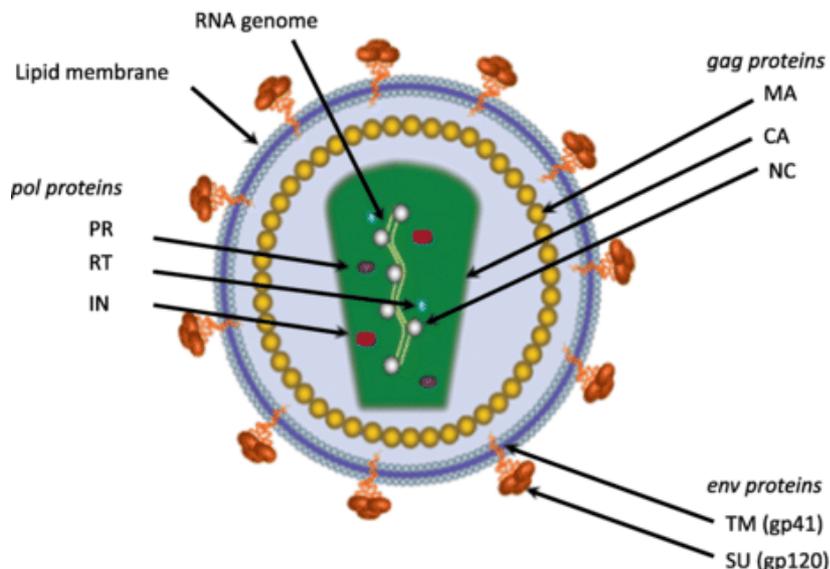


Imagen 2. Estructura del virión del VIH-1. Esta imagen está adaptada del trabajo de Cervera y colaboradores (Cervera et al. 2019).

1.4.2. El Ciclo viral: una foto inicial:

Antes de ahondar en las características y funciones, de cada una de las proteínas que se producen a partir del genoma del virus, parece conveniente aportar una visión general previa, al menos breve, de todo el ciclo viral. No obstante, una vez se hayan recorrido todos los apartados referentes a las diferentes proteínas virales, dicho ciclo cobrará mucho más sentido. Para aportar esta “foto inicial”, me ha resultado adecuada la imagen y el resumen que realizan en el artículo de 2011, “Current progress and challenges in HIV gene therapy”, por comprender de manera suficiente, las etapas más relevantes de dicho ciclo:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3296050	Código de verificación: Ejn1Cgrf
Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

De manera resumida, el virus contacta con la célula cuando la glicoproteína de la envuelta gp120 se une al receptor CD4 y a los correceptores CXCR4 o CCR5 (**Imagen 3.A**), para posteriormente mediar la fusión de las membranas (**Imagen 3.B**). Una vez dentro, se produce la desencapsidación del genoma viral (**Imagen 3.C**) para que pueda tener lugar el proceso de la retrotranscripción que, a partir del ARN genómico viral, dará lugar al ADN complementario (**Imagen 3.D**). Se forma entonces el complejo de pre-integración (**Imagen 3.E**), que será transportado al interior del núcleo (**Imagen 3.F**), para que el ADN complementario viral sea integrado en el genoma de la célula huésped (**Imagen 3.G**). Es necesario que tempranamente se transcriban los ARN mensajeros (ARNm) multiprocesados que codifican para las proteínas reguladoras Tat y Rev (**Imagen 3.H**), para que se traduzcan, dichas proteínas, en el citoplasma (**Imagen 3.I**) y, sean importadas de nuevo al núcleo, para cumplir sus funciones reguladoras; Tat, uniéndose al ARNm que se está transcribiendo y permitiendo así la elongación de la transcripción, para producir transcritos de tamaño completo y, Rev, cuya función será la de transportar los ARNm transcritos, al citoplasma (**Imagen 3.J**). Los transcritos producidos y transportados al citoplasma por Rev, darán lugar al RNA genómico (**Imagen 3.K**) así como serán traducidos para dar lugar a los precursores de las proteínas estructurales y enzimáticas y, a las proteínas accesorias del virus (**Imagen 3.L**). Aquí cabe realizar una puntualización dado que, si bien no está especificado en el dibujo de la **Imagen 3**, el proceso de traducción de las glicoproteínas de la envuelta (Env) ocurre en el retículo endoplásmico, dando lugar a la poliproteína gp160, que habrá de escindirse en gp120 y gp41 en el Aparato de Golgi, de manera que así se asocian a membrana plasmática (Doms, Earl, and Moss 1991). El ensamblaje del virión tiene lugar en la membrana plasmática, donde se habrán desplazado los dímeros de RNA genómico viral asociados a las poliproteínas Gag y Gag-Pol (**Imagen 3.M**), para que se produzca la liberación (“budding”) de los viriones (**Imagen 3.N**). Finalmente, se produce la maduración de los viriones por medio del procesamiento proteolítico de la proteasa viral (**Imagen 3.O**) (revisado en (Chung, Rossi, and Jung 2011))

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

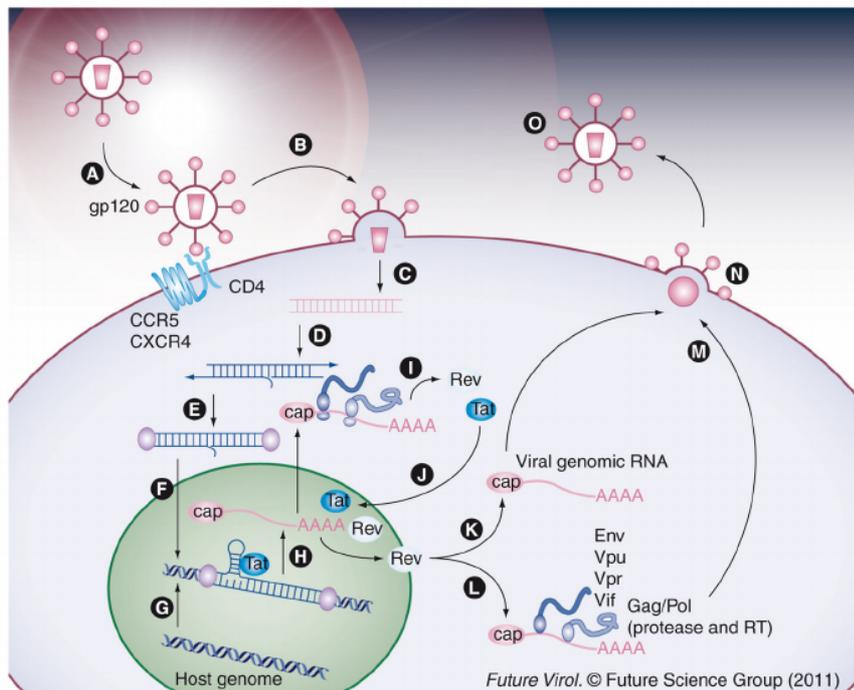


Imagen 3. Dibujo esquemático del ciclo viral del VIH-1. Esta ilustración pertenece al trabajo de Chung, Rossi y Jung (Chung, Rossi, and Jung 2011).

1.4.3. Genes *gag* y *pol*:

En el VIH-1, la síntesis de las mencionadas proteínas estructurales (codificadas por el gen *gag*) y de las proteínas enzimáticas (provenientes del gen *pol*) está estrechamente relacionada, siendo traducidas a partir del mismo molde de ARN (ARN no empalmado o “unspliced”), que daría lugar a la poliproteína precursora Pr55-Gag y a su vez, también al precursor Gag-Pol de 160 kDa. Dicha poliproteína requiere, para ser traducida, que se produzca un cambio de marco ribosómico, con respecto a la traducción de Gag (Jacks et al. 1988), evento que ocurriría con una frecuencia del 5-10%, lo que mantendría la proporción de Gag frente a Gag-Pol en un ratio de 20:1, valores necesarios para la correcta maduración y ensamblaje de los viriones (Karacostas et al. 1993; Shehu-Xhilaga et al. 2002).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

1.4.3.1 Proteínas estructurales de Pr55-Gag:

Como se nombró en el apartado previo, las proteínas internas estructurales del virión (MA, CA, NC y p6) serán formadas a través del procesamiento proteolítico, a partir de la poliproteína precursora, Pr55-Gag, durante la maduración del propio virión. En este proceso serían también formados los conocidos como péptidos espaciadores, SP1 y SP2. Dicho procesamiento sería mediado por la enzima proteasa viral (PR), que irá escindiendo estas proteínas del precursor Pr55-Gag, secuencialmente, a lo largo de 5 sitios de corte (de Marco et al. 2010). (Imagen 4)

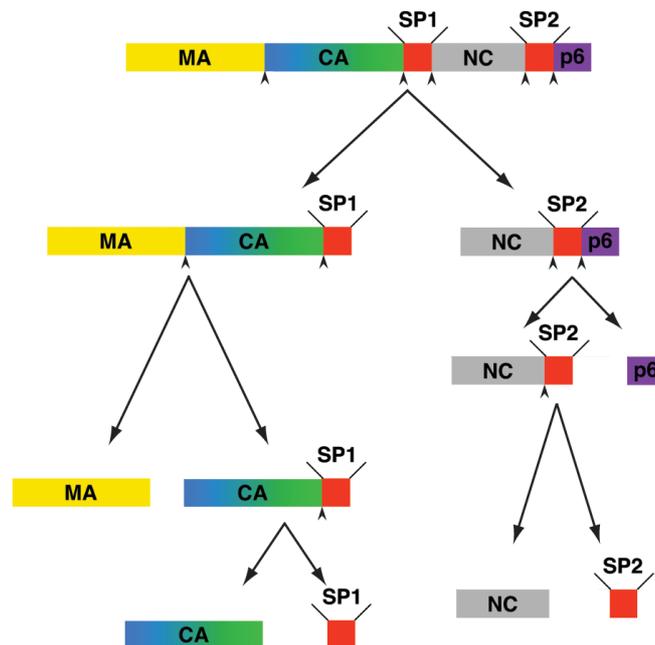


Imagen 4. Esquema de procesamiento de la poliproteína Pr55-Gag, a través de los 5 sitios de corte, por la proteasa viral. Este esquema está adaptado del trabajo de de Marco y colaboradores (de Marco et al. 2010).

El dominio MA, en el extremo N-terminal de Pr55-Gag intacto, tendría en primer término, la función de llevar a Gag a la membrana plasmática donde poder realizar la gemación ("budding") de los viriones y el reclutamiento de los factores virales y celulares necesarios. Esta interacción de MA con la membrana plasmática se produciría a través de uniones específicas con fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), que se encuentra en la cara interna de esta (Chukkapalli et al. 2008). El extremo N-

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

terminal de MA debe de estar unido covalentemente al grupo miristoilo, en primera instancia, para que se produzca esta unión con la membrana plasmática, de manera que la interacción con PIP₂ produciría un fenómeno conocido como “interruptor conformacional de miristoilo”, que expondría esta región y permitiría dicha unión (Saad et al. 2006). Se ha descrito, además, que este fenómeno, que se produce con el dominio MA dentro de Pr55-Gag, estaría impedido en la proteína MA madura (p17), debido a cambios conformacionales en esta región (Zhou and Resh 1996). Otra función descrita de la proteína MA será la de permitir la incorporación de Env a la membrana plasmática, a través de la interacción de esta con la cola citoplasmática de Env, en forma de estructuras triméricas (Tedbury and Freed 2014; Alfadhli et al. 2019).

El dominio CA de Gag constituye la proteína p24 de la cápside viral, que adopta la forma de una estructura de tipo fullereno, que envolvería el ARN genómico viral y estaría compuesta por hexámeros y pentámeros unidos por el extremo N-terminal de CA y dímeros unidos por el extremo C-terminal, conectados en un entramado que formaría la estructura de la cápside madura (Pornillos, Ganser-Pornillos, and Yeager 2011). Otra importante función de CA de VIH-1 es la de unirse con la ciclofilina A de las células productoras de virus (Franke, Yuan, and Luban 1994), incorporándola a los viriones nacientes y protegiendo la región específica a la que se uniría el TRIM5 α (“tripartite-containing motif 5 α ”) de la célula infectada, el cual actuaría como un potente factor de restricción contra el VIH-1 en humanos, de verse comprometida esta unión (Kim et al. 2019). Parece ser, que TRIM5 α , podría actuar uniéndose específicamente a la proteína CA y desestabilizando tempranamente su estructura, impidiendo los subsiguientes pasos del ciclo viral (Stremlau et al. 2006). Es curioso como en los primates del Viejo Mundo, su TRIM5 α les confiere resistencia a la infección por el VIH-1, sin embargo son susceptibles a la infección por el SIV (Stremlau et al. 2004). Por su parte, en monos aulladores (*Aotus trivirgatus*) de América del Sur, se encontró que expresaban la proteína quimérica TRIM5-CypA, una variante de TRIM5, que contenía la secuencia de ciclofilina A y podía unirse directamente a la proteína CA, bloqueando el ciclo viral (Nisole et al. 2004).

También se han identificado importantes funciones de la proteína CA interaccionando con elementos del citoesqueleto, como las proteínas asociadas a microtúbulos MAP1A/S (Fernandez et al. 2015) o con adaptadores de dineína como BICD2 (Carnes, Zhou, and Aiken 2018) y kinesina, como FEZ1 (Malikov et al. 2015) mediando de esta manera el transporte del material viral por el citoplasma. Además, se ha descrito que la proteína CA interaccionaría con nucleoporinas como Nup153, Nup98 (Di Nunzio et al. 2013) y Nup358 (Dharan et al. 2016), mediando así en el proceso de transporte del genoma viral del citoplasma de la célula infectada al núcleo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

La proteína nucleocápside NC (p7), tiene una estructura altamente conservada que incluye dos dominios “dedo de Zinc” (ZFs), con alta afinidad por ácidos nucleicos y tendrá una función fundamental en la encapsidación del ARN genómico (Zhang and Barklis 1995), uniéndose específicamente a este ARN viral en su región Psi (Ψ), a través de dichos dedos de zinc (De Guzman et al. 1998) y es fundamental para la correcta formación de un dímero estable de ARN genómico y la maduración de dicho ARN (Muriaux et al. 1996). La actividad chaperona de NC será fundamental para este proceso además de para otros, como la retrotranscripción, donde la incorporación del primer de ARN^{t_{lys}3} será requerida para la iniciación de dicho proceso por parte de la RT y sucede, en efecto, gracias a la capacidad de NC de promover el “annealing”, de dicho ARNt, al ARN genómico e incorporarlo así a los viriones, (Cen et al. 1999), así como de colaborar en la actividad RNasa H de la RT de VIH-1 (Peliska et al. 1994).

Se ha descrito, así mismo, la capacidad de NC de colaborar en el proceso de integración, mediante la formación de complejos nucleoproteicos estables, que permitirían reconocer los LTR del ADN viral formado, por parte de la IN viral (Poljak et al. 2003). También se ha demostrado que la proteína NC interacciona con diversos componentes celulares, como por ejemplo con la proteína ALIX, perteneciente al complejo multiproteico ESCRT (siglas en inglés de “complejo de clasificación endosómica necesario para la maquinaria de transporte”), interaccionando con su dominio Bro1, interviniendo así en el proceso de gemación y liberación de los virus formados (Sette, Dussupt, and Bouamr 2012). Otra proteína celular con asociación a NC identificada es APOBEC3G (“apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G, A3G”), que esta descrita como un factor de restricción contra el virus VIH-1, en el proceso de la retrotranscripción. Se ha visto que los viriones incorporan A3G mediante la interacción directa con el dominio N-terminal de NC, pero se postula que esta unión podría ser un arma de doble filo para este factor de restricción, pues en caso de producirse elevada cantidad de Gag, serviría este de señuelo para reducir los niveles de A3G, llevándolo a degradación (Alce and Popik 2004).

El dominio p6 se encuentra en el extremo C terminal de Gag y estará implicado en varias funciones importantes para la salida del virus. Por un lado, este dominio es conocido también como “L-domain” (“late budding domain”), ya que interviene en el proceso de “budding” interaccionando, mediante sus secuencias PTAP y LYPXnL, con los componentes Tsg101 (“tumor susceptibility gene 101”) y ALIX (en su dominio V) del complejo ESCRT, respectivamente, cooperando por lo tanto con la proteína NC (Dussupt et al. 2009), que se une a ALIX también, tal y como se cita previamente. Por otro lado, se ha identificado que el dominio p6 también será fundamental para la incorporación de la proteína accesoria del virus Vpr a los viriones nacientes, uniendo dicha proteína en una secuencia LXXLF, altamente conservada, en el extremo C-terminal de p6 (Kondo and Göttlinger 1996).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Recientemente se ha descrito que el dominio p6 también sería fundamental para la unión selectiva del Pr55-Gag al ARN genómico, entre el “pool” de ARN presente en la célula, antes del proceso de encapsidación de dicho ARNg (Dubois et al. 2018).

Por último, se han descrito algunas funciones para los pequeños, pero no irrelevantes, péptidos espaciadores de Gag, conocidos como SP1 y SP2. Se ha identificado que la integridad de la secuencia de SP1 (p2) es fundamental para el ensamblaje de partículas virales, así como la formación espontánea de cuerpos similares a partículas virales no infecciosas, VLP (“virus-like particles”) (Datta et al. 2011; Datta et al. 2016). De hecho, se ha estudiado como para el ensamblaje del virión y el budding, es necesaria la multimerización y formación, en membrana plasmática, de un entramado hexagonal de Gag, mediado por la interacción entre el dominio CA y SP1, más la participación del hexafosfato de inositol (IP6) de la célula, para la maduración de este entramado (Dick et al. 2018). Las funciones de SP2 (p1) son menos conocidas, pero algunos estudios han identificado que mutaciones en su secuencia producirían pérdida de infectividad y menor estabilidad el dímero de ARNg (Hill et al. 2007; Hill et al. 2002).

1.4.3.2. Evidencias de la importancia de la ubiquitinación de Pr55-Gag, para la maduración y salida de viriones:

A principios de los 90, la proteína ubiquitina se había encontrado, dentro de un pool de proteínas celulares, unidas a muestras purificadas de VIH-1, VIH-2 y VIS (Arthur et al. 1992), pero hasta 1997 no se dilucidó que dicha asociación no era una mera contaminación en la purificación, sino que, efectivamente, la ubiquitina podía ser encontrada dentro de los viriones, en una proporción del 10%, frente al nivel total de Gag. Pero este estudio aportó además la primera evidencia de la ubiquitinación de Pr55-Gag, describiendo que al menos un 2% de la poliproteína Gag analizada, se encontraba unida covalentemente a una ubiquitina, en su dominio p6 (Ott et al. 1998).

En 2001, se identificaría de qué manera Gag se podía asociar a la maquinaria celular relacionada con la ubiquitina. Se descubrió que, mediante el motivo PTAP presente en el dominio p6 de Gag, esta poliproteína interactuaba con la proteína celular Tsg101 del complejo ESCRT-I, a través de su región N-terminal, que presentaba homología de secuencia con las enzimas ubiquitina ligasas E2 (VerPlank et al. 2001).

Curiosamente, por aquel entonces, un estudio había descrito, usando mutantes de las lisinas del dominio p6^{Gag}, que la ubiquitinación concreta de p6^{Gag} podía no ser obligatoria para la replicación viral in vitro, ni para la aparición de ubiquitina libre en los viriones (Ott et al. 2000). Este hecho estaría en concordancia con los

20

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

resultados de un estudio posterior, donde, mediante el uso de mutantes carentes de p6 o con sus dos residuos de lisina mutados, demostrarían que si bien, en los mutantes, no se unía ubiquitina en este dominio, sí que lo hacía, de manera comparable a la proteína “wild-type”, en los dominios MA, CA y NC de Gag (Gottwein and Kräusslich 2005). Posteriormente, los mismos investigadores ampliaron este estudio, mediante el uso de mutantes de todas las regiones que habían encontrado mono-ubiquitinables, y variantes combinadas de los mismos. Descubrieron, de esta manera, que el dominio SP2 también era mono- o di-ubiquitinable y que, en general, mientras que las mutaciones puntuales no parecían afectar a la liberación viral, eran las mutaciones acumuladas entre varios de estos dominios las que causaban defectos, impidiendo el proceso del “gemación” (Gottwein et al. 2006). Posteriormente, el mismo equipo propondría que la ubiquitinación estaría estrechamente relacionada con la unión a membrana y la multimerización de Gag y probarían que, de usarse mutantes deficientes en su unión a membrana como (G2A)Gag, el perfil de ubiquitinación se vería drásticamente reducido (Jäger, Gottwein, and Kräusslich 2007).

Se encontraría, además, que la ubiquitin ligasa NEDD4-2s (isoforma nativa en humanos de la NEDD4-2) era capaz, tanto de potenciar la liberación de viriones, como de revertir los defectos en el mecanismo del “gemación”, en mutantes de PTAP que no pudiesen asociarse eficientemente a Tsg101 (Usami et al. 2008). Asimismo, también se ha descrito que, a través de esta NEDD4-2s, p6^{Gag} podría reclutar indirectamente a la proteína PACSIN2 (en inglés, “Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 2”), para promover la liberación de viriones, mediando en la dinámica del citoesqueleto de actina, de manera que, en células depletadas de PACSIN2, la replicación viral se vería enormemente comprometida (Popov et al. 2018).

Dado que tanto Gag, como las proteínas Tsg101 y ALIX, participantes del complejo ESCRT-I, con las que interacciona, presentan algún nivel de ubiquitinación, la importancia concreta de la ubiquitina sobre cada uno de estos agentes, para la liberación de viriones, fue estudiada mediante el uso del dominio catalítico de la enzima deubiquitinasa (DUB) del VHS, UL36, sobre cada uno de los implicados en este proceso. La fusión de DUB con Tsg101, a la par que con la proteína Alix, suprimía enormemente la salida de viriones y asimismo, ocurría cuando DUB era fusionado con Gag. Asimismo, La adición de la enzima ubiquitina ligasa, NEDD4-2s, producía el rescate del “budding”, en los experimentos donde se había fusionado DUB sobre las proteínas de ESCRT-I, produciendo, paralelamente, un visible aumento de la ubiquitinación de Gag en membrana. Sin embargo, esta enzima no podía revertir el efecto inhibitor irremediable de la expresión de Gag-DUB, pese a producir un aumento de la ubiquitinación de Tsg101. Se demostraba así que la ubiquitina no solo era capaz de mediar en el proceso del “budding” viral, sino que era absolutamente necesaria e intrínseca de este proceso y, en concreto, parecía

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

revestir especial importancia la ubiquitinación sobre Pr55-Gag. Cabe decir que en estos experimentos, la interacción de Gag con las proteínas ESCRTs estudiadas, no se veía afectada en ningún caso (Sette et al. 2013).

1.4.3.3. Proteínas estructurales y enzimas derivados de Gag-Pol:

Como se ha adelantado previamente, el gen *pol* habrá de ser traducido en conjunto con la región del gen *gag*, debido a la carencia en este gen de un codón de iniciación y, a que se solapa parcialmente con el extremo 3' del gen *gag*, de forma que se generará la poliproteína Pr160-Gag-Pol (Jacks et al. 1988). De la escisión proteolítica de esta poliproteína, por lo tanto, también serán obtenidas proteínas maduras pertenecientes a Pr55-Gag, como son MA, CA, p2 y NC. Por parte del gen *pol*, se obtendrán desde este precursor la proteína TF (en inglés, "transframe protein"), la enzima viral proteasa (PR), la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN) (revisado en (Hill, Tachedjian, and Mak 2005)) (Imagen 5)

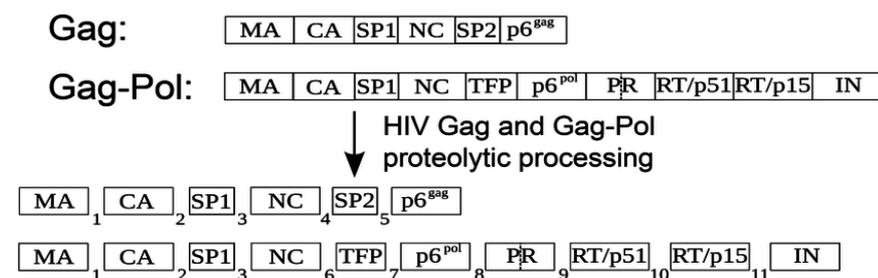


Imagen 5. Esquema de los sitios de procesamiento de las poliproteínas Pr55-Gag y Pr160-Gag-Pol.
 Este esquema está adaptado del trabajo de Kónnyú y colaboradores (Kónnyú et al. 2013).

Al igual que con Pr55-Gag, el procesamiento proteolítico, para dar lugar a estas enzimas virales maduras, depende exclusivamente de la actividad de la proteasa viral PR, pero, si la forma madura de esta enzima procede del procesamiento proteolítico de su propio precursor Gag-Pol, tendría el virus que solventar de alguna manera esta paradoja. En efecto, la astuta forma en la que el virus logra superar este escollo, será el autoprosesamiento proteolítico por parte del dominio PR, aun embebido dentro del precursor Gag-Pol. Debido a que la actividad catalítica de la PR madura necesitaría de su asociación en forma de homodímeros, donde el sitio activo poseería un residuo de ácido aspártico de cada monómero, (Navia et al. 1989), se habrían de formar dímeros del precursor Gag-Pol, los cuales, se ha propuesto que llevarían a cabo las primeras escisiones proteolíticas de forma intramolecular, autoprosesándose así cada dímero de Gag-Pol formado (Pettit et al.

Introducción

2004). Se ha postulado que los precursores de PR tendrían limitados sitios de corte y menor actividad hasta que se llegué, secuencialmente, a la escisión de la región TF del extremo N-terminal del dominio PR, momento en el cual, se estabilizaría la estructura dimérica de PR y esto permitiría que presentase una actividad mucho mayor, similar a la de la PR dimérica madura (Louis et al. 1999), produciéndose, a partir de entonces, el corte secuencial del resto de proteínas de Gag y Pol (revisado en (Hill, Tachedjian, and Mak 2005)).

La enzima retrotranscriptasa (RT) requiere, a su vez, para su actividad, de la formación de un heterodímero, que se formara a partir de las subunidades p66 y p51, esta última derivada, de hecho, de la subunidad p66, tras la escisión, por parte de la proteasa viral, de una región que corresponde al dominio RNasa H (Graves et al. 1990). Dentro del heterodímero, la subunidad p66 sería la que desempeñaría las funciones catalíticas de la enzima, siendo p51 importante para la maduración del dímero, mediante cambios conformacionales, que permitirían la actividad de los dominios catalíticos (Divita et al. 1995). Asimismo, la integridad de la secuencia de p51 parece ser fundamental para la unión la primer de la RT, el ARN^{t_{Lys3}} (Jacques et al. 1994).

El proceso por el cual la RT genera, a partir de la hebra de ARN genómico de sentido positivo, la doble cadena de ADN viral, sustrato de la integración, es un fenómeno extensamente descrito. El primer lugar, la RT requiere del acoplamiento del primer ARN^{t_{Lys3}} en el extremo 5' de la hebra de ARN⁺ viral, en una región conocida como "pbs" (sitio de unión del primer, en inglés "primer binding site") (**Imagen 6.A**). La actividad RNasa H de la enzima RT degradará el extremo 5' de la hebra molde de ARN, desde el cual se ha formado una pequeña cadena complementaria de ADN (**Imagen 6.B**). En ambos extremos 5' y 3' del ARN genómico, hay secuencias repetidas que se denominan R. Dado que la nueva hebra de ADN- de cadena simple ha copiado dicha secuencia R, se podrá unir en el extremo 3' del ARN⁺, para continuar la síntesis de la cadena homóloga de ADN- (**Imagen 6.C**). De hecho, la secuencia repetida R, permite que la cadena de ADN- se una al extremo 3' de cualquiera las 2 hebras de ARN genómico, que porta el virión, propiciando así la recombinación génica y la variabilidad de los nuevos virus. Una vez formada la hebra homóloga de ADN- de la secuencia completa, la RNasa H debe actuar de nuevo para degradar la hebra molde de ARN. Sin embargo, una secuencia de la cadena molde, rica en purinas, conocida como ppt, es resistente a esta actividad catalítica y permanecerá unida a la hebra de ADN- (**Imagen 6.D**), para poder servir como primer de la formación de la nueva hebra de ADN⁺ (**Imagen 6.E**). La actividad RNasa H ha de eliminar el primer de ARN^{t_{Lys3}}, que aún permanece en la hebra de ADN-, para que ambas hebras se puedan unir por sus secuencias complementarias pbs y completen la síntesis de la doble cadena de ADN (**Imagen 6.F**). El resultado es una doble cadena de ADN, cuya secuencia es mayor que la presente en la hebra de ARN genómico original, dado que los extremos poseerán

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

secuencias que se encontraban originariamente en 3' y 5' la secuencia repetida R. Estos extremos elongados son los conocidos como LTRs (**Imagen 6.G**) (resumen del proceso revisado en (Hu and Hughes 2012)).

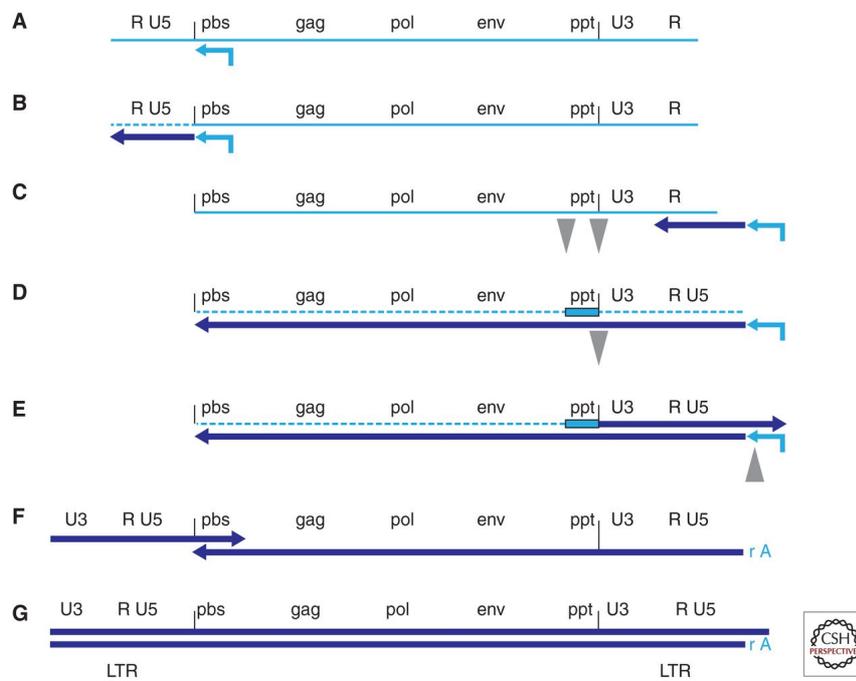


Imagen 6. Esquema del proceso de la Retrotranscripción. Este esquema pertenece al trabajo de Hu y Hughes (Hu and Hughes 2012).

A su vez, el proceso de integración del genoma viral, en este caso, de la molécula de ADN_{2c} (bicatenario) formada tras la acción de la retrotranscriptasa, en el genoma de la célula infectada, será desempeñado por la enzima integrasa viral (IN). Se ha demostrado que la actividad de la forma madura de esta enzima requiere de la formación de un tetrámero, cuya estructura plegada se uniría tanto al ADN complementario (ADN_c) viral como al ADN celular objetivo, desde los dominios C-terminales de la enzima (Esposito and Craigie 1999), mientras que los extremos N-terminales serían fundamentales para el plegamiento y la multimerización de su forma madura, mediante uniones dependientes de zinc, en una secuencia que contiene un par de residuos de histidina y cisteína (el motivo HHCC) (Zheng, Jenkins, and Craigie 1996).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Para que se produzca el desplazamiento al núcleo y la integración en el genoma celular, del ADN_c viral, sintetizado en la retrotranscripción, este ha de conformarse como parte del complejo de pre-integración (PIC), un complejo nucleoproteico que además de este ADN_c y de la enzima integrasa, contendrá la retrotranscriptasa, la proteína matriz, Vpr, la nucleocápside (Bukrinsky et al. 1993; Heinzinger et al. 1994; Poljak et al. 2003), así como también, se ha descrito que se asociarían a este, determinados componentes de la célula infectada como HMG I(Y) (proteína “high mobility group”), el cual, en la célula sana, tiene funciones en el control transcripcional y en la arquitectura de los cromosomas (Farnet and Bushman 1997). Además, se ha estudiado extensamente que la integrasa requiere de la interacción con la proteína nuclear LEDGF/p75, que la ayudaría a unirse a la cromatina y la protegería de la degradación (revisado en (Poeschla 2008)).

La actividad catalítica de la integrasa (IN) en el proceso de integración está bien descrita. En primer lugar, se produce el conocido como procesamiento 3', donde la IN se ha de unir al ADN viral bicatenario, en los LTR de ambos extremos, donde escindiría 2 nucleótidos de cada extremo 3'. En el siguiente paso, conocido como transferencia de la cadena de ADN, los grupos hidroxilos de los extremos expuestos atacarán al ADN huésped en 2 de sus enlaces fosfodiéster, separados por 5 nucleótidos. Una vez se han unido ambos extremos 3' del ADN viral al ADN de la célula, los dos nucleótidos desapareados que quedaban en ambos extremos 5' (debido a la escisión inicial), han de ser eliminados, para reparar este intermediario de integración y terminar así con una doble cadena ininterrumpida de ADN, con el genoma viral integrado, flanqueado por las secuencias de los extremos LTR (revisado en (Craigie 2012)).

1.4.4 Proteínas reguladoras y accesorias:

Entre las proteínas que genera el virus, algunas tienen diversas funciones colaborando en procesos que permiten la infectividad del virus, asistiendo a las proteínas estructurales y enzimáticas descritas previamente. Dos genes, *tat* y *rev*, darán lugar a importantes proteínas reguladoras que serán fundamentales para la expresión génica del material viral integrado.

La proteína Tat (trans-activador de la transcripción) se unirá a la región TAR (“trans-activation responsive RNA”) del ARN que se está transcribiendo, localizada en el LTR del extremo 5', estimulando así la elongación de la transcripción del material genético viral (Kao et al. 1987). Para esta función, se ha descrito que Tat interacciona con proteínas de la célula huésped, como ciclina T1 y CDK9 (Quinasa dependiente de ciclina 9), que compondrían, conjuntamente, el factor de elongación de la polimerasa RNAP II, conocido como P-TEFb, aumentando de esta manera la afinidad y especificidad de Tat hacia el TAR ARN y permitiendo la transcripción del

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

ARNm, que de otro modo habría terminado su transcripción prematuramente (Wei et al. 1998).

Por otro lado, la proteína Rev, se expresa tempranamente en la fase de replicación viral. Su función será la de exportar los transcritos de ARN viral, no empalmados o singularmente empalmados desde el núcleo al citoplasma, donde, una vez ahí, se disociarían para dar lugar al genoma viral o al ARNm que se ha de traducir. Para ello se unirá a la región de *env* conocida como “elemento de respuesta a Rev” (“Rev response element, REE”) (Rausch and Le Grice 2015). Se ha demostrado que la evolución ha dotado a esta proteína de una secuencia bastante plástica o robusta, manteniendo su actividad pese a sufrir una alta tasa de mutación y estar solapada con otros dos importantes genes virales, *tat* y *env* (Jayaraman et al. 2019).

Además de los genes reguladores existirán, repartidos por el genoma viral, los llamados genes accesorios, que darán lugar a proteínas fundamentales para la infectividad viral con diferentes funciones. Estas proteínas son Vpu, Vpr, Nef y Vif.

En primer lugar, Vpu es una pequeña proteína transmembrana, exclusiva del VIH-1, sin homólogos conocidos en el VIH-2 ni el VIS (Cohen et al. 1988). La función principal de esta sería la de unirse a las moléculas de CD4 recién formado, aun en el retículo endoplásmico, con el objetivo de promover su degradación por la vía proteasómica, mediada por la ubiquitinación de CD4, (Schubert et al. 1998). Para realizar dicha función requiere de la colaboración coordinada de la poliproteína de la envuelta gp160, que uniría el CD4 recién sintetizado en el retículo, permitiendo así que Vpu se una a este y promueva su degradación, potenciando a su vez un mayor procesamiento de dicho gp160 y por ende, una mayor producción viral (Willey et al. 1992).

Otra función que se ha descrito de Vpu sería la de contrarrestar la acción, como factor de restricción viral, de la proteína celular, inducida por interferón, BST-2 (en inglés, “bone marrow stromal antigen 2”) o “Tetherin”. Esta proteína de membrana actuaría colocalizando con Gag en la membrana plasmática e inhibiendo finalmente la liberación o “budding” de viriones (Van Damme et al. 2008). Además, se ha descrito que esta degradación de BST-2, promovida por Vpu, sería mediada por la ruta proteasómica (Goffinet et al. 2009), así como ocurría con la degradación de CD4 mediada por Vpu. Curiosamente, se ha descrito que ante la ausencia en el Vpu en el VIH-2, este virus ha desarrollado la capacidad de modular positivamente la liberación de viriones mediante su proteína de la envuelta. Más aun, esta proteína de la envuelta de VIH-2 producía un efecto prácticamente indistinguible de Vpu, si se expresaban dichas proteínas en VIS. No obstante, si bien manifestaba, esta Env, una acción equiparable a Vpu en la liberación viral, no presentaba el efecto desestabilizante de CD4 de esta proteína (Bour and Strebel 1996).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

La proteína accesoria Vpr ha sido referida previamente en desarrollo de esta tesis, como integrante fundamental del complejo de pre-integración PIC (en inglés, “pre-integration complex”), contribuyendo a la unión de dicho PIC al complejo del poro nuclear y de esta manera al importe al núcleo de la célula infectada de dicho complejo, que contendría el ADN_v viral, que ha de ser integrado (Popov et al. 1998). Se ha descrito, además, que la expresión de Vpr parece ser fundamental para la infección en macrófagos (Hattori et al. 1990). Asimismo, se ha estudiado que Vpr, actuaría promoviendo la replicación viral en células latentes, interaccionando con el factor de transcripción celular Sp1, cuando este está unido al promotor LTR (Wang et al. 1995). También se ha postulado que esta promoción de la replicación podría ser mediada por la interacción de Vpr con otra proteína activadora de la transcripción, TFIIB, pero que, en cualquier caso, Vpr no tendría, per se, capacidad de trans-activación del promotor de VIH-1, en ausencia de una de estas proteínas activadoras (Agostini et al. 1996). Otra función muy importante de Vpr, así como de su homólogo Vpx, presente en el VIS, parece ser la de unirse al dominio p6 de la poliproteína Pr55-Gag, mediando así su incorporación a los viriones nacientes (Selig et al. 1999).

La proteína Nef (originariamente conocida como “B-ORF”) adquiere su nombre de las primeras observaciones, donde, erróneamente, se le atribuyó una función represora de la replicación del virus, actuando negativamente sobre la transcripción de los LTR y así pues, fue bautizado por su siglas en inglés, derivadas de “Negative Factor” (Niederman, Thielan, and Ratner 1989; Ahmad and Venkatesan 1988; Luciw, Cheng-Mayer, and Levy 1987). Ciertamente, pronto se descubrió, mediante estudios in vivo, con SIV, en macaco Rhesus (Kestler et al. 1990), y posteriormente mediante el uso de líneas celulares primarias humanas, que las funciones de esta pequeña proteína de 27 kDa eran muy diversas y en absoluto irrelevantes o contrarias a la infectividad del virus VIH-1, así como para el resto de los lentivirus de primates (Aiken and Trono 1995).

Una propiedad importante de la estructura de esta proteína es su miristoilación, característica que influirá en su localización subcelular, ya que contribuirá a su presencia en la membrana celular, donde desempeña importantes funciones, que dependen de esta característica. No obstante, principalmente podrá ser encontrado, este Nef miristoilado, en citoplasma e incluso, formas no miristoiladas, aparecerán también en citoplasma y en el núcleo (Harris 1995).

Algunas de las funciones pro-virales más importantes de Nef las desempeñará modulando, de diferentes formas, la expresión en membrana plasmática de diversas proteínas de superficie. De especial importancia es su capacidad de inducir la desaparición de membrana (fenómeno conocido ampliamente como “down-regulation”) del receptor de superficie CD4, receptor principal de VIH-1 (Garcia and Miller 1991). A diferencia de la proteína Vpu, que, tal y como se explicó

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

previamente, ejercía una acción en contra de las moléculas de CD4 recién formado, aun en el retículo endoplásmico (Schubert et al. 1998), la acción de Nef ocurre sobre el CD4 ya localizado en la membrana plasmática, mediante la unión de la cola citoplasmática de CD4 con el complejo adaptador de moléculas de clatrina AP-2 (en inglés, “adaptor protein complex 2”), mediando así su internalización en vesículas recubiertas de clatrina, para después ser transportado hacia su degradación en lisosomas. Se describe, además, que el dominio di-leucina de Nef es fundamental para este proceso (Chaudhuri et al. 2007). Este fenómeno de “down-regulation” de CD4 por parte de Nef influiría de diferentes maneras en la infección del virus. En primer lugar, se postula que evitaría los eventos de súper infección de las células diana, que terminarían eliminando células con material viral integrado, ya que, de esta manera, gracias a Nef, podrían completar su ciclo y producir eficientemente nuevos viriones (Benson et al. 1993). Asimismo, de esta forma, también, Nef evitaría las interacciones nocivas para el virus entre su proteína de la envuelta y las moléculas de CD4, logrando mayor incorporación de Env y una más agresiva producción de viriones, en las fases tardías de la enfermedad (Argañaraz et al. 2003).

Tan importante como la acción sobre CD4, podría considerarse el efecto de “down-regulation” que tiene Nef sobre el complejo mayor de histocompatibilidad de Clase I (MHC-I). Se demostró que la presencia de Nef reducía la expresión en membrana plasmática de MHC-I y producía su transporte, en vesículas endosomales, donde era degradado (Schwartz et al. 1996). Estudios posteriores describieron que este fenómeno ocurría mediado por AP-1, donde Nef modulaba la unión de este a la cola citoplasmática de moléculas de MHC-I, de reciente creación, cuando aún se encontraban en la red del trans Golgi, para conducirlo a degradación por lisosomas (Roeth et al. 2004).

Además de esto, también se ha postulado que para la interacción de Nef con MHC-I podrían ser fundamentales la proteínas PACS-1 (en inglés, “phosphofurin acidic cluster sorting protein-1”), mecanismo conectado también con AP-1 (Piguet et al. 2000), o la proteína PACS-2, que mediante interacción con Arf6 (en inglés, “ADP-ribosylation factor 6”) y la quinasa PI3K (fosfatilinositol 3-quinasa), podría permitir a Nef retirar el MHC-I de la membrana plasmática, en este caso (Atkins et al. 2008).

Se describió además que el efecto de Nef sobre MHC-I se limitaba a los alotipos de HLA (antígenos leucocitarios humanos, en inglés “human leukocyte antigen”), HLA-A y HLA-B, sin afectar a HLA-C ni HLA-E. Esta diferencia permitiría a las células infectadas efectuar un balance entre, impedir el mecanismo de presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs), mientras que mantienen la expresión en superficie de los alotipos HLA-C y HLA-E, que protegen a las células de ser destruidas por células NK (en inglés, “Natural Killer”) (Cohen et al. 1999).

28

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Asimismo, se ha descrito que en el caso del MHC-II, la proteína Nef, no solo produce su “down-regulation”, sino que promueve, de manera incluso más eficiente, la expresión en membrana plasmática de la forma inmadura de la misma. Dicho efecto de Nef además parece conservarse en también en VIH-2 y VIS y supondría, para el virus, la capacidad de interferir en la presentación de antígeno a células APC y por lo tanto, evadir la respuesta inmune (Schindler et al. 2003).

Realmente, la modulación de receptores de superficie por parte de Nef, se extiende notablemente más allá de estas moléculas citadas. De especial relevancia será, también, la internalización de los receptores de quimiocinas, CCR5 y CXCR4, por su función como correceptores del virus (Michel et al. 2006). Se ha demostrado también que Nef evita la endocitosis de la proteína transmembrana DC-SING (en inglés, “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin”), estabilizándola en membrana plasmática, con la consecuencia de una mayor formación de “clusters” o agregados de células dendríticas, promoviendo así la transmisión del virus (Sol-Foulon et al. 2002).

Si bien, previamente, se describió como Vpu en VIH-1 y Env en el caso de VIH-2, cumplían una función importante contrarrestando la acción de BST-2 o “Tetherin”, curiosamente, se ha descrito que estas funciones no serían sino una adaptación, en el humano, a esta misma función, pero original del Nef de los diferentes VIS, como contramedida de este factor de restricción, ante la falta de ciertas secuencias de unión a Nef, en la BST-2 del hospedador humano, cuando se produjo el salto interespecie y la consiguiente evolución del virus (Serra-Moreno and Evans 2012).

En los últimos años se ha identificado la capacidad de Nef de contrarrestar la acción, como factores de restricción, de las proteínas SERINC5 (en inglés, “serine incorporator 5”), SERINC3 (en inglés, “serine incorporator 3”), las cuales, actuarían impidiendo la formación del poro de fusión y disminuyendo, así, la infectividad viral. Se postula que Nef impediría esta acción anti-viral, evitando la incorporación de dichas proteínas a los viriones nacientes (Usami, Wu, and Göttlinger 2015; Rosa et al. 2015).

Recientemente, se publicó un artículo, desarrollado por nuestro grupo de investigación, en el que colaboro en gran medida, como coautor, ya que, de hecho, está altamente emparentado e interrelacionado con los objetivos de esta tesis doctoral, aunque no todos sus resultados sean objeto directo de dicha tesis. En este artículo se describe una función novedosa de Nef, interaccionando directa o indirectamente con la enzima HDAC6 (histona desacetilasa 6), promoviendo así su degradación por la vía endosomal-lisosomal y neutralizando, por ende, su capacidad anti-infecciosa contra VIH-1. Se describiría así el mecanismo por el cual el virus evadiría las diversas acciones de esta enzima, en contra de su infectividad,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

cerrando de esta manera el círculo que permitiría considerarla como un factor de restricción anti-VIH (Marrero-Hernandez et al. 2019).

La última proteína accesoria que quedaba por nombrar, Vif (en inglés, “viral infectivity factor”), es además una de las más importantes para la replicación del virus. A principios de los 90, diversos estudios encontraron que esta pequeña proteína, de 23 kDa, parecía tener un papel fundamental en la infectividad del virus VIH-1, dado que ciertos virus aislados, que mostraban un fenotipo escasamente citopático, resultaban poseedores de deleciones en la región del gen *vif*, aunque, por aquel entonces, aun no se conocía que papel podía tener para el virus esta proteína (Sakai et al. 1991). Por aquel entonces se encontró, además, que virus deficientes en el gen *vif* podían entrar con normalidad a las células diana, pero veían enormemente perjudicada su capacidad de completar la síntesis del ADN proviral (von Schwedler et al. 1993).

Tuvo que pasar una década para que se encontrase el gen de la célula humana que daba lugar al factor anti-viral, que Vif estaba suprimiendo. La proteína que expresaba este gen era CEM15 (Sheehy et al. 2002), aunque enseguida, dada su homología de secuencia con las enzimas APOBEC editoras de ARN, se descubriría que se trataba de la recientemente descrita, APOBEC3G (Harris, Petersen-Mahrt, and Neuberger 2002). Esta enzima actúa como una citidina desaminasa sobre cadenas de ADN, transformando desoxicitidinas en desoxiuridinas. Cuando esto ocurre en el contexto de la cadena ADN negativo, recién formada en la retrotranscripción, desencadena que la cadena positiva, complementaria a esta, haya sustituido la desoxiguanosina, que se hubiera formado, por desoxiadenosina. El resultado final es que su actuación induce la hipermutación de G a A en la cadena de ADN_c (complementario) viral, resultado de la retrotranscripción, de manera que resultaría letal para el virus e impediría el desarrollo de la infección. No obstante un efecto moderado y no letal de esta enzima, se postulaba que podría resultar beneficioso para el virus, contribuyendo a una variación genética ventajosa, encajando con lo observado, en general, en lentivirus de primates (Zhang, Yang, et al. 2003).

Poco después, se identificó que la acción que ejercía Vif sobre A3G, era efectuada mediante la unión de Vif a este, de manera que inducía su degradación mediante la ruta proteasómica, evitando su incorporación a viriones nacientes (Marin et al. 2003; Stopak et al. 2003). Además, en este complejo, intervenían también las proteínas celulares (que indicamos en inglés), cullin-5, elongin B, elongin C y Rbx1 (en inglés, “RING-box protein 1”), de manera que permitían a Vif interactuar con A3G y producir su ubiquitinación y posterior degradación (Yu et al. 2003). Más aun, se ha descrito que Vif también contrarrestaría la acción anti-viral de A3G mediante la represión de su traducción, uniéndose, esta proteína viral, al ARN mensajero de A3G (Mercenne et al. 2010).

30

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, asimismo, demostró que la enzima celular HDAC6 antagonizaba la acción de Vif sobre A3G de dos maneras; interaccionando directamente con A3G, generando un complejo que competía eficientemente con la degradación de este, mediada por Vif, así como, por otro lado, de manera independiente, pudiendo actuar directamente sobre Vif, promoviendo su degradación por ruta autofágica. A su vez, la degradación de Vif mediada por HDAC6 requería de la interacción directa mediante su dominio BUZ (en inglés, "binder of ubiquitin zinc finger"), así como de su actividad desacetilasa intacta (Valera et al. 2015).

1.4.5. La envoltura viral (Env):

El gen de la envuelta, *env*, aparece adyacente al gen *pol*, y se traduce, en el retículo endoplásmico rugoso, en una poliproteína precursora, denominada glucoproteína de 160 kDa (gp160) por su peso molecular, pero que ha de escindirse proteolíticamente por medio de endoproteasas de la célula, como la furina (Hallenberger et al. 1992), en una secuencia de corte muy conservada en todos los retrovirus (excepto en el Visna virus), Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR), dando lugar a las glicoproteínas de la envuelta maduras, gp120 y gp41, proviniendo gp120 del extremo amino-terminal y gp41 del carboxi-terminal (Checkley, Lutge, and Freed 2011; McCune et al. 1988). Este corte, sin embargo, ocurrirá en el aparato de Golgi, hacia el cual se habrá desplazado la poliproteína precursora gp160 oligomerizada en forma de dímeros y tetrámeros (Doms, Earl, and Moss 1991). También esta poliproteína gp160 será N y O-glucosilada, modificación que será completada tras la adición de cadenas de oligosacáridos, ricas en manosa, en la región trans del aparato de Golgi (en inglés, "trans-Golgi network, TGN") (Bernstein et al. 1994; Checkley, Lutge, and Freed 2011). Tras la escisión proteolítica de esta poliproteína, ambas proteínas resultantes, gp120 y gp41, quedarán unidas por uniones no-covalentes de manera que formarán espigas de estructura heterotrimérica (es decir, tres monómeros compuestos tanto de una subunidad de gp120 como de gp41) (Ward and Wilson 2015), de las cuales, muchas serán internalizadas tras llegar la membrana plasmática, desencadenando una baja expresión en superficie de estas espigas (8-10 por virión) (Zhu et al. 2003). Este proceso es mediado por motivos de internalización, altamente conservados, presentes en la cola citoplasmática de gp41, y regulado por Pr55-Gag, que inhibe una excesiva internalización de Env, que desencadenaría viriones no viables, pero que, tal y como ocurre, de manera discreta, contribuye a la evasión del sistema inmune del hospedador (Egan et al. 1996).

Por otra parte, también la alta variabilidad del gen *env* contribuye a la evolución del virus y al escape inmunológico, presentándose entre un 25% y un 45% de variación

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

genética entre los dos subtipos VIH (VIH-1 y VIH-2) y entre 15% y 20%, entre los grupos variantes dentro de cada subtipo (Araujo and Almeida 2013; Lynch et al. 2009). A su vez, se ha encontrado una mayor variabilidad de nucleótidos en el gen de la envuelta de virus extraídos de fluido cerebroespinal, de pacientes con desordenes neurocognitivos derivados del VIH, comparándolo genes de envoltura extraídos de pacientes sin dichas patologías (Vazquez-Santiago and Rivera-Amill 2015). Es en la subunidad gp120 donde encontramos una mayor variabilidad, constando esta de 5 dominios variables reconocidos (V1-V5), entre los que se intercalan otros 5 dominios constantes (C1-C5) (Checkley, Luttge, and Freed 2011) (**Imagen 7**). La importancia de las modificaciones en estos “loops variables” ha sido demostrada por muchos autores, encontrándose, por ejemplo, que las modificaciones, tales como adición de sitios de glucosilación, en las regiones V1-V3 que se encontraban en pacientes crónicos, respecto a pacientes con infecciones tempranas, conferían al virus una mayor resistencia frente a anticuerpos neutralizantes, una mayor tasa de replicación en células con baja densidad del correceptor CCR5 e incluso mayor resistencia a fármacos inhibidores de fusión y de dicho receptor (Etemad et al. 2009). Estas regiones variables, a pesar de ser importantes para el uso del correceptor y el cambio de tropismo, de CCR5 a CXCR4, en especial V3 (Pollakis et al. 2004), no parecen ser importantes para el anclaje con el principal receptor celular del virus, el CD4. Este importante papel recae en los dominios conservados, que de verse modificados, resultan en una pérdida notable de unión a dicho receptor CD4 (Olshevsky et al. 1990).

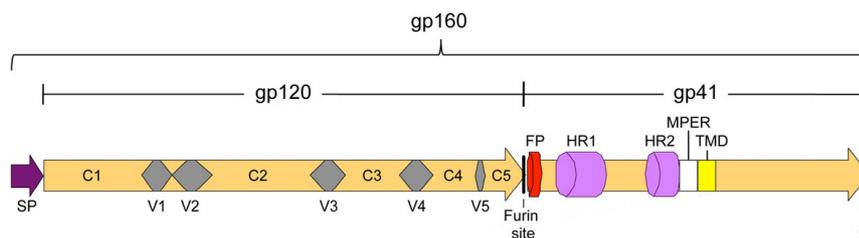


Imagen 7. Dominios de la glicoproteínas gp120 y gp41. Esta imagen está adaptada del trabajo de Checkley, Luttge y Freed (Checkley, Luttge, and Freed 2011).

Por otro lado, la glicoproteína gp41 consta de 345 aminoácidos organizados en 3 dominios principales (**Imagen 7**), altamente conservados: el dominio extracelular o “ectodominio”, un dominio transmembrana (TMD) y la cola citoplasmática (CT). El dominio extracelular, a su vez, contiene el péptido de fusión (FP) (la región N-terminal hidrófoba), un dominio rico en triptófano conocido como la región de membrana proximal-externa (MPER) y las regiones “hepta repetidas” HR1 y HR2, que han de interactuar para la formación del poro de fusión (Steckbeck et al. 2011; Checkley, Luttge, and Freed 2011). En este proceso, la región conocida como

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

péptido de fusión, que se encuentra internalizada en la estructura del complejo gp120/gp41, tras el contacto de gp120 con el receptor CD4 y su correceptor, es expuesta. A continuación se ha de formar una estructura entre dos trímeros de los motivos HR1, en el extremo N-terminal, que se insertará a la membrana plasmática de la célula huésped y HR2, en el extremo C-terminal, unido al virus. El plegamiento, en forma de horquilla, de estas dos estructuras triméricas, se traduce en la formación de un haz de 6 α -hélices (3 internas paralelas, correspondientes a HR1 y 3 externas, derivadas de HR2, situadas de manera antiparalela), que aproximará las membranas del virus y de la célula que está siendo infectada, permitiendo la formación del citado poro de fusión (**Imagen 8**). Cabe destacar que, se necesitará la agrupación de varias de estas estructuras para la formación de dicho poro de fusión (Gallo et al. 2003; Chan et al. 1997). Esta estructura no es exclusiva del VIH-1, habiéndose descrito también en otros virus con envoltura, como el virus influenza (Earp et al. 2005) o los paramixovirus como el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV)(Yu et al. 2002).

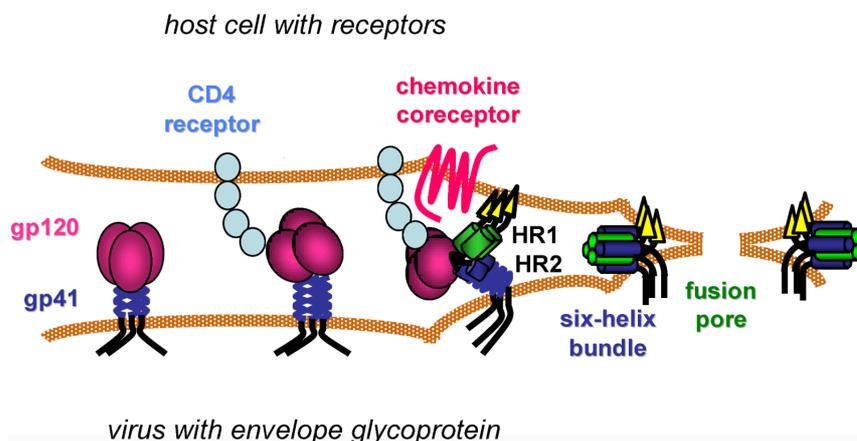


Imagen 8. Formación del poro de fusión en la entrada del virus VIH-1: En la ilustración se representan solo dos, de las numerosas estructuras de haces de 6 α -hélices que han de formarse para mediar la formación de dicho poro de fusión. Esta ilustración está adaptada del trabajo de De Feo y Weiss (De Feo and Weiss 2012).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.5. LOS RECEPTORES Y CORRECEPTORES CELULARES DEL VIH-1:

1.5.1. Descubrimiento y características:

Tal y como se ha adelantado previamente, la interacción de las proteínas de la envoltura viral del VIH-1 viene mediada por el receptor principal CD4 y por diversos correceptores, de los cuales, los principales serán CXCR4 y CCR5.

El receptor CD4 es una glicoproteína de 55 kDa, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se encuentra expresada en la superficie de diversas células del sistema inmune, en especial linfocitos T CD4⁺, pero también en monocitos, macrófagos, células dendríticas (como las células de Langerhans) y en la mayoría de los timocitos en desarrollo (Maddon et al. 1985; Crowe, Mills, and McGrath 1987). Posee una región extracelular con 4 dominios, con estructuras derivadas de las inmunoglobulinas, que se denominan D1-D4, aunque solo el D1 se podría considerar que sigue poseyendo una estructura de inmunoglobulina estricta, presentándose demasiado modificados, respecto a estas, los restantes 3 dominios (Clark et al. 1987; Wu, Kwong, and Hendrickson 1997). De estos dominios, se presentan como fundamentales para la unión con el complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) los dominios D1 y D2, unión que puede ser perjudicada por la proteína de la envuelta viral gp120, de manera que se vería afectada la diferenciación de los linfocitos y por ende la respuesta inmune (Clayton et al. 1989).

Otra región fundamental para las funciones de CD4 se encuentra en su cola citoplasmática, donde esta molécula se encuentra unida, de forma no covalente, a una tirosina quinasa de tipo Src, la llamada p56^{Lck}. Dicha unión propicia la co-asociación entre CD4 y el receptor de célula T (TcR), para interactuar, conjuntamente, con el mismo complejo formado por MHC-II y el antígeno que ha unido, dando así lugar al desarrollo y activación de los linfocitos T CD4⁺ (Xiong et al. 2001).

Ya hemos dicho del CD4 que es el receptor principal del VIH-1, pero la entrada del virus requiere de la mediación de un correceptor, para lo cual se han descrito ampliamente como principales los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5.

Los primeros indicios de que el CD4 no era el único receptor que necesitaba el virus VIH-1 para fusionar e ingresar en las células fueron encontrados en determinados estudios durante los años 80 donde, si se expresaban formas recombinantes de dicho receptor en diferentes líneas celulares humanas, se convertían en susceptibles de ser infectadas, pero cuando se introducía este receptor en células de ratón, la infección no tenía éxito, por lo que se intuía que la infección requería de moléculas adicionales, que no se encontraban en las células de dicho animal

Introducción

(Maddon et al. 1986). Además de esto, en los subsiguientes años, se pudieron recopilar numerosos estudios aportaban evidencias de la existencia de un marcado tropismo en diferentes aislados del virus, que podían infectar preferentemente líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ o bien macrófagos, así como la existencia de evolución o cambio en el tropismo predominante, en las cepas del virus aisladas, según qué fase de la enfermedad se estuviese evaluando, siendo las M-trópicas características de la fase asintomática y las T-trópicas de las fase donde el sistema inmune se empieza a ver comprometido y marcadamente más virulentas (revisado en (Miedema et al. 1994)).

Finalmente, tras años de búsqueda y sospechas, fue identificada una molécula llamada “fusina”, en un primer momento, mediante una estrategia que consistía en el análisis y expresión de una librería de ADN complementarios, provenientes de células permisivas para el VIH-1, hasta identificar el cofactor concreto que, siendo expresado en células no permisivas, permitía que se infectasen (Feng et al. 1996). Poco después se descubriría que esta molécula actuaba como receptor de la quimiocina SDF-1 (factor-1 derivado de células estromales) y sería rebautizada como CXCR4 (Bleul et al. 1996; Oberlin et al. 1996). Serían, por otro lado, los estudios realizados con diversas beta-quimiocinas, como RANTES (CCL5), las proteínas inflamatorias de macrófagos 1 α y 1 β (MIP-1 α y MIP-1 β o CCL3 y CCL4, según nomenclatura oficial internacional para las quimiocinas, respectivamente), donde se evaluaba su capacidad para inhibir la entrada viral (Cocchi et al. 1995) los que permitieron la asociación e identificación del receptor CCR5, como el otro correceptor del VIH-1 (Dragic et al. 1996; Alkhatib et al. 1996; Deng et al. 1996).

Se demostró, además, que el dominio hipervariable V3 de gp120 era el determinante para la interacción con estos receptores y la susceptibilidad de la envuelta a unirse a uno u otro de ellos, por lo tanto, diferencias en este dominio definían el tropismo del virus (Cocchi et al. 1996). Si bien, como apuntamos previamente, este tropismo del virus y la evolución del mismo durante la progresión de la enfermedad se había dilucidado veladamente, años antes de ser identificados los correceptores que mediaban en dicho fenómeno, pero posteriormente se describiría con más detalle la existencia de variantes X4 trópicas, R5 trópicas y aquellas dual-trópicas, que pueden usar tanto CXCR4 como CCR5, de manera que al inicio de la infección sería característica la predominancia de cepas R5 trópicas, las cuales, a medida que la enfermedad progresase, se irían expandiendo al uso de ambos receptores, para terminar emergiendo las cepas X4 trópicas, coincidiendo con un aumento de la carga viral y la depleción de los linfocitos T CD4⁺, fenómenos característicos de la entrada en la fase SIDA (Connor et al. 1997).

Más allá de los receptores y correceptores descubiertos para el VIH-1, numerosos estudios durante los años 90 describirían otros procesos de anclaje del virión a las

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

células permisivas, donde también el dominio hipervariable V3 de gp120 parecía manifestar gran importancia, que habrían de ocurrir, de manera obligatoria y anticipada a la unión de la envuelta al receptor CD4, pero que podrían ocurrir también, de manera independiente, en células CD4⁻ no permisivas, carentes del receptor principal, donde en principio, no tendría lugar la entrada ni la infección viral (Valenzuela et al. 1997).

La importancia de este anclaje se podría entender debido a que, en muchas ocasiones, determinadas células permisivas podrían expresar baja densidad de receptores de CD4, por lo que para la interacción del virión con este y sus correceptores, serían previamente necesarias las mencionada uniones o anclajes coordinados de las partículas virales con determinados componentes presentes en la membrana plasmática. Entre estos componentes se encuentran heparán sulfato proteoglicanos, que interaccionarían con gp120 (Ugolini, Mondor, and Sattentau 1999), así como la nucleolina, que a pesar de ser característica del nucléolo, parece encontrarse expresada en la membrana plasmática habitualmente (Callebaut et al. 1998; Nisole et al. 1999).

A pesar de que ya hemos dicho que el receptor CD4 es necesario para la exitosa entrada viral e infección, la infección ocurre en ocasiones, en determinadas células carentes de dicho receptor, por lo que otros mecanismos se han descrito, para los que el esfingolípido galactosil-ceramida (GalC) funcionaría como receptor alternativo del virus. Una de estas células, donde la importancia de esta molécula ha sido estudiada, serían la neuronas (Harouse et al. 1991), aunque cierta existe cierta discrepancia de opiniones entre diferentes autores de la materia, ya que a su vez, se han publicado estudios donde, parece que esta molécula podría no mediar en la infección de neuronas por el VIH-1, ya que el uso de anticuerpos contra la galactosil-ceramida, en líneas celulares de neuronas, no inhibía la infección por este virus (Alvarez Losada, Cantó-Nogués, and Muñoz-Fernández 2002; Hao et al. 1997). Sin embargo, en células epiteliales y como las de la mucosa del colon o vaginal, sí que parece esta molécula ser un mediador importante para la infección por el virus VIH-1, por lo que ha sido objeto de estudio para estrategias de diseño de vacunas contra el virus (Dennison et al. 2014).

Sea como fuere la interacción de gp120 con la galactosil-ceramida, ese mecanismo debe tener alguna relevancia por la gravedad de las manifestaciones neurológicas del virus y la importancia de la entrada en células epiteliales para la infección primaria.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

1.5.2. Señalización de los correceptores en la entrada viral: El fenómeno del “capping”:

Un evento que se ha descrito muy importante, para el éxito de la entrada viral del VIH-1, es la colocalización o acúmulo de los receptores y correceptores en una estructura de tipo pseudópodo, proceso conocido como “capping”, para lo cual, sería fundamental la reorganización del citoesqueleto de actina en la membrana plasmática, promovida por la interacción de gp120 con CD4 en primera instancia. La importancia para el virus de que se produjese este proceso quedaba demostrada cuando al añadir un inhibidor de la polimerización de la F-actina, como la citocalasina D, se bloqueaba la formación de esta estructura a la par que la entrada viral y la infección (Iyengar, Hildreth, and Schwartz 1998).

Diversos procesos y proteínas han sido descritos para tratar de dilucidar cuales son los puntos claves de este mecanismo. Ciertos eventos de señalización por parte de los correceptores del VIH-1, que son receptores de quimiocinas, parecen tener un papel en este proceso. En concreto, la señalización por parte de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ de CXCR4 da lugar a una cascada que implica la estimulación de las GTPasas de la familia Rho (Rac/Cdc42/RhoA), la subsiguiente activación de PAK (quinasa activada de p21) y en última instancia, la activación de LIMK, que produce la fosforilación de la cofilina (Wu and Yoder 2009). Esta fosforilación de la cofilina supondrá la inactivación de su capacidad despolimerizante de la actina, por lo tanto, su estabilización. En primera instancia, investigadores describieron que gp120 parecía, sin embargo interferir en este proceso y como consecuencia, dar lugar a la defosforilación y activación de la cofilina en linfocitos T CD4⁺ latentes. Esto daría lugar a la despolimerización de la actina y permitiría la dinámica de citoesqueleto necesaria para la infección en estos linfocitos T CD4⁺ en reposo, donde inicialmente esta proteína se encontraría de hecho inactivada de manera normal, estabilizando la F-actina y suponiendo una barrera a la infección. Estos investigadores también describieron que, sin embargo, en los linfocitos T CD4⁺ activos, la cofilina activa se encontraría predominando de manera suficiente para asegurar esta dinámica de citoesqueleto y que la mediación de la envuelta del virus con CXCR4 no sea fundamental para la infección (Yoder et al. 2008). Cabe decir que, aunque estos investigadores observaban principalmente la activación del factor despolimerizante de actina, cofilina, apuntaban que se observaba un breve evento de polimerización de la actina en el primer minuto del contacto. Este evento sería explicado con más detalle en investigaciones posteriores, donde se demostró que, realmente, en un primer momento, era necesaria de hecho una inactivación vía fosforilación de la cofilina, mediada por la activación de la previamente mencionada LIMK, como resultado de la señalización de gp120 sobre CXCR4 (Vorster et al. 2011).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

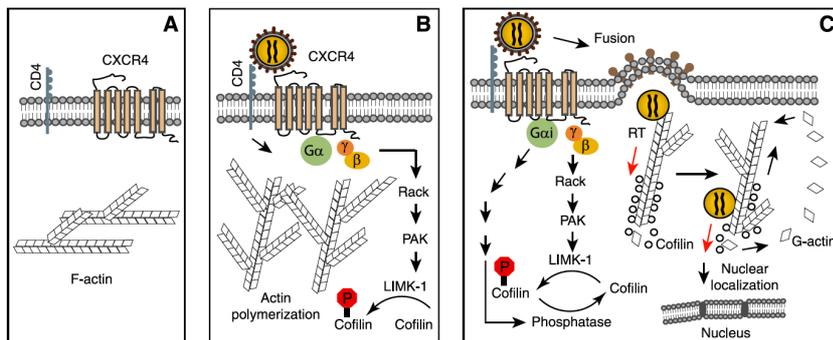


Imagen 9. Modelo de la regulación dinámica del citoesqueleto de actina, mediada por la señalización de la envuelta sobre CXCR4, a través de LIMK1 y cofilina, en la infección por VIH-1. (A) Linfocitos T CD4⁺ en reposo la cofilina está inactiva y la dinámica de la actina permanece relativamente estática. **(B)** Inicialmente, la señalización a través de la subunidad G_{βγ} de CXCR4 promueve la inactivación, por fosforilación, de la cofilina, estabilizando el citoesqueleto y permitiendo la interacción del virus con sus receptores. **(C)** Posteriormente la señalización, a través de G_{αi}, para la activación de la cofilina, despolimerizará la actina, promoviendo la dinámica de citoesqueleto necesaria para los procesos post-entrada viral. Este modelo y su ilustración pertenecen al trabajo de Vorster y colaboradores (Vorster et al. 2011)

Sería descrito, también, que la proteína filamina-A, la cual regula la cascada previamente citada, RhoA-ROCK-LIMK, que da lugar a la inactivación por fosforilación de la cofilina, además funciona como un adaptador entre los receptores y correceptores de VIH-1, con el citoesqueleto de actina, permitiendo así su localización en polo donde se formará el “capping” (Jiménez-Baranda et al. 2007).

Se demostraría que intervenían también en este proceso de entrada viral las proteínas ERM, es decir ezrina/radixina/moesina, donde la señalización de gp120 sobre el receptor CD4 desencadenarían la fosforilación de la ezrina y la moesina, por ende activándolas, en linfocitos T y, la moesina, a su vez, sería necesaria para la reorganización y anclaje de la F-actina en la membrana plasmática y la agregación de receptores y correceptores en la estructura del “capping” (Barrero-Villar et al. 2009). Paradójicamente, en los procesos posteriores a la formación del poro de fusión, la moesina parece suponer una barrera contra la dinámica de citoesqueleto que necesita el virus para la retrotranscripción, por su actividad de desestabilización de microtúbulos (Naghavi et al. 2007) y se ha descrito que en general, su silenciamiento in vitro, promueve un aumento de la replicación del virus (Capalbo et al. 2011). Por desgracia esta dualidad de funciones de la moesina, en la infección del VIH-1, sigue sin estar resuelta hoy en día.

La última proteína celular encontrada hasta la fecha formando parte de este proceso de formación del “capping” es la gelsolina, una proteína que es capaz de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguilar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

cortar filamentos actina (Selden et al. 1998; Lu et al. 1997), contribuyendo así a la dinámica de citoesqueleto. Se describió que, una perfectamente calibrada actividad de esta proteína era requerida en el proceso de entrada viral donde, tanto una sobreexpresión exógena como un silenciamiento de la gelsolina endógena, producían una perturbación de la dinámica de la F-actina hacia la membrana plasmática e impedían la entrada mediada por Env del virus VIH-1 (García-Expósito et al. 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.6. LA INFECCIÓN DEL VIH-1: ENFERMEDAD Y FENOTIPOS CLÍNICOS:

1.6.1. Desarrollo de la enfermedad por el virus VIH-1:

No se podrían desarrollar las diferentes formas en las que se manifiesta el virus VIH-1, en los distintos grupos de pacientes, sin antes hacer al menos una breve explicación de cuál sería el desarrollo esperado del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida, una vez el virus logre entrar en el ser humano.

Respecto a las rutas de transmisión del VIH-1, si bien, la vía sexual no es la más eficiente, sí que resulta la vía más frecuente y se estima que, debido a esto, contribuye aproximadamente al 70 % de las infecciones mundiales, en concreto, a través de relaciones heterosexuales, seguida de las relaciones entre MSM (siglas en inglés de "Hombres que tienen sexo con otros hombres"), la derivada del uso de drogas intravenosas y la infección vertical de madre a hijo (revisado en (Shaw and Hunter 2012)). Aparte de la vía, el éxito de transmisión del virus dependerá mucho de la carga viral del donante, además de la integridad de la mucosa en contacto, donde ulceraciones genitales y presencia de enfermedades de transmisión sexual aumentarán enormemente la probabilidad de contagio (Gray et al. 2001; Wawer et al. 2005). Es debido a esto que, la etapa aguda inicial de la infección, caracterizada por una elevada carga viral, se asocia con una potenciada capacidad de transmisión (Pilcher et al. 2004; Volz et al. 2013) y que un correcto mantenimiento de la terapia antirretroviral, permitiendo mantener niveles de virus indetectables en suero, reduce enormemente la probabilidad de contagio (Melo et al. 2019).

Inicialmente, tras el contacto con las mucosas, puede ocurrir la trans-infección del virus, donde desde células APC (presentadoras de antígeno), escasamente susceptibles a la infección, como células dendríticas o macrófagos, puede ser transportado a las células diana, como los linfocitos T CD4⁺ o las células de Langerhans (Rinaldo 2013). Además, se ha descrito extensamente que, en el inicio de la infección, se produce un fenómeno de cuello de botella, donde solo un limitado número de virus fundadores, normalmente relacionados con el linaje predominante en la cuasiespecie del donante, darán lugar a la infección en el nuevo hospedador, siendo además predominantes, en esta fase inicial, las cepas virales que utilicen preferentemente el correceptor CCR5 (revisado en (Kariuki et al. 2017)).

En general, desde el punto de vista clínico, se acepta que la enfermedad causada por el virus VIH-1 puede presentar 3 fases: Fase aguda, fase intermedia o de latencia y fase final, tardía o fase SIDA. **(Imagen 10)**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

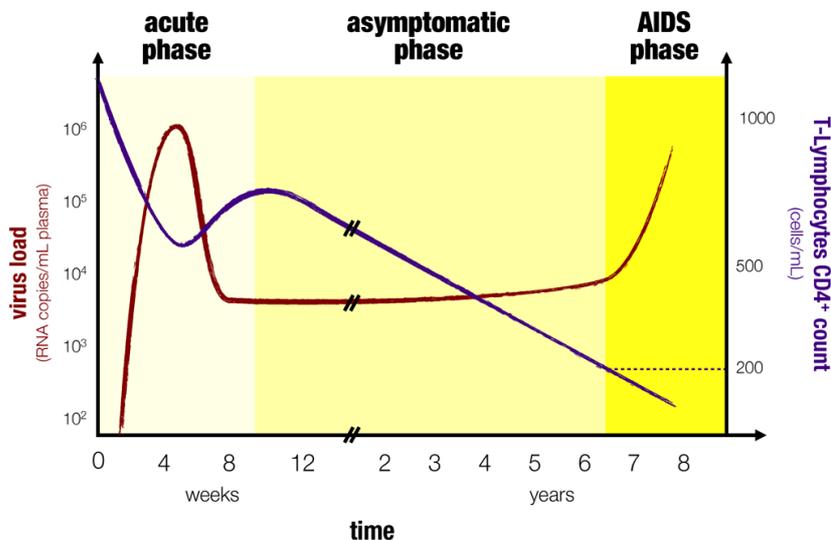


Imagen 10. Estadios clínicos de la infección por el virus VIH-1. Modelo esquemático de la variación de carga viral (copias de ARN viral/mL de plasma) frente al recuento de linfocitos T CD4⁺ (células/mL de sangre), a lo largo de las 3 fases principales de la enfermedad. Esta imagen está adaptada del trabajo de Alizon y Magnus (Alizon and Magnus 2012).

Durante la fase aguda, el virus se replica en mucosa y submucosa y de ahí, a los pocos días convergerá en el sistema linfoide, especialmente en el GALT (en inglés, “gut-associated lymphoid tissue”), el tejido linfoide asociado al intestino, donde se producirá una importante depleción de linfocitos T CD4⁺ (Veazey et al. 1998). Es en esta fase en la que se estima que se establecerían los reservorios virales, que permitirán al virus permanecer integrado en células latentes, de manera estable, transmitiéndose directamente de célula a célula, escapando así a la terapia antiretroviral y resurgiendo de manera competente, tras el cese de esta. Dichos reservorios son aún poco conocidos, pero se cree que, anatómicamente, estarían situados en células del mencionado GALT, sistema nervioso central, tracto genital y otros órganos linfoides (Mzingwane and Tiemessen 2017; Vanhamel, Bruggemans, and Debyser 2019).

El virus está activamente replicando en esta primera fase, tanto que el ARN viral podría ser detectado tras 11 o 12 días, normalmente en niveles superiores a 100.000 copias/mL en sangre, siendo este análisis el más eficaz para la detección temprana de la infección en fase aguda, hasta que se produzca la seroconversión (Chu and Selwyn 2010). Es posible que en esta fase el individuo permanezca asintomático, pero, en un porcentaje, que se ha estimado, entre el 40 y el 90% de los infectados (revisado en (Kahn and Walker 1998)), puede presentarse el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

conocido como “Síndrome retroviral agudo”, el cual fue descrito por primera vez en 1985, como una enfermedad similar a una mononucleosis infecciosa, que aparecía repentinamente tras una semana del posible evento de infección y de una duración de entre 3 y 14 días. Se presentaba clínicamente con fiebre, anorexia, malestar general, linfadenopatía, náuseas y erupción macular (Cooper et al. 1985). De hecho, estas manifestaciones cutáneas como úlceras mucocutáneas, la aparición de “rash cutáneo” y de numerosas máculas rojas en cara, tórax e incluso manos y pies, se consideran signos especialmente reveladores y específicos para este síndrome, de cara a la detección temprana del virus (revisado en (Lapins et al. 1997)). Esta sintomatología aguda inicial sería el resultado de la tormenta de citoquinas, inducida por la elevada carga viral, que se activará en el inicio de la infección, donde rápidamente se liberarán altos niveles de IFN- α , TNF- α , IL-15, IP-10 (proteína 10 inducida por interferón) y más lentamente otras muchas citoquinas, produciendo, por un lado, destrucción masiva de linfocitos T CD4⁺, tanto infectados como no infectados y finalmente activación de células NK y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, que supondrán la mejoría de la sintomatología y el descenso de la carga viral y la seroconversión (Stacey et al. 2009). Este punto, a partir del cual la alta carga viral desciende y se estabiliza, se conoce como “set point viral (SPVL)” y se ha descrito que, el tiempo que tarde el paciente en alcanzarlo puede variar entre 30 y 90 días, considerándose, además, este tiempo, un indicador importante de la progresión de la enfermedad (Huang et al. 2012; Robb et al. 2016).

A partir de este punto, los individuos infectados entrarían en un periodo variable, aparentemente asintomático, durante el cual se lleva a cabo una continua lucha entre el virus y el sistema inmune, manteniendo a este en un continuo ciclo de activación y fallo, que terminará agotándolo y llevándolo a la etapa de inmunodeficiencia, donde los niveles de linfocitos T CD4⁺ que se pierden, no logran ser reemplazados (revisado en (Ford, Puronen, and Sereti 2009)).

Finalmente, de manera natural, en ausencia de tratamiento, los niveles de linfocitos T CD4⁺ irían decayendo en aproximadamente 50 u 80 células/ μ L cada año, acelerándose tras caer por debajo de las 200 células/ μ L, momento en el que el individuo habría entrado en la fase SIDA, con una severa inmunodeficiencia, en la cual aparecerían las enfermedades características de dicha fase tardía, entre las cuales se encuentran infecciones oportunistas como pericarditis por *Mycobacterium tuberculosis*, VHS oral recurrente, infecciones gastrointestinales producidas por *Candida esophagitis* o *Cryptosporidium*, además de enfermedades oncológicas no infecciosas como el sarcoma de Kaposi o el Linfoma no-Hodgkin (revisado en (Waymack and Sundareshan 2020)).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.6.2. Definiciones clínicas del control de la enfermedad:

El análisis de la progresión de la enfermedad mediante las diferencias en el tiempo de duración de la fase crónica y la entrada o no en la fase tardía, permite definir los diferentes fenotipos virales clínicos y clasificar a los pacientes en diferentes grupos.

No sería hasta principios de los 90, que había transcurrido el tiempo suficiente, desde la descripción de los primeros infectados, clínicamente documentados, de VIH-1, para empezar a identificar perfiles de evolución de la enfermedad sin progresión inmunológica, prolongada en el tiempo, por más de 10 años. Se definiría entonces estos casos, que representaban tan solo el 8% del total, como infecciones a largo plazo (en inglés, "long-term HIV-1 infection"), que se caracterizaban por presentar niveles estables de linfocitos T CD4⁺ y un perfil inmunológico y clínico sano, sin haber usado terapia antiretroviral. En general, estos pacientes, también presentaban, niveles elevados de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Buchbinder et al. 1994).

A partir de aquí, los subsiguientes años de estudio, de diferentes grupos de pacientes, que manifestaban perfiles variados de evolución clínica, con criterios para identificarlos y describirlos heterogéneos, dieron lugar a una elevada cantidad de identificaciones de perfiles, con más de 700 definiciones diferentes, de también elevada heterogeneidad. Esto dificultaba enormemente el estudio de los factores biológicos que motivaban dichos perfiles clínicos, por lo que resultaba apremiante la armonización de dichas definiciones, en base a características comunes en el perfil de progresión y el control viral (revisado en (Gurdasani et al. 2014)).

Personalmente, ante la notable disparidad en la terminología, que sigue existiendo hoy en día, me parece acertado y adecuado seguir el criterio que proponen los autores del artículo (Casado et al. 2010). En dicho artículo, se evalúa la proporción en la que, diferentes factores genéticos del hospedador y del virus, aparecen entre los diferentes grupos de pacientes patrones determinados de progresión clínica y se establece una clasificación estandarizada de definiciones clínicas para estos grupos, de manera que se llega a 3 perfiles de progresión clínica y en total a 5 grupos principales de pacientes:

- LTNP (en inglés, "Long term non-progressors"): No progresores a largo plazo o progresores lentos, serán aquellos individuos infectados que, sin terapia antirretroviral, permanecerán asintomáticos por un periodo superior a 10 años, tras la seroconversión. Dentro de este perfil se subdividirían los siguientes grupos:
 - LTNP-EC (en inglés, "Elite controllers"): Los llamados controladores de élite, serán aquellos que presenten además carga viral indetectable (<50

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

- copias/mL). Podrían presentar episodios aislados, no consecutivos y minoritarios de viremia <1000 copias/mL.
- LTNP-VC (en inglés, “Viremic controllers”): Los controladores virémicos, serán individuos, no progresores, que presenten carga viral de hasta 2000 copias/mL. Dicha viremia podría superarse, siempre que sea de manera limitada y no consecutiva, en un número minoritario de análisis.
 - LTNP-NC (en inglés, “Viremic non controllers”): Virémicos no controladores, serán aquellos pacientes, no progresores, que presenten una carga viral >2000 copias/mL en más del 50% de los controles que se les realizasen.
- P (en inglés, “Chronic progressors”): Progresores crónicos o progresores típicos, serán los pacientes que desarrollen síntomas tardíos de la enfermedad antes del transcurso de 10 años, desde la seroconversión. También se incluirá en este grupo a los pacientes con control farmacológico antirretroviral. Estos pacientes presentarían un valor de SPVL >2000 copias/mL, en ausencia de terapia.
 - RP (en inglés, “Rapid progressors”): Los progresores rápidos serán aquellos que evolucionen a la fase tardía o fase SIDA de la enfermedad, en un periodo comprendido dentro de los 3 años tras la seroconversión, presentando contajes de linfocitos T CD4+ <350. Se incluirán en este grupo tanto aquellos pacientes que inicien la terapia, tras esta evolución rápida, como aquellos que fallezcan por SIDA en este periodo inicial de 3 años.

1.6.3. Características celulares y virales asociadas a los LTNP

No es de extrañar que los pacientes LTNP, por su extraordinario control de la enfermedad y a pesar de su escasa frecuencia, hayan despertado, durante años, el interés de los investigadores, en el estudio de los caracteres que condicionarían estos perfiles clínicos de control, para un mayor entendimiento de la interacción entre el virus VIH-1 y el sistema inmune del huésped.

La mayoría de investigaciones, hasta la fecha, se han centrado en factores genéticos del hospedador. Numerosos estudios han descrito como, determinados alelos del HLA de clase I, se asocian, con notable frecuencia, a los perfiles de progresión lenta de la enfermedad siendo el *HLA-B27*, uno de los alelos que más frecuentemente aparece en este tipo de perfiles, pudiéndose deducir, un efecto protector contra el VIH-1 de este (Kaslow et al. 1996). En un estudio que buscaba posibles vacunas en 1988, ya se había descrito que los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocían una secuencia de p24 Gag, a través de *HLA-B27* (Nixon et al. 1988). Sin embargo, posteriormente, se describió como el virus, mediante selección natural, acababa sobrepasando esta barrera y escapando a la respuesta CTL, que hubiese inducido la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

lenta progresión del virus. Mutaciones puntuales de aminoácidos, en la región denominada KK10 de p24 Gag, resultarán en una pobre capacidad de unión de HLA-B27 a dicha región, desembocando en una pérdida del control de la enfermedad (Kelleher et al. 2001; Feeney et al. 2004).

Asimismo, los alelos *HLA-B57* y el íntimamente relacionado *HLA-B5801*, también se han encontrado frecuentemente relacionados con los perfiles de progresión lenta y asociados a la acción de los CTL sobre p24 Gag. (Kaslow et al. 1996; Migueles et al. 2000; Goulder et al. 1996). Al igual que ocurre con *HLA-B27*, el virus tratará de escapar del reconocimiento de *HLA-B57* y *HLA-B5801*, mediante mutaciones en el epítipo TW10 (Gag240-249), pero curiosamente, en este caso, esas mutaciones llevarán consigo una pérdida de la capacidad replicativa del virus, que conducirá a un control de la enfermedad prolongado en el tiempo (Martinez-Picado et al. 2006; Navis et al. 2007). A su vez, un estudio también describió como algunas de estas mutaciones, no solo producirían un detrimento en la capacidad replicativa del virus, sino que, además, podrían implicar una potente respuesta específica, hacia estas variantes, por parte de linfocitos T CD8⁺, aun por identificar (Miura et al. 2009).

Otro factor protector que se ha descrito, relacionado con HLA, es la homocigosidad del alelo que presenta el epítipo HLA-Bw4. Dicho motivo, a diferencia la variante HLA-Bw6, funciona como ligando de los receptores tipo inmunoglobulina células NK (KIR) y parecía estar asociado al control de la enfermedad en la cohorte de individuos objeto del estudio (Flores-Villanueva et al. 2001). Poco después, se describió que, la homocigosidad de *HLA-Bw4* solamente aparecía asociada a perfiles no progresores, cuando se daba también la presencia del alelo *KIR3DS1*, que codifica un KIR activador de NK. Es decir, el efecto protector y asociado a perfiles LTNP, dependía completamente de la epistasis entre *KIR3DS1* y *HLA-Bw4* (Martin et al. 2002).

Aunque el gen *HLA-B* ha sido el foco de atención primario en la búsqueda de factores diferenciales presentes en los individuos LTNP, se han asociado también algunas variantes presentes en otros genes de *HLA* con los estos perfiles de progresión. Se describió, en un estudio que analizaba la presencia de variantes alélicas de *HLA*, con ciertos polimorfismos de nucleótido único (SNP), en una cohorte de pacientes, que las variantes *HLA-C rs9264942* y *HCP5 (complejo p5 del HLA) rs2395029* se asociaban significativamente con una progresión tardía de la enfermedad y una menor SPVL (van Manen et al. 2009). Más aun, se ha descrito como el dimorfismo -35C del gen *HLA-C*, se puede relacionar con una baja carga viral y un mejor control al inicio de la infección, que podría extenderse a la fase crónica, permitiendo una progresión más lenta, aunque parece que el efecto, en este caso, es más discreto que el descrito para las variantes, previamente explicadas, de *HLA-B* (Thomas et al. 2009).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

No obstante, se han identificado variantes alélicas de HLA clase I, lejos de conferir protección contra el VIH-1, parecen asociarse especialmente a perfiles de progresión rápida de la enfermedad, como los alelos *HLA-B35* y *HLA-Cw04* (Carrington et al. 1999). Asimismo, algunas variantes alélicas de *HLA-DR13* perteneciente al HLA de clase II, se han descrito asociadas a perfiles no progresores (Chen et al. 1997) y a un mejor pronóstico y respuesta bajo tratamiento antirretroviral (Malhotra et al. 2001).

Otro importante factor del hospedador, relacionado con la resistencia a la infección y la progresión de la enfermedad, que, de hecho, es uno de los más extensamente estudiados, es una delección de 32 pares de bases en el gen del receptor de quimiocinas y correceptor del VIH-1, *CCR5*, conocida como *CCR5-Δ32*. Esta condición se describió, por primera, en dos individuos que, pese a haberse visto expuestos múltiples ocasiones al virus VIH-1, no se habían infectado. Se encontró que estos individuos eran homocigotos para este defecto en el gen *CCR5*, lo que producía la expresión de una proteína severamente truncada y una ausencia, por lo tanto, del receptor *CCR5* en la superficie de sus linfocitos T CD4⁺, pero que sin embargo, no parecía conllevar más deficiencias o manifestaciones para sus portadores. Se comprobó, además, que los linfocitos T CD4⁺ de estos individuos, si bien resistentes in vitro a virus M-trópicos (virus R5-trópicos), eran susceptibles a la infección de los virus T-trópicos (virus X4 trópicos), ya que esta condición, no afectaba en absoluto al correceptor *CXCR4* (Liu et al. 1996).

En efecto, poco después de este artículo, empezaron a identificarse puntuales casos de pacientes infectados que presentaban la homocigosis de *CCR5-Δ32*, por lo que, si bien esta condición genética reducía enormemente la posibilidad de infectarse, no confería absoluta protección frente al virus. Estos individuos poseían virus que usaban exclusivamente el correceptor *CXCR4* y un fenotipo clínico que se caracterizaba por rápida disminución de los linfocitos T CD4⁺, pero no presentaban altas cargas virales, ni progresión rápida de la enfermedad (Sheppard et al. 2002). Hasta la fecha, la identificación de pacientes infectados por VIH-1, homocigotos para esta delección, ha sido muy escasa, con solo 18 casos descritos, con infecciones producidas por virus con tropismo por *CXCR4* o bien tropismo dual X4/R5 y un único caso donde se identificó el inusual tropismo por el correceptor alternativo *CXCR6* (revisado en (Smoleń-Dzirba et al. 2017)).

Por otro lado, si bien la presencia de un solo alelo con esta mutación no parece disminuir la susceptibilidad a la infección (Liu, Kong, et al. 2012), sí que se ha descrito que los pacientes infectados heterocigotos para *CCR5-Δ32* presentan, con significativa frecuencia, una mayor supervivencia y perfiles de LTNP (Eugen-Olsen et al. 1997; Stewart et al. 1997; Ruiz-Mateos et al. 2018)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

No obstante, la presencia de este alelo parece estar bastante restringida a poblaciones europeas, decayendo su frecuencia de norte a sudeste y mostrándose prácticamente ausente en poblaciones indígenas de África, Asia y América del Sur (Solloch et al. 2017; Martinson et al. 1997).

Es de notable importancia que, el conocimiento sobre la protección que aporta esta mutación, ha permitido el gran hito de la cura de dos pacientes infectados, hasta la fecha. Estos casos son conocidos como, “paciente de Berlín”, cuya comunicación mundial data de 2009 y el “paciente de Londres”, que se comunicó preliminarmente en 2019 y se confirmó en marzo de 2020, tras 30 meses sin reaparición del virus, tras abandonar la terapia antirretroviral. El enfoque fue similar en ambos casos, donde los pacientes presentaban leucemia mieloide aguda y linfoma de Hodgkin, respectivamente, por lo que se les sometió a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, donde el donante compatible, era además homocigoto *CCR5-Δ32*. Se mantuvo terapia antirretroviral antes y después de los trasplantes, que al ser retirada meses después no supuso la reaparición del virus, pudiéndose deducir que durante el trasplante se habían eliminado los reservorios de los pacientes, a la vez que se mantenía indetectable la carga viral. Si bien en el primer caso, el “paciente de Berlín” era originariamente heterocigoto para *CCR5-Δ32*, el “paciente de Londres” era homocigoto la forma “wild-type” de *CCR5*. Más aun, el procedimiento al que se sometió el paciente de Londres fue mucho menos agresivo y tóxico que el de su predecesor (Hütter et al. 2009; Gupta et al. 2019; Gupta et al. 2020). Por desgracia se han realizado numerosos intentos, sin éxito de replicar estos resultados, ya sea por reaparición del virus tras la remisión de la terapia antirretroviral o rechazo del trasplante con resultados letales en algunos casos. Es evidente que la complejidad y los riesgos, que conlleva esta terapia, hace inviable su aplicación sobre pacientes infectados, que no presenten este tipo de cánceres y aun, en ese caso, discutible su uso, dado su bajo porcentaje de éxito, hasta que no se diluciden más los mecanismos que influyen en el proceso (revisado en (Kuritzkes 2016)). No obstante, cabe mencionar el último intento prometedor de curación mediante esta estrategia, el caso del “paciente de Düsseldorf”, que si bien aún no ha sido declarado como oficialmente curado, sus resultados hasta la fecha son compatibles con dicha curación, tras el último informe del mismo, presentado en el CROI (Conferencia de retrovirus e infecciones oportunistas) de 2020, donde se anunció la ausencia de rebrotes virales, pasados 83 meses del trasplante y tras 14 meses de interrupción de la terapia antirretroviral (Bjoern-Erik O. Jensen 2020)

Cabe destacar, que si bien, en un inicio se pensó que la homocigosidad de *CCR5-Δ32* no traía consigo mayor perjuicio, se ha descrito como esta condición implica una mayor gravedad y mortalidad en caso de infección por el Virus del Nilo Occidental (WNV) (Glass et al. 2006), así como, parece predisponer a una mayor fatalidad en infecciones por el virus Influenza (Falcon et al. 2015) y recientemente, se ha descrito una alta correlación positiva, de *CCR5-Δ32*, con la infección y muerte

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

causada por el Coronavirus de tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) (Panda, Padhi, and Prusty 2020), actualmente pandémico y causante de la Enfermedad por el Coronavirus de 2019 (Zhu et al. 2020; Wang et al. 2020).

Asimismo, otras variantes de este receptor, se han identificado, con influencia sobre la infección por el VIH-1, como por ejemplo una delección de 24 pares de bases bautizada como *CCR5-Δ24*. Encontrada en cohortes africanas, solo se han encontrado individuos heterocigotos para este alelo y presenta especial prevalencia en grupos de pacientes no progresores e individuos altamente expuestos no infectados (Arendt et al. 2019).

No solo se han relacionado factores genéticos del hospedador con los perfiles de progresión lenta, sino que se han descrito, también, aunque en mucha menor medida, modificaciones en genes virales, cuando se han estudiado los virus procedentes de cohortes de pacientes LTNP. En concreto, en 1995 se publicó un estudio que analizaba los virus procedentes de 8 pacientes de una cohorte de individuos infectados por transfusión de sangre, procedente, en este caso, de un mismo donante, conocida como la “cohorte del Banco de Sangre Sídney”. Estos pacientes habían controlado la enfermedad y presentaban contajes de linfocitos CD4⁺ estables, por más de 10 años. Se encontró que los virus de estos pacientes presentaban similares delecciones en el gen *nef* y en la región de solapamiento de *nef-LTR*, sin que se encontrasen más anomalías en dichos genomas virales, por lo que se relacionaron defectos en estas regiones con perfiles de LTNP (Deacon et al. 1995). No obstante, 4 años más tarde, se reportó que solo 5 de estos pacientes sobrevivían, de los cuales, solo 3 conservaban niveles estables de linfocitos y carga viral indetectable (Learmont et al. 1999). Posteriormente, se describió que uno de estos 3 pacientes controladores poseía además reconocidos factores protectores del hospedador como eran la heterocigosidad *CCR5-Δ32*, y los alelos *HLA-B57* y *HLA-DR13*. Pese a que ningún factor similar se pudo encontrar en los 2 pacientes restantes, este artículo defendía la importancia de la combinación de factores genéticos y del virus, frente a características protectoras aisladas, para los perfiles de control de la enfermedad (Zaunders, Dyer, and Churchill 2011). Este mismo enfoque, donde el perfil de pacientes LTNP estudiados, se asocia a una combinación de defectos del virus y factores protectores del hospedador, ha sido defendido en más ocasiones (Sandónis et al. 2009; Casado et al. 2013).

Se han identificado, también, deficiencias del gen *env* que podrían asociarse al perfil LTNP. En 2006, un estudio que analizaba el genoma completo de un paciente con características de LTNP-EC, por más de 20 años, descubrió que presentaba importantes delecciones en el gen *env*, que abarcaban todos los dominios variables de gp120 y el dominio citoplasmático de gp41. Dichas alteraciones de *env*, podrían explicar por si solas el perfil de controlador del paciente, pero curiosamente, también se encontraron importantes defectos que afectaban al gen *nef*. Los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

investigadores explicaban el caso, de manera que, defectos que, inicialmente, presentarían los virus del paciente en *nef*, habían afectado a su capacidad de “down-regulation” sobre MHC-I, permitiendo así la eliminación de virus con Env funcionales, lo que, progresivamente, había inducido a la selección de virus con el gen *env* defectuoso (Calugi et al. 2006).

Posteriormente, otro grupo de investigadores identificó que, los genes *env* de los virus extraídos de una cohorte de 7 pacientes, que presentaban características de LTNP-EC (en el artículo utilizan el término ES (en inglés, “elite suppressors”)), presentaba baja diversidad genética y que además las Env que codificaban, exhibían una menor eficiencia mediando la entrada viral y en el uso de CD4 y CCR5, con respecto a controles procedentes de pacientes crónicos (Lassen et al. 2009).

Además, recientemente se ha descrito el caso de un paciente controlador de elite que presentaba una modificación inusual en *env*, la cual le confería un dominio variable V1 extraordinariamente largo. En este caso, aunque el virus original parecía ser infectivo in vitro, la sustitución de este dominio V1 en virus de laboratorio disminuía enormemente la infectividad de estos. Los investigadores describían que, esta modificación había sido seleccionada en el paciente debido a que, este dominio V1, confería resistencia frente a anticuerpos altamente neutralizantes, pero que de alguna manera, aun por dilucidar, podría haber supuesto la atenuación de la capacidad infectiva de los virus del paciente (Silver et al. 2019).

Por último, cabe destacar que en contadas ocasiones, analizando el gen *vif* de pacientes LTNP, se han encontrado ciertas mutaciones que afectaban a su distribución celular, mediando una localización nuclear, en lugar de citoplasmática, que por lo tanto, teóricamente, impediría su interacción con APOBEC3G y haría que dichos virus presentaran reducida capacidad replicativa e infectividad, en concordancia con el perfil de progresión de la enfermedad de dichos pacientes (Farrow et al. 2005; Cruz et al. 2013). Más tarde, se identificaron también otros virus que presentaban, directamente, mutaciones de Vif en dominios de interacción con APOBEC3G, en individuos infectados por vía perinatal y, sin progresión de la enfermedad, en ausencia de tratamiento, por más de 8 años (De Maio et al. 2012).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

1.7. LA ENZIMA HDAC6: UN FACTOR DE RESTRICCIÓN DE CRECIENTE IMPORTANCIA:

1.7.1. Breve introducción a los factores de restricción:

Las células infectadas por cualquier virus, expresarán diversas proteínas para tratar de contrarrestar al virus, como un mecanismo de defensa inicial de la inmunidad intrínseca, dichas proteínas son conocidas como factores de restricción. En el caso del VIH-1, las proteínas accesorias se habían investigado extensamente durante los años 90 y se sabía que tenían un papel fundamental en la infectividad del virus. Con la identificación de los factores de restricción se pudo entender que, una función muy importante, de estas proteínas accesorias, era la de contrarrestar estos factores de restricción, razón por la cual, células humanas que en su ausencia resultarían no permisivas para el virus VIH-1, podían infectarse con éxito (revisado en (Malim and Bieniasz 2012)). Hasta la fecha, los factores de restricción contra el VIH-1 mejor identificados en su mecanismo de acción y en la forma de ser contrarrestados por el virus son APOBEC3G, Teterina/BST-2, TRIM5 α , SERINC3/SERINC5, los cuales son brevemente explicados previamente en esta tesis, en los apartados referidos a la proteínas del virus con las que interaccionan y que contrarrestan su función (Vif, Vpu, CA y Nef, respectivamente). Aunque continuamente se postulan proteínas celulares con posible actividad de factor de restricción, para aceptarlas como tal, es necesario describir el mecanismo, mediante el cual, el VIH-1 evade o contrarresta su acción antiviral (revisado en (Zotova et al. 2019)). Sin embargo, como ya se ha explicado en el desarrollo de esta introducción, recientemente, nuestro equipo de investigación describió el papel como la enzima HDAC6 impedía la acción de Vif sobre APOBEC3 (Valera et al. 2015), así como también, el mecanismo de contrarrestar esta acción antiviral de HDAC6 que usaba el virus, mediante la proteína accesorio Nef, que mediaba la degradación endosomal-lisosomal de HDAC6, permitiendo así que esta enzima se sumase al importante grupo de los factores de restricción (Marrero-Hernandez et al. 2019).

1.7.2. La enzima HDAC6:

La enzima Histona Desacetilasa 6 o HDAC6 fue identificada, en un primer momento en ratones, cuando se buscaba en eucariotas superiores, genes homólogos a histonas desacetilasas de levaduras, dado que el dominio catalítico de las HDAC (Histona Desacetilasas) descubiertas hasta el momento, presentaba homología con una proteína de levaduras, llamada Rpd3 (en inglés, "Reduced potassium dependency 3") (Taunton, Hassig, and Schreiber 1996). Sin embargo, en este nuevo estudio, se describían dos nuevas enzimas de ratón, entre las cuales estaba la denominada, en ese momento, mHDA2 ("murine HDA2"), que mostraban

50

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

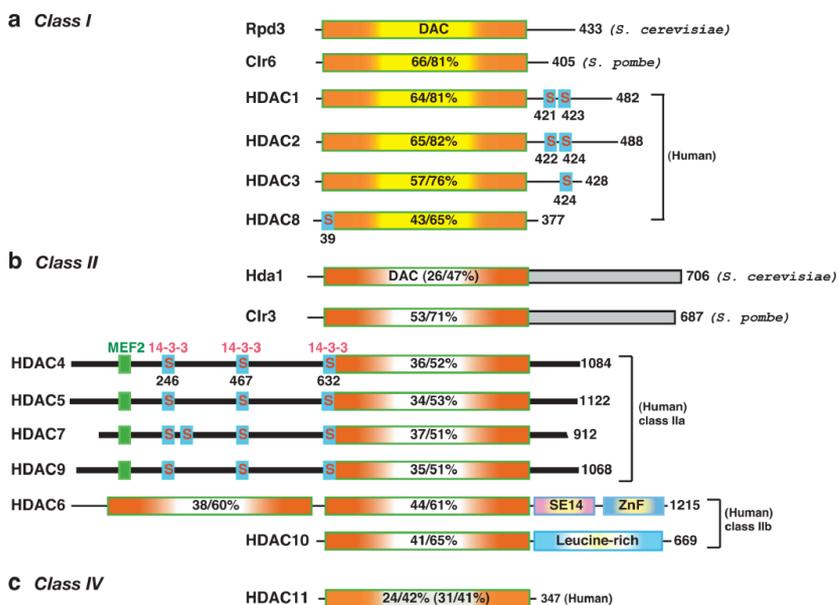
Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

homología por HDA1, otra proteína con actividad histona desacetilasa de estos hongos (Verdel and Khochbin 1999). Meses después, se publicaría como, siguiendo una estrategia similar en humanos, se identificarían HDAC4, HDAC5 y HDAC6, que se clasificarían, por entonces, como las enzimas HDAC de clase II. HDAC6 era, en efecto, el homólogo en humanos del mHDA2, descubierto con anterioridad. En este artículo también se describiría que esta enzima poseía dos dominios catalíticos desacetilasa, cuya actividad era independiente, el uno del otro y se postulaba que, a pesar de que HDAC6 podía manifestar una actividad tipo HDAC, *in vitro*, comparable a la de HDAC1, la interacción con las histonas podía no ser su función *in vivo*, actuando, probablemente, sobre otros sustratos (Grozinger, Hassig, and Schreiber 1999).

Las histonas desacetilasas desarrollarían funciones, principalmente, de modulación de la transcripción, mediante su actividad catalítica desacetilasa, actuando sobre residuos de lisina acetilados, presentes en las colas de las histonas y ejerciendo un efecto represor, en conjunción con las histonas acetilasas (HATs) que ejercerían una modulación de carácter activador. No obstante, las histonas no serían los únicos sustratos sobre los que pueden actuar las HDAC. A día de hoy se conocen en total 11 histonas desacetilasas clásicas en mamíferos, cuyo dominio catalítico está altamente conservado y que se clasifican en clase I, clase IIa, clase IIb, clase IV (revisado en (Haberland, Montgomery, and Olson 2009)) (Imagen 11).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Imagen 11. Clasificación de las Histona Desacetilasas clásicas: En la figura se representa el porcentaje de homología de los dominios catalíticos desacetilasa, con respecto a sus homólogos en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, además de otros dominios relevantes para sus funciones. Este esquema pertenece al trabajo de Yang y Seto (Yang and Seto 2008).

Por otro lado, hay otras 7, clasificadas como HDAC de clase III, aunque más conocidas como Sir2 (en inglés, “silent information regulator 2”) o sirtuinas. Las sirtuinas dependen de la interacción de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), con su dominio catalítico, para su función (revisado en (Schwer and Verdin 2008)), a diferencia de las HDAC clásicas, que dependen de Zn, para su actividad (Huang, Barr, and Rudnick 2013).

Las HDAC de clase I, se presentan exclusivamente en el núcleo, salvo condiciones patológicas (Kim et al. 2010), o tal vez se localizan en mitocondrias, puntualmente en ciertas etapas del desarrollo del sistema nervioso central (descrito en ranas *Xenopus laevis* (Guo et al. 2015). Mientras tanto, las HDAC de clase II, aunque eminentemente nucleares, pueden encontrarse en el citoplasma, debido a que poseen en su estructura secuencias de localización nuclear NLS (en inglés, “nuclear localization signal”), así como señales de exporte nuclear NES (en inglés, “nuclear export signal”), así como diferentes residuos de serina fosforilables con capacidad de unión a proteínas tipo 14-3-3, que modularían el exporte al citoplasma junto con estos dominios (Wang and Yang 2001; McKinsey, Zhang, and Olson 2001).

A pesar de que, en comparación con las HDAC de clase I, las HDAC de clase IIa poseen una muy escasa actividad catalítica de sus dominios desacetilasa, su funciones siguen comprendiendo la regulación de la transcripción, mediante la asociación con las enzimas de la clase I (Lahm et al. 2007). No obstante, la localización preferentemente citoplasmática de HDAC6, una HDAC de clase IIb, condicionará que sea la que más se aleja en características y funciones del resto de estas enzimas. De hecho, como ya hemos mencionado previamente, es la única que posee dos dominios desacetilasa, los cuales son perfectamente activos contra histonas *in vitro*, mas *in vivo*, esta enzima no parece desempeñar esta actividad (Grozinger, Hassig, and Schreiber 1999).

La localización de HDAC6 se debe a que, a pesar de presentar ciertas secuencias de exporte e importe nuclear, poseería una serie de secuencias repetidas, conocida como el dominio SE14, que retendrían a la proteína en el citoplasma y que son exclusivos de la enzima humana (Bertos et al. 2004). Además de esto, se ha descrito que la proteína p300, puede acetilar residuos de lisina de HDAC6, produciendo el secuestro de esta enzima en el citoplasma, al impedir su interacción con la proteína de importe nuclear importina- α , a la par que reduciría su capacidad desacetiladora de tubulina y afectaría, por lo tanto, a la dinámica de citoesqueleto. Un hecho curioso que también se describe en este artículo, es la presencia nuclear de HDAC6

Introducción

en líneas celulares de leucemia humana K562 (Liu, Peng, et al. 2012), observación en sintonía con las descripciones recientes de HDAC6 como regulador de factores transcripcionales, como STAT5A (siglas en inglés para transductor de señales y activador transcripcional 5A) (Medler et al. 2016) o RUNX2 (factor de transcripción relacionado con Runt tipo 2) (Manzotti et al. 2019), en determinados cánceres, lo cual sugiere una posible localización nuclear de HDAC6 en condiciones patológicas.

Al estar en el citoplasma, la actividad desacetilasa de HDAC6 recae especialmente sobre sustratos como la α -tubulina de los microtúbulos, lo cual implica una regulación de la estabilidad de la dinámica los mismos. La sobreexpresión de esta proteína inducía la motilidad asociada a microtúbulos, por desacetilación global de la α -tubulina, mientras que una inhibición producía hiperacetilación de la misma (Hubbert et al. 2002; Matsuyama et al. 2002). Poco después, se confirmaría este fenómeno y se describiría que la desacetilación ocurría sobre la Lys40 de la α -tubulina y que el mecanismo era mediado por la unión con β -tubulina, si bien no era, esta, sustrato de HDAC6 (Zhang, Li, et al. 2003).

Otro sustrato importante para la motilidad celular, sobre el que actúa HDAC6, sería la cortactina. HDAC6 ejercerá su actividad desacetiladora sobre cortactina, de manera que permitirá, a esta cortactina desacetilada, interactuar con la F-actina, promoviendo su polimerización y en último término, la dinámica de citoesqueleto que regula el movimiento de la célula (Zhang et al. 2007).

La actividad desacetilasa de HDAC6 también modula la actividad como chaperona de Hsp90 ("heat shock protein 90"), la cual, al ser desacetilada por HDAC6, podrá inducir la maduración estructural de diversas proteínas, como el receptor de glucocorticoides (Kovacs et al. 2005).

Otra característica en HDAC6, que la diferencia del resto de las HDAC, es la presencia del dominio BUZ. Se identificó, en un principio, analizando regiones no relacionadas con la actividad desacetilasa de la enzima, encontrándose un dominio situado en el extremo C-terminal, rico en cisteínas e histidinas, que presentaba homología con ubiquitín-proteasas (UBPs). En el contexto de la enzima HDAC6, este dominio unía eficientemente ubiquitina y fue bautizado, en ese momento, como ZnF-UBP ("ubiquitin carboxyl-terminal hidrolase-like zinc finger") (Seigneurin-Berny et al. 2001). Poco después se publicó un trabajo que, paralelamente a este, había identificado este dominio y la unión de HDAC6, mediante el mismo, a cadenas de poli-ubiquitina (Hook et al. 2002). De manera controvertida, posteriormente, otro equipo describió como, la unión del dominio BUZ solo era posible con el extremo C-terminal de residuos de libres o péptidos de ubiquitina, pero que dicho dominio no reconocía los residuos de poli-ubiquitina, que tuviesen su extremo C-terminal conjugado a proteínas (Pai et al. 2007).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

En 2003, un grupo de investigadores encontró el primer nexo que conectaba HDAC6 con las rutas de degradación de la célula. Se describió que, HDAC6, mediaba en la unión de agregados de proteínas mal plegadas y poliubiquitinadas, a los motores de dineína de los microtúbulos, para transportarlas así a los agresomas, para su procesamiento. De esta manera, se conectaba la capacidad de unión a ubiquitina, por medio de su dominio BUZ, con su acción desacetiladora de microtúbulos y asociación con p150^{glued}, un componente del motor de dineína de dichos microtúbulos. A su vez, se demostraba que, en ausencia de HDAC6, se producía una deficiencia en la formación de agresomas, por lo que esta enzima debía ser fundamental para el proceso (Kawaguchi et al. 2003).

Dicha formación de agresomas, aparece como mecanismo alternativo al proteasoma, para evitar la toxicidad por acumulación de proteínas aberrantes. Por lo general, el mecanismo principal de la célula para deshacerse de las proteínas mal plegadas, cuya acumulación resultaría potencialmente patológica, es la unión covalente, a estas, de cadenas de poli-ubiquitina, como señal para ser degradadas por la ruta proteasómica. Sin embargo, cuando la capacidad de la degradación por proteasoma se ve excedida o comprometida, los agregados de proteínas poli-ubiquitinadas, serán transportados al MTOC (siglas en inglés para centro organizador de microtúbulos) para formar los agresomas (Johnston, Ward, and Kopito 1998).

Además, se ha descrito como, la formación de agresomas, puede ser también mediada por la proteína p62/SQSTM1 ("sequestosome 1"), reclutando sustratos poli-ubiquitinados mediante la interacción con su dominio "asociado a ubiquitina" UBA (Seibenhener et al. 2004). Más aun, el proceso fundamental que uniría la formación de agresomas con la degradación por autofagia, parece depender completamente de p62. Se describió como esta proteína aparecía en determinados cuerpos de inclusión, constituidos por agregados de proteínas poliubiquitinadas; a la par que interaccionando con LC3 (en inglés, "light chain 3"), asociado a la membrana de los autofagosomas. Se sugería, entonces, que los agregados proteicos eran transportados a los autofagosomas, mediante la acción de p62, para su degradación autofágica (Bjørkøy et al. 2005); postulado confirmado por otro grupo de investigadores, poco después (Pankiv et al. 2007).

El paso final del proceso de la autofagia, también dependerá de la acción moduladora del citoesqueleto de HDAC6. Si bien, previamente mencionamos que la acción de HDAC6 sobre cortactina, favorecía la motilidad celular, a su vez, esta misma acción de HDAC6, desacetilando cortactina, promueve la polimerización de una red de F-actina que mediará la fusión de autofagosomas con lisosomas. (Lee et al. 2010).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Es importante señalar que, estos procesos asociados a la degradación de agregados proteicos, en los que participa tanto HDAC6 como p62, pertenecen a la conocida como autofagia selectiva o autofagia QC (en inglés, "quality control"). Esta autofagia selectiva no dependería de la escasez de nutrientes, sino de la presencia de proteínas u organelas dañadas, que podrían causar patologías, de no ser degradadas. Por otro lado, la autofagia basal, dependiente de nutriente, se activa en caso de detectarse escasez de estos y no discrimina entre proteínas sanas o aberrantes. En este artículo se describe pues, como, la actividad de HDAC6 no afecta a la autofagia basal (Lee et al. 2010).

Cabe destacar que, en investigaciones más recientes, se defiende que la unión de HDAC6, mediante su dominio BUZ, a los agregados proteicos, no estaría ocurriendo por medio de la unión de este a cadenas poliubiquitinadas, sino, exclusivamente, a ubiquitinas libres presentes en los agregados, que tuviesen intactos motivos de diglicina C-terminales, los cuales, se explica previamente, se habían identificado como sitios de unión a BUZ. Además, se sugiere, en este artículo, que la presencia de estos residuos libres, dependería de la acción de-ubiquitinasa de la enzima ataxina-3 (Ouyang et al. 2012).

La enzima HDAC6 también se ha descrito modulando la reorganización del citoesqueleto que ocurre durante la sinapsis inmunológica entre linfocitos T y células APC. Durante este proceso, se observaba una desacetilación inicial de los microtúbulos, que coincidía con una localización en el sitio de contacto de HDAC6. Además se comprobó como la sobreexpresión de HDAC6, inducía la desorganización de CD3, la translocación de MTOC y la producción de IL-2, mientras que un inhibidor de su actividad desacetilasa, revertía el efecto (Serrador et al. 2004).

A su vez, la actividad desacetilasa de esta enzima también se ha relacionado con el fenómeno de la entrada viral del VIH-1. Se identificó que, la unión de la proteína de la envuelta gp120 con CD4 inducía un aumento del nivel de acetilación de la α -tubulina. La sobreexpresión de HDAC6, mediaba la desacetilación de esta α -tubulina, lo cual impedía el mecanismo de fusión y la infección viral, mientras que, el silenciamiento de la enzima, potenciaba notablemente la infección y la fusión entre células, formando sincitios (células gigantes polinucleadas) (Valenzuela-Fernández et al. 2005).

Otro mecanismo descrito, mediante el cual la enzima HDAC6 podría afectar al VIH-1, parece ser la transcripción del genoma viral, de manera que, en el citoplasma, HDAC6 podría desacetilar a la proteína reguladora Tat, impidiendo su posterior interacción con ciclina T1 y suprimiendo así la trans-activación del promotor de VIH-1 (Huo et al. 2011).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Introducción

Si tenemos en cuenta además, la ya mencionada, reciente incorporación de HDAC6, al grupo de los factores de restricción contra el VIH-1, al encontrar un mecanismo contra el que actúa (degradación de A3G mediada por Vif) (Valera et al. 2015) y una proteína accesoria, que contrarresta su acción antiviral (Nef) (Marrero-Hernandez et al. 2019), se hace evidente la importancia del estudio de esta enzima en más procesos moleculares asociados al virus, tal y como parte del desarrollo de esta tesis ha tratado de abordar.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Hipótesis y Objetivos

Nuestra primera hipótesis se basaba en que, para una eficiente entrada viral del virus VIH-1 en la célula, es necesario que las glicoproteínas de la Env de este virus, mediante el contacto con sus receptores en los linfocitos T CD4⁺, desencadenen determinadas modificaciones del citoesqueleto de la célula, de manera que, por un lado, mediante la reorganización de la F-actina, se polaricen los receptores y correptores, hacia la región de contacto con el virus y, además de este fenómeno, concido como “capping” (Jiménez-Baranda et al. 2007; Barrero-Villar et al. 2009; García-Expósito et al. 2013), es necesario que la Env, en su contacto con CD4, promueva la acetilación del córtex de microtúbulos, fenómeno sobre el cual, la enzima HDAC6 ofrece oposición mediante su actividad desacetiladora de α -tubulina (Valenzuela-Fernández et al. 2005). En este sentido y, partiendo de que nuestros colaboradores de la Unidad de Virología Molecular, del Centro Nacional de Microbiología (CNM, ISCiii), habían identificado un clúster de pacientes LTNP-EC, cuyas secuencias de la Env presentaban muy escasa variabilidad entre sí, además de demostrar una escasa actividad replicativa (Casado et al. 2013), queríamos comprobar si era posible que las Env de dichos pacientes fueran el factor determinante que condicionaba su particular perfil clínico de control de la enfermedad, analizando la capacidad funcional de estas Env en el proceso de señalización en entrada viral sobre sus receptores.

Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio habían identificado una influencia negativa de la enzima HDAC6 sobre la estabilidad de la poliproteína Pr55-Gag, mediante algún mecanismo que implicaba la ruta autofágica (de Armas-Rillo 2017), pero era necesario dilucidar si había una interacción directa o indirecta entre estas proteínas y que regiones de las mismas estaban implicadas en dicha interacción, en tal caso. Dada la relación de HDAC6 con el transporte de proteínas ubiquitinadas mediante su dominio BUZ y su implicación en las rutas degradativas de formación del agresoma y la autofagia (Kawaguchi et al. 2003; Lee et al. 2010), parecía, este dominio BUZ, un candidato excelente para ser la región por la cual podría interactuar, si era el caso, la enzima HDAC6 con Pr55-Gag, más aun teniendo en cuenta la ubiquitinación de dicha poliproteína en determinadas lisinas de su región C-terminal, que se ha descrito en la literatura científica (Gottwein and Kräusslich 2005).

o Teniendo en cuenta estas premisas, este trabajo partiría de dos **hipótesis** referentes a distintos eventos del ciclo viral del VIH-1: la entrada viral y el proceso de producción de viriones:

1. Env de pacientes LTNP-EC poseen escasa capacidad señalizadora para promover la reorganización del citoesqueleto de actina hacia un polo de la célula (fenómeno del “capping”) y, la acetilación de la α -tubulina, superando la barrera impuesta por HDAC6, ambos mecanismos esenciales para una

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Hipótesis y Objetivos

eficiente entrada viral. Esta deficiencia se correspondería con el perfil LTNP-EC de los pacientes de los que proceden estas Env.

2. HDAC6 promueve la degradación de Pr55-Gag debido a su capacidad de unirse a residuos ubiquitinables de esta poliproteína, por medio de su dominio BUZ.

○ Para validar o desmentir dichas hipótesis, se plantearon dos **objetivos generales** que habrían de cumplirse desarrollando sus respectivos hitos particulares:

- 1. Evaluar si la capacidad de las Env de virus primarios, de señalar a través de CD4, para vencer la barrera del HDAC6 endógeno, estabilizando el córtex de microtúbulos acetilados, así como promoviendo la reorganización de la F-actina, puede determinar su capacidad infectiva y con ello la evolución de la infección en los pacientes y el perfil clínico de los mismos como controladores o no de la infección.**

- Analizar la capacidad infectiva de las Env del clúster LTNP-EC estudiado, frente a la que presentan Env de pacientes progresores crónicos.

- Evaluar la capacidad de señalización de las Env del clúster LTNP-EC estudiado, para promover la estabilización de la α -tubulina acetilada, así como la formación del fenómeno del "capping", frente a la capacidad señalizadora de Env de pacientes crónicos.

- Analizar la importancia de la secuencia conservada de las Env de este clúster para su capacidad infectiva, a través de la comparación con la Env de una paciente que presenta mutaciones a partir de la dicha secuencia.

- 2. Determinar la importancia del dominio BUZ (ZnF-UBP) en la actividad degradativa de HDAC6 sobre Pr55-Gag-VIH-1 y, evaluación de la posible interacción directa o indirecta de Pr55-Gag-VIH-1 con HDAC6, para caracterizar a HDAC6 como un factor de restricción per se con actividad antirreplicativa frente al VIH-1.**

- Dilucidar la importancia del dominio BUZ en la influencia negativa observada de HDAC6 sobre la estabilidad de la poliproteína Pr55-Gag.

- Identificar si se produce una interacción directa o indirecta entre la enzima HDAC6 y Pr55-Gag y, en tal caso, qué importancia tendría el dominio BUZ para dicha interacción.

- Analizar que regiones de Pr55-Gag pueden influir en el fenómeno degradativo que promueve HDAC6 sobre dicha poliproteína viral.

60

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

MATERIALES Y MÉTODOS



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

3.1. ANTICUERPOS:

El siguiente listado recoge los anticuerpos empleados durante el trabajo de esta tesis doctoral.

Nombre (Nº de catálogo)	Casa comercial	Técnica donde se empleó	Información y observaciones
Anti-HDAC6 (H-300) (sc-11420)	Santa Cruz Biotechnology Inc	- <i>Western blot</i>	- Policlonal - Producido en conejo - Actualmente discontinuado
Anti-p62/SQSTM1 (D-3) (sc-28359)	Santa Cruz Biotechnology Inc	- <i>Western blot</i>	- Monoclonal - Producido en ratón
Anti-HIV1 p55 + p24 + p17 (ab63917)	Abcam	- <i>Western blot</i>	- Policlonal - Producido en conejo
Anti-α-tubulin B-5-1-2 (T6074)	Sigma-Aldrich	- <i>Western blot</i>	- Monoclonal - Producido en ratón
Anti-Acetylated Tubulin 6-11B-1 (T7451)	Sigma-Aldrich	- <i>Western blot</i> - Inmunofluorescencia	- Monoclonal - Producido en ratón
ANTI-FLAG® M2 (F1804)	Sigma-Aldrich	- <i>Western blot</i>	- Monoclonal - Producido en ratón
Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (P0447)	Dako	- <i>Western blot</i>	- Anticuerpo secundario - Policlonal anti ratón - Producido en cabra - Conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (P0448)	Dako	- <i>Western blot</i>	- Anticuerpo secundario - Policlonal anti conejo - Producido en cabra - Conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
HA-probe (F-7) (sc-7392)	Santa Cruz Biotechnology Inc	- Coinmunoprecipitación	- Monoclonal - Producido en ratón - Arrastre selectivo de proteínas marcadas con el epitopo HA
GFP (FL) (sc-8334)	Santa Cruz Biotechnology Inc	- Coinmunoprecipitación	- Policlonal - Producido en conejo - Arrastre selectivo de proteínas marcadas con la proteína verde

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

			fluorescente GFP - Actualmente discontinuado
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A-11008)	Invitrogen (Thermo Fisher)	-Inmunofluorescencia	- Anticuerpo secundario - Policlonal anti conejo - Producido en cabra - Conjugado con Alexa Fluor™ 488
CD4 Monoclonal Antibody (RPA-T4) (16-0049-85)	eBioscience	-Ensayos de infección viral	- Anticuerpo monoclonal neutralizante del receptor CD4 - Añadido para establecer control negativo de entrada viral dependiente de CD4

3.2. REACTIVOS Y KITS COMERCIALES:

El siguiente listado recoge los reactivos y kits comerciales empleados en este trabajo.

Casa comercial	Aplicación en este trabajo
REACTIVOS	
- PEI25K (nº de catálogo 23966)	
PolyScience Inc	Polietilenimina de 25 kDa de masa molecular promedio, que actúa como transportador catiónico no lipídico, empleada como agente transfectante.
- X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (nº de catálogo 06 366 546 001)	
Roche	Agente transfectante de alto rendimiento, empleado para la producción de partículas virales para ensayos de infección y señalización en entrada viral.
- cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (nº de catálogo 11697498001)	
Roche	Tabletas compuestas de una mezcla de inhibidores de proteasas, empleadas como aditivo en el tampón de lisis, para la protección de las proteínas que queremos analizar.
- RNase A enzyme (100 mg) (nº de catálogo 10109169001)	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

Roche	Enzima empleada en los experimentos de coimmunoprecipitación por su actividad catalítica degradando el ARN, para poder descartar la aparición de interacciones indirectas entre las proteínas debido a dichos ácidos nucleicos.
- 3-Methyladenine (3-MA) (nº de catálogo M9281-100MG)	
Sigma-Aldrich	La 3-metiladenina es empleada como inhibidor de la ruta autofágica, bloqueando la formación de los autofagosomas, debido a su acción como inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase III.
- Fluoroshield™ with DAPI (nº de catálogo F6057)	
Sigma-Aldrich	Medio de montaje acuoso que contiene DAPI, para la visualización del núcleo mediante técnicas de microscopía fluorescente.
- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (nº de catálogo 10837091001)	
Sigma-Aldrich	Inhibidor de proteasas, empleado como componente adicional del tampón de lisis de los experimentos de coimmunoprecipitación, para mayor conservación de proteínas en los lisados.
- Polybrene® (nº de catálogo sc-134220)	
Santa Cruz Biotechnology Inc	Polímero catiónico empleado en nuestros ensayos de entrada viral para incrementar la eficiencia de infección por retrovirus de líneas celulares, por su capacidad para neutralizar las cargas de superficie entre las partículas virales y las células.
- Alexa Fluor™ 633 Phalloidin (nº de catálogo A22284)	
Invitrogen (Thermo Fischer)	Sonda fluorescente conjugada con la tinción Alexa Fluor® 633 y, derivada de la faloidina, una micotoxina proveniente del hongo <i>Amanita phalloides</i> , que se une con alta afinidad a la F-actina, por lo que se empleó para el marcaje selectivo de esta proteína en ensayos de inmunofluorescencia
- Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (nº de catálogo 1610373)	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

BIO-RAD	Estándar proteico que contiene una mezcla definida de 10 proteínas de diverso peso molecular (10-250 kDa), teñidas de azul, empleado como marcador de peso molecular en la electroforesis de la técnica del <i>western blot</i> .
KITS COMERCIALES	
- BCA Protein Assay Kit (nº de catálogo 71285-3)	
Novagen® (Millipore)	Kit para la realización del método del ácido bicinónico, empleado para cuantificar proteínas en los lisados celulares.
- PureProteome™ Protein G Magnetic Beads. (nº de catálogo LSKMAGG10)	
Millipore	Solución con bolas magnéticas recubiertas de proteína G, para la realización de ensayos de coinmunoprecipitación.
- Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (nº de catálogo 632200)	
Clontech (Takara Bio)	Test de titulación de la proteína cápside p24 de VIH-1 en sobrenadantes, mediante el método ELISA, empleado para la cuantificación de la producción de partículas virales en nuestros experimentos.
- Innotest HIV antigen MAb (nº de catálogo 80563)	
Fujirebio Europe	Test p24-ELISA de alta sensibilidad, empleado para la titulación de la producción viral en nuestros experimentos, de cara a los ensayos de infección y señalización en entrada viral.
- Steady-Glo® Luciferase Assay System (nº de catálogo E2510)	
Promega Corporation	Test de cuantificación de la expresión del gen reportero de la enzima luciferasa, empleado para la cuantificación de la entrada viral, usando partículas virales generadas a partir del vector pNL4-3.Luc.R'E, que tiene insertado dicho gen.
- Clarity™ Western ECL Substrate (nº de catálogo 1705060S)	
BIO-RAD	Kit revelador con soluciones de peróxido y de luminol, empleado en ensayos bioquímicos por <i>western blot</i> para el revelado de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), por quimioluminiscencia.

66

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

REACTIVOS DE CULTIVOS CELULARES	
- DMEM High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate (nº de catálogo L0104)	
Biowest	Medio de cultivo empleado en la línea celular HEK-293T.
- Fetal Bovine Serum (FBS) (nº de catálogo S1400)	
Biowest	Empleado para suplementar el medio DMEM para el cultivo de la línea celular HEK-293T.
- Recombinant Trypsin EDTA 1X in PBS (nº de catálogo L0941)	
Biowest	Empleado para levantar líneas celulares adherentes HEK-293T, por su actividad hidrolítica sobre enlaces peptídicos.
- Penicillin – Streptomycin (nº de catálogo L0018)	
Biowest	Empleado como suplemento en los medios de cultivo celular, para evitar contaminación bacteriana.
- RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™ (nº de catálogo 61870-036)	
Gibco® (Thermo Fisher)	Medio de cultivo empleado en la línea celular CEM.NKR-CCR5.
Fetal bovine serum (FBS) heat-inactivated. (nº de catálogo 16140-071)	
Gibco® (Thermo Fisher)	Empleado para suplementar el medio RPMI 1640 para el cultivo de la línea celular CEM.NKR-CCR5.
MycoZap™ Prophylactic (10 x 1mL) (nº de catálogo VZA-2031)	
Lonza Bioscience	Antibiótico empleado como profilaxis contra la contaminación por micoplasmas de los cultivos celulares.

3.3. SOLUCIONES DE TRABAJO:

A continuación se desarrolla un listado de las soluciones empleadas describiendo su composición y la técnica experimental en la que se emplearon.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

Composición	Aplicación
Solución tampón PBS (Phosphate-Buffered Saline) 1X	
- NaCl 137 mM - KCl 2,7 mM - Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 10 mM - KH ₂ PO ₄ 2 mM pH 7,4	Solución habitual de lavado de las células.
Solución filtrada de NaCl para transfecciones	
- NaCl 150 mM Filtrada con filtro de 0,22 µm	Solución para resuspender el agente transfectante PEI25K.
Solución tampón de lisis	
- NaCl 150 mM - Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) - Tritón 1% - Deoxycolato sódico 0,5% - Inhibidor de proteasas cOplete™ (Roche) 1X	Solución para lisar las células que van a ser sometidas a análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Solución tampón de lisis para ensayos de coimmunoprecipitación	
- NaCl 150 mM - TrisHCl 50 mM (pH 7,5) - Tritón 1% - Deoxycolato sódico 0,5% - Inhibidor de proteasas cOplete™ (Roche) 1X - Inhibidor de proteasas PMSF 1 mM.	Solución para lisar las células de los experimentos de coimmunoprecipitación.
Solución tampón de lavado para ensayos de coimmunoprecipitación	
- Tween-20 0,1% (v/v) En solución tampón PBS 1X	Solución de lavado de las bolas magnéticas entre incubaciones, en ensayos de coimmunoprecipitación.
Tampón LAEMMLI (4X)	
- Tris-HCl 250 mM (pH 6,8) - SDS 8% (p/v) - Glicerol 40% (v/v) - β-mercaptoetanol 20% (v/v) - Azul de bromofenol 0,04% (p/v) - Completar volumen en H ₂ O miliQ	Tampón de carga para realizar electroforesis de los lisados celulares en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Lower Tris	
- Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) - SDS 0,4% (p/v)	Solución para elaborar la región de separación (<i>Running</i>) de los geles de electroforesis empleados en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Upper Tris	
- Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8) - SDS 0,4% (p/v)	Solución para preparar la región de compactación (<i>Stacking</i>) de los geles de electroforesis empleados en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .

68

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

Región de separación <i>RUNNING</i> 12%	
Para cada gel a preparar: - Acrilamida/Bisacrilamida 30% 3,2 mL - Lower Tris 2 mL - TEMED (tetrametiletilendiamina) 10 µL - Solución 10% APS (Persulfato amónico) 64 µL - H ₂ O miliQ hasta 8 mL (2,7 mL)	Solución que conforma la región de separación del gel de electroforesis de los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Región de compactación <i>STACKING</i>	
Para cada gel a preparar: - Acrilamida/Bisacrilamida 30% 0,65 mL - Upper Tris 1,25 mL - TEMED (tetrametiletilendiamina) 5 µL - Solución 10% APS (Persulfato amónico) 25 µL - H ₂ O miliQ hasta 5 mL (3,07 mL)	Solución que conforma la región de compactación del gel de electroforesis de los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
SDS-PAGE ("Sodium Dodecil Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis")	
- Tris-base 25 mM - Glicina 192 mM - SDS 0.1% (p/v) pH 8.3	Solución tampón para la electroforesis en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Solución tampón de transferencia	
- Tris-base 25 mM - Glicina 192 mM - Metanol 20% (v/v) - SDS 0,1% (p/v)	Solución para realizar la transferencia semi-seca de los geles a las membranas empleando el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Tampón de transferencia Towbin	
- Tris-base 25 mM - Glicina 192 mM - Metanol 20% (v/v)	Solución para realizar la transferencia húmeda de los geles de electroforesis a las membranas, en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween)	
- 40 mM Tris-HCl - 10 mM Tris-base - NaCl 150 mM - Tween-20 0.1% (v/v) pH 7.5	Solución de lavado de las membranas y solución de disolución de los anticuerpos para el marcaje de las proteínas en dichas membranas, en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Solución de "Stripping"	
- Glicina 0,2 M - SDS 0,1% (p/v) - Tween-20 1% (v/v) pH 2,2	Solución para retirar los anticuerpos que marcan las proteínas de la membrana, ya revelados y, poder realizar nuevos marcajes, en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Solución de bloqueo	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

Leche en polvo desgrasada 5% en TBS-T	Solución para saturar las membranas con proteínas, evitando uniones inespecíficas en los marcajes con anticuerpos de las proteínas que deseamos analizar, en los análisis bioquímicos por <i>western blot</i> .
Solución de fijación	
- Paraformaldehído 2% (p/v) En solución tampón PBS 1X	Empleada en el montaje de las células para su análisis por técnicas de microscopía fluorescente confocal.
Solución de permeabilización	
- Tritón X-100 0,1% (v/v) En solución tampón PBS 1X	Empleada para permeabilizar la membrana plasmática de las células y permitir el marcaje de sus proteínas, durante el montaje de las mismas para su análisis por técnicas de microscopía fluorescente confocal.

3.4. PLÁSMIDOS:

• **Plásmidos Env de virus VIH-1:**

- Los plásmidos de expresión de Env objeto de nuestro estudio fueron generados por nuestros colaboradores en la RETIC-RIS, de la Unidad de Virología Molecular, del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII), procedentes de genes *env* aislados en individuos de un clúster de pacientes LTNP-EC, de los cuales se disponía de amplio seguimiento clínico, identificado en la Cohorte Española de pacientes VIH (Casado et al. 2013). Las Env fueron seleccionadas de 3 pacientes de dicho clúster: **LTNP_1** (4 clones), **LTNP_3** (3 clones), **LTNP_RF_21** (1 clon). Asimismo seleccionaron y generaron también los plásmidos de Env procedentes de 4 pacientes progresores crónicos de VIH-1, seleccionados al azar en la cohorte Española de pacientes de VIH-1: **I_10** (2 clones), **IV_10** (2 clones), **I_14** (1 clon), **RIS_06** (1 clon). Estos plásmidos se usaron como grupo control.

TABLE 1 Epidemiological, clinical, and host characteristics of the patients

Patient	Sex	Origin	Hospital	Transmission ^a	Yr first HIV-1+	Sample date	Group	Viral load (copies/ml)	CD4+ count (T cells/ μ l)	HLA-B genotype
LTNP_1	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1990	2005	LTNP-VCS	125	628	B1501/B2705
LTNP_3	M	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1988	2005	LTNP-ECs	<50	880	B2705/B5801
LTNP_5	M	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1986	2005	LTNP-ECs	<50	559	B2705/B3503
LTNP_RF_15	M	Madrid	12 de Octubre	IDU	1989	2004	LTNP-ECs	<50	460	B44/B57
LTNP_RF_21	M	Madrid	12 de Octubre	IDU	1985	2004	LTNP-ECs	<50	690	B47/B14
AS7	F	NK ^b	El Patriarca	IDU	1989	1989	NK	NK	NK	B3501/B5101
I_10	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU/HT	NK	1993	Progressors	8.9×10^4	251	
IV_10	M	Vigo		IDU	1991	1994	Progressors	1.7×10^6	342	
I_14	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU/HT	1987	1994	Progressors	1.3×10^5	337	
RIS_06	M	Madrid	C. S. Sandoval	MSM	2005	2005	Progressors	7.6×10^4	436	

^aTransmission route: IDU, intravenous drug user; MSM, men who have sex with men; HT, heterosexual.
^bNK, not known.

Imagen 11. Tabla que muestra los pacientes de VIH-1 LTNP y progresores crónicos de los cuales se aislaron los plásmidos empleados en nuestro estudio. Esta tabla corresponde a la Tabla 1 del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018).

70

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Material y Métodos

- Además de los controles de pacientes progresores crónicos se disponía también de plásmidos de Env control de virus adaptados de laboratorio o referencia **SF162** y **89ES_061**. En estos experimentos también se incluye como Env control el plásmido **BaL.01**, de tropismo R5 (N° de catálogo 11445, “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”), el cual fue, también, en general empleado en los experimentos de producción de virus de este trabajo.

- Del plásmido de la Env procedente de la paciente **AS7** se disponía de 3 clones obtenidos por mutagénesis dirigida, a los cuales les habían sido revertidas 3 mutaciones de aminoácidos exclusivas de la Env AS7, que la diferenciaban del resto de Env de pacientes del clúster LTNP-EC objeto de estudio, hacia la secuencia conservada de las Env aisladas de dicho clúster: **AS7_I140T** (residuo revertido en la posición 140 (V1), **AS7_V279A** (residuo revertido en la posición 279 (C2) y **AS7_I400T** (residuo revertido en la posición 400 (V4)).

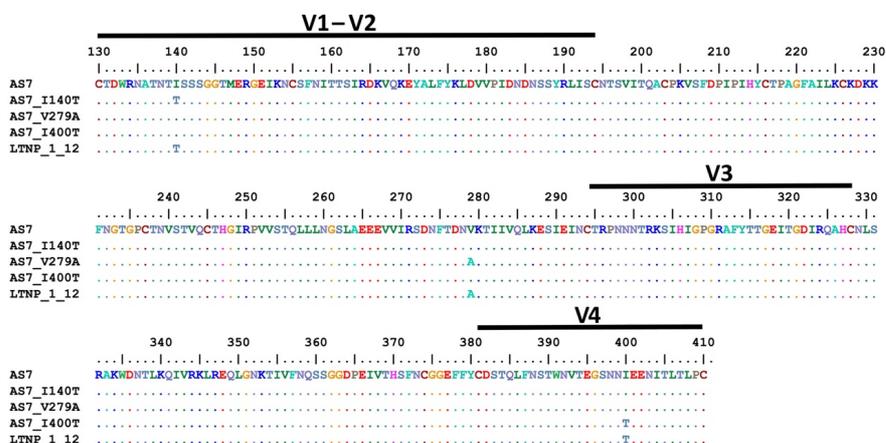


Imagen 12. Tabla que muestra los pacientes de VIH-1 LTNP y progresores crónicos de los cuales se aislaron los plásmidos empleados en nuestro estudio. Esta figura corresponde a la Fig 6 A) del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018).

- **pHEF-VSV-G** (N° de catálogo 4693, “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”):

Construcción que codifica para el gen de la proteína G fusogénica de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), lo que nos permite, cotransfectando con un constructo del cuerpo viral, producir partículas virales expresando esta envuelta, para usarlas como control de entrada viral no dependiente de CD4, CXCR4 ni CCR5,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

en nuestros experimentos. Esta proteína de envoltura media un mecanismo de entrada viral vía endocitosis mediada por clatrina y fusión de endosomas.

- **pNL4-3.Luc.R'E** (Nº de catálogo 3418, "NIH AIDS Research and Reference Reagent Program")

Este plásmido codifica para las proteínas del cuerpo viral de VIH-1 y es defectivo en los genes *env*, *vpr*, mientras que tiene insertado el gen de la enzima luciferasa en el marco de lectura del gen *nef*, haciéndolo también defectivo en el mismo, por lo que, expresándolo transitoriamente junto con plásmidos de Env, permite producir partículas virales de un solo ciclo, seguras para su uso en laboratorio, que producen la proteína Luciferasa, cuantificable por luminiscencia.

- **Plásmidos pΔR mutantes en lisinas de Pr55-Gag** (clonados y cedidos a nuestro equipo desde el laboratorio del Dr. Hans-Georg Kräusslich, Departamento de Virología, Hospital Universitario de Heidelberg Alemania):

Plásmidos provirales pΔR basados en el plásmido proviral pNLC4-3^{tr} (Bohne and Kräusslich 2004), que contienen todos los marcos de lectura abiertos del VIH-1, bajo el control del promotor del citomegalovirus y, conservan *rev* y *tat* intactos. Estos plásmidos permiten su uso seguro en laboratorio al portar una mutación del sitio activo de la transcriptasa inversa (RT) y tener impedida la unión del primer de la retrotranscripción, además de ser defectivos en la proteasa viral (PR) (Gottwein and Kräusslich 2005). Este paquete de plásmidos además presenta diferentes mutaciones en codones de lisina, causando su sustitución por arginina, en la región C-terminal de Pr55-Gag, resultando así en las siguientes construcciones, además del plásmido original intacto, sin mutaciones, **pΔR**:

- **pNC(KR)**: Presenta 10 codones de lisina mutados a argininas en la región NC de Pr55-Gag.

- **pSP2(KR)**: Presenta 2 codones de lisina mutados a argininas en la región SP2 de Pr55-Gag.

- **pp6(KR)**: Presenta 2 codones de lisina mutados a argininas en la región p6 de Pr55-Gag.

- **pNCSP2(KR)**: Combinación de las 10 mutaciones de lisinas en NC y las 2 en SP2.

- **pNCp6(KR)**: Combinación de las 10 mutaciones de lisinas en NC y las 2 en p6.

72

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

- **pSP2p6(KR)**: Combinación de las 2 mutaciones de lisinas en SP2 y las 2 en p6.

- **pNCSP2p6(KR)**: Plásmido que contiene la combinación de las 14 mutaciones de lisina por arginina en las regiones NC, SP2 y p6.

- **pGag-EGFP** (Nº de catálogo 11468, “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”):

Vector de expresión que codifica para la poliproteína Pr55-Gag de VIH-1, clonada en fase de lectura en el gen de la proteína verde fluorescente EGFP.

- **Constructos de ADN circular plasmídico de la enzima humana HDAC6:**

Disponíamos de vectores de expresión que codificaban proteínas recombinantes basadas en la enzima humana HDAC6, con diversas modificaciones y expresando etiquetas peptídicas, tal y como se describe en anteriores trabajos del laboratorio (Valera et al. 2015; Marrero-Hernandez et al. 2019).

- **HA-wt-HDAC6**: Contenido en un plásmido que codifica para la forma salvaje o “wild-type” (“wt”) de la proteína HDAC6, que tiene acoplado, en fase de lectura, el epítipo “Influenza haemagglutinin” (HA) en su extremo N-terminal.

- **HA-HDAC6-ΔBUZ**: Contenido en un plásmido que codifica para la proteína HDAC6 delecionada en el dominio BUZ (a partir del aminoácido 1091 de la proteína original HDAC6), con el epítipo HA, acoplado en fase de lectura, en su extremo N-terminal.

- **HA-dm-HDAC6**: Constructo doble mutante (“dead-mutant” (dm)) de la enzima HDAC6, inactivo en la función desacetilasa de sus dominios HDAC. Estos dominios desacetilasa han sido inactivados mediante dos cambios de aminoácidos (histidina por arginina) en las posiciones 216 y 611 de la enzima. Posee, también, el epítipo HA, acoplado en fase de lectura en su extremo N-terminal.

- **DsRed-wt-HDAC6**: Contenido en un plásmido que codifica para la forma salvaje o wt-HDAC6, que tiene, en este caso, acoplada en fase de lectura, la etiqueta proteica fluorescente “Discosoma Red fluorescent protein (DsRed)”, en el extremo N-terminal.

- **DsRed-HDAC6-ΔBUZ**: Contenido en un plásmido que codifica para la proteína HDAC6 delecionada en el dominio BUZ (a partir del aminoácido 1091 de la proteína original HDAC6), que tiene, en este caso, acoplada en fase de lectura, la etiqueta proteica fluorescente DsRed, en el extremo N-terminal.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

- **Plásmido A3G-Flag:**

Constructo de la proteína celular APOBEC3G (“apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G; A3G”), clonada en un vector de ADN basado en pcDNA 3.1, modificada para poseer en fase de lectura el epítipo de la etiqueta proteica Flag, en el extremo C-terminal, tal y como se indica en trabajos previos del laboratorio (Valera et al. 2015).

- **Vector de expresión pcDNA.3.1:**

Empleado en nuestros experimentos de transfección como plásmido compensador de la carga de ADN introducida en las células HEK-293T, de manera que usemos la misma concentración de agente transfectante y ADN total en todas las condiciones de cada experimento.

3.5. LÍNEAS CELULARES:

- **Células HEK-293T (ATCC® CRL-3216™):**

Línea celular derivada células HEK-293 (Nº de catálogo 103, “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”), procedentes cultivos primarios de células embrionarias de riñón humano, que han sido modificadas para expresar el antígeno T del virus SV40, confiriéndole la capacidad de replicación episomal de vectores de expresión que contengan el origen de replicación SV40. Es una línea celular adherente y es apta para la producción de pseudovirus así como para la sobreexpresión de proteínas codificadas en plásmidos, para realizar análisis bioquímicos, el tipo de ensayos en los que ha sido utilizada en este trabajo.

- **Células CEM.NKR-CCR5 (Nº de catálogo 4376, “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program”):**

Línea celular linfoide que expresa de forma estable los receptores CD4, CXCR4 y, que ha sido modificada para expresar de forma constitutiva el receptor de quimiocinas CCR5, por lo que constituye una línea celular permisiva para la infección por virus VIH-1 de diferente tropismo. Esta línea celular crece en suspensión y, ha sido empleada en este trabajo en ensayos de infección por partículas virales de un solo ciclo y en ensayos de señalización en entrada viral.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

3.6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:

3.6.1. Mantenimiento de cultivos celulares:

Las líneas celulares empleadas en los experimentos se mantenían durante un máximo de 20 pasajes, tras su descongelación, en matraces de cultivo celular de 75 cm², en estufa con atmósfera controlada del 5% de CO₂ y a 37°C. Cada 2 o 3 días se revisaban y se procedía a su pasaje, que presentaba particularidades en base a la línea celular que se estaba manipulando.

Para la línea **HEK-293T**, dado que es una línea celular adherente, el pasaje requiere del levantamiento de las células y de su lavado. En la observación inicial al microscopio óptico, para descartar contaminaciones, estas líneas deben presentarse altamente confluentes antes del pasaje. Para levantarlas, tras retirar el medio se añadía, inicialmente 5 mL de solución tampón PBS-1X estéril, para lavar los restos celulares de desecho y, se añadía, posteriormente a su retirada, 5 mL de tripsina-EDTA 1X (Biowest), que permite levantar las células mediante su actividad hidrolítica sobre enlaces peptídicos implicados en la adhesión celular, ayudando a dicho proceso con muy ligeros golpes al matraz de cultivo. Se vaciaba cuidadosamente el contenido del matraz y, al resto sobrante en las paredes (aproximadamente 1 mL) se le añadía unos 15 mL de medio completo fresco. Las células HEK-293T se cultivaban en medio DMEM (Biowest), que se suplementaba con un 10% en volumen de suero fetal bobino (Biowest), filtrado en condiciones de esterilidad y, 1% de solución penicilina/estreptomicina (Biowest).

La línea celular **CEM.NKR-CCR5**, es una línea que crece en suspensión, por lo que observábamos al microscopio, previamente al pasaje, que hubiera una alta concentración de células con morfología redonda y formando agregados, sin contaminaciones bacterianas ni fúngicas. De los 25 mL iniciales de medio, se retiraban 18 mL y se desechaban, para volver a añadir nuevo medio completo fresco, hasta un total de 25 mL. En el caso de esta línea celular, el medio empleado era RPMI 1640 (Thermo Fisher), que se completaba suplementado con 10% de suero fetal bovino Gibco® (Thermo Fisher), filtrado en condiciones de esterilidad y, un 1% de solución penicilina/estreptomicina (Biowest). En caso de que el medio presentase muchos restos de desecho, se podía proceder inicialmente al lavado de estas células, resuspendiéndolas en tampón PBS-1X estéril, con previa centrifugación de las células (5 minutos, 1.500 rpm), para, tras volver a centrifugarlas y retirarles la solución tampón, resuspenderlas en un volumen total de 25 mL de medio fresco.

Cabe destacar que, en ambas líneas celulares y tras cada pase, se añadía siempre la solución de antibiótico MycoZap Prophylactic (Lonza) (1 µL por cada ml de medio de cultivo total), para evitar la contaminación por micoplasmas de nuestras células.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

3.6.2. Transfección de plásmidos para ensayos bioquímicos:

Para realizar ensayos bioquímicos y evaluar la influencia de proteínas virales sobre proteínas de la célula o proteínas recombinantes sobreexpresadas y viceversa, se han de realizar expresiones transitorias de los diferentes constructos, para expresar las proteínas objeto de estudio en la misma línea celular.

Para ello, 24 h antes de la transfección, se sembraban células HEK-293T en placas de 6 pocillos (9,6 cm² cada pocillo), realizando el conteo para asegurar la siembra de 3×10^5 células, en un volumen total de 2 mL de medio por pocillo, logrando una confluencia celular de entre el 50-70%, en el momento del experimento. Al día siguiente las células sembradas se cotransfectaban con los plásmidos correspondientes en base a las condiciones del experimento, usando como agente transfectante polietilenimina de 25 kDa PEI25K, en una proporción de 3:1, entre volumen en μL de solución de PEI25K (1 mg/mL) y μg de ADN plasmídico total a transfectar. Para ello se preparaban, por cada condición experimental, dos soluciones de 100 μL de NaCl (150 mM), que contenían por un lado, el agente transfectante y por otro la cantidad adecuada de los plásmidos a transfectar. Se incubaban a temperatura ambiente durante 5 minutos, previa mezcla con agitador tipo vórtex, para proceder a combinar las soluciones de ADN y agente transfectante de cada condición y, tras mezclarse de nuevo por agitación, se incubaban las soluciones resultantes (200 μL) 30 minutos. En este punto, se añadían dichas soluciones a los pocillos de células sembradas y se incubaban 48 h (estufa de cultivos a 37°C; 5% de CO₂), momento en el cual se procedía a recoger las células sometidas a las diferentes condiciones experimentales de transfección y a su lisis, para realizar los correspondientes análisis bioquímicos (véase apartado 3.7.4. Análisis bioquímicos por *western blot*). En el caso de los experimentos para analizar la degradación de Pr55-Gag, promovida por los diferentes constructos de HDAC6, al haber generado las condiciones de producción viral, cotransfectando con el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E y la Env BaL.01, de VIH-1, en este paso también se podía recoger el sobrenadante, que contendría los pseudovirus producidos, para cuantificar la producción viral bajo las distintas condiciones, por test p24-ELISA (Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ensayar la influencia del tratamiento con 3-metiladenina (3-MA) y su efecto inhibiendo la ruta autofágica, mediante la inhibición de la formación del autofagosoma; las células eran transfectadas e incubadas, en este caso, durante 24 h, antes de añadir la solución de 3-MA. Se añadía, a cada condición, 200 μL de solución madre 50 mM del inhibidor en PBS-1X, para una concentración final de trabajo de 5 mM en cada pocillo seleccionado y, a su vez, se añadía la misma cantidad de solución vehículo PBS-1X (200 μL) a las réplicas experimentales control. Para la correcta resuspensión de 3-MA en la solución vehículo, conviene

76

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

calentar la solución madre a 40°C durante 5 minutos, vigilando que no queden precipitados en la solución antes de añadirla. Una vez añadida la solución de 3-MA, se incubaban las condiciones 5 h (estufa de cultivos a 37°C; 5% de CO₂), antes de proceder a su lisis y análisis.

3.6.3. Producción de pseudovirus (partículas virales de un solo ciclo):

Para la producción de pseudovirus, de cara a su uso en ensayos de infección viral y ensayos de señalización, cotransfectábamos el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E, con los diferentes plásmidos de expresión de *env* de VIH-1 que queríamos ensayar, de manera que obteníamos partículas virales de un solo ciclo, que permiten trabajar de forma segura y que expresaban la proteína luciferasa en las células infectadas, empaquetadas con cada Env objeto de estudio.

Para realizar dicha producción viral, se sembraban células HEK-293T en placas de 12 pocillos (3,5 cm²), realizando el conteo para asegurar la siembra de 1 x 10⁵ células, en un volumen total de 1 mL de medio por pocillo. Después de 24 h, se realizaba la transfección de las diferentes condiciones experimentales, usando en este caso el agente transfectante X-tremeGENE™ HP, por su alto rendimiento produciendo partículas virales. Este agente transfectante se usaba en una proporción 3:1, entre el volumen en µL del X-tremeGENE™ HP y los µg de ADN plasmídico total a transfectar, que en estos experimentos era 1µg de cuerpo viral y 1µg de Env. Para cada condición se preparaba un tubo de microcentrífuga con 100 µL de medio DMEM incompleto (sin suplementar con suero ni antibiótico, para que no interfiriese con este agente transfectante), donde se añadían las cantidades de plásmidos calculadas. Se mezclaban las soluciones de cada condición mediante agitador tipo vortex y, se dejaba en reposo 5 minutos. A continuación se añadía la cantidad calculada de X-tremeGENE™ HP a la solución de plásmidos de cada tubo, tras lo cual se dejaba incubar 20 minutos, antes de añadir dichas soluciones a las células sembradas. Dichas células se incubaban 48 h (estufa de cultivos a 37°C; 5% de CO₂), para permitir la suficiente producción viral y, tras esta incubación, los sobrenadantes eran recogidos individualmente, se sometían a centrifugación lenta (4 minutos, 3.000 rpm) y, para poder realizar infecciones con cantidades normalizadas de partículas virales, se cuantificaba la producción mediante test p24-ELISA (Innotest HIV antigen MAb, Fujirebio), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cabe destacar que, para los ensayos de infección viral, las condiciones del experimento se realizaban por duplicado, para poder incluir controles negativos de la entrada viral, donde se pre-tratarían las células permisivas con anticuerpo neutralizante anti-CD4 (5µg/mL), para establecer la línea base de infección no productiva. Además se incluía la condición donde el cuerpo viral se empaquetaba

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

con la envuelta del virus VSV-G, como control de la producción viral y de la fiabilidad de la lectura de la actividad luciferasa, mediando la fusión por un mecanismo independiente al receptor CD4.

3.6.4. Análisis bioquímicos por western blot:

Después del periodo de incubación correspondiente tras la transfección, o la infección, en el caso de análisis bioquímicos de las células permisivas sometidas a infección temprana, se recogían las células, lavándolas de por medio con PBS-1X frío (4°C) y someténdolas a centrifugación suave (5 minutos, 1.500 rpm, 4°C), para aislar las células de la solución tampón de lavado. A continuación se le añadía la solución de lisis y se incubaba a 4°C durante 30 minutos. Para aislar la fracción de proteínas soluble que nos interesaba, sometíamos estos lisados a centrifugación potente (15 minutos 30.000 rpm, 4°C) y en caso de observar excesivo sedimento en el fondo de los tubos, les aplicábamos sonicación y los volvíamos a centrifugar.

En este punto se realizaba la cuantificación de las proteínas totales del lisado, mediante el método del ácido bicinonínico, empleando un kit comercial BCA Protein Assay Novagen®, Millipore. De esta manera podíamos ajustar posteriormente cargas de proteínas totales equivalentes entre todas las condiciones. A continuación se le añadía el tampón de carga Laemmli y se sometía a choque térmico de 95°C durante 5 minutos. Esto y el contenido en SDS (dodecilsulfato sódico) y β -mercaptoetanol del tampón de carga, permitía desnaturalizar las proteínas, además de que contenía un colorante (azul de bromofenol) para visualizar el frente de carga de la muestra durante la electroforesis.

Una vez llegado a este punto se podía cargar la muestra en los geles de electroforesis de poliacrilamida, preparados con una reticulación del 10% o del 12% en la zona de separación ("running"), dependiendo del peso molecular de las proteínas que queríamos analizar preferentemente, guardando el volumen de muestra restante a -20°C, para posteriores recargas. La electroforesis se fijaba a amperaje constante (35 mA por cada gel de poliacrilamida) y se realizaba en tampón SDS-PAGE. Se incluía un pocillo con marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ BIO-RAD).

Una vez terminada la electroforesis, cuando alcanzábamos la separación de proteínas deseada, se transferían las proteínas a membranas de 0,45 μ m de poro, de fluoruro de polivinilideno, PVDF (Immobilon-PVDF; Millipore), previa activación sumergiéndolas en metanol 15 segundos, 2 minuto en agua milliQ y el propio buffer de transferencia (Towbin). La transferencia se realizaba preferentemente en condiciones semi-secas utilizando el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System,

78

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

pero en ocasiones se realizaron transferencias húmedas, con el sistema Mini Trans-Blot® Cell, por disponibilidad de medios, sin diferencias en el resultado final. Una vez terminada la transferencia, se volvía a activar la membrana (15 segundos en metanol, 2 minutos en agua milliQ).

En este punto las membranas eran bloqueadas en su poro libre en una solución de leche desgrasada en polvo (5%), elaborada en el tampón TBS-T, durante 30 minutos, para lavarlas posteriormente 3 veces durante 5 minutos con este tampón TBS-T. Dependiendo del anticuerpo primario a utilizar, se incubaba hasta el día siguiente a 4°C, en contacto con una solución de dicho anticuerpo en TBS-T. Los anticuerpos primarios para marcaje de proteínas constitutivas de la célula, como α -tubulina y α -tubulina acetilada, solo requerían de 1 h de incubación en agitación constante. Se realizaban 3 lavados de 5 minutos en tampón TBS-T, antes de incubar con los correspondientes anticuerpos secundarios, conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), durante 1 h, para posteriormente lavar 3 veces estas membranas con tampón TBS-T durante 5 minutos. El revelado de dichos marcajes se realizaba a través del equipo ChemiDoc MP System (Biorad), usando un kit de revelado (Clarity™ Western ECL, Biorad) que contiene el sustrato de la peroxidasa y emite una señal quimiolumínica detectable por el equipo. Las imágenes se obtenían y analizaban mediante el programa Image Lab 5.2.1 de Biorad.

En caso de tener que marcar otras proteínas en la membrana, se sometían al proceso de desacople de los anticuerpos conjugados, conocido como “stripping”, incubando las membranas con una solución ácida (pH 2,2) específica para este proceso, durante 30 minutos, seguido 2 lavados de 10 minutos en una solución de NaCl 50 mM y 2 lavados de 5 minutos en tampón TBS-T, momento tras el cual, nuestra membrana estaba lista de nuevo para bloqueo y marcaje de otras proteínas.

En el análisis de los datos obtenidos de nuestros experimentos, usábamos la intensidad de la banda de la α -tubulina como control de carga total y, cuantificábamos las diferentes proteínas que queríamos evaluar en forma de ratios referidos a dicha α -tubulina

3.6.5. Ensayos de infección viral:

Los ensayos de infección viral se desarrollaban mediante la medida de la actividad lumínica de la enzima luciferasa, cuyo gen se encuentra insertado en lugar del gen *nef* en el constructo del cuerpo viral empleado pNL4-3.Luc.R'E, en células permisivas CEM.NKR-CCR5 infectadas con los pseudovirus formados con dicho cuerpo viral y los diferentes plásmidos de expresión de *env* a ensayar.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Material es y Métodos

Para ello se sembraban 9×10^5 células CEM.NKR-CCR5 (resuspendidas en 100 μL de RPMI 1640) en placas de 24 pocillos (1,8 cm^2 cada pocillo), con los volúmenes de sobrenadante conteniendo los pseudovirus formados, calculados para una dosis sincrónica de, preferiblemente y, siempre que fuese posible, 500 ng de p24, titulado mediante test p24-ELISA (véase apartado 3.7.3. Producción de pseudovirus). Se completaba cada pocillo, hasta un volumen de 1 mL, con medio RPMI 1640 completo. Se añadía a cada condición el polímero catiónico Polybrene® (concentración de trabajo por condición 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para aumentar la eficiencia de adhesión de los virus a las células diana y, en los duplicados preparados como condición negativa, se añadía el anticuerpo neutralizante monoclonal anti-CD4 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para establecer la línea base de infección no productiva, al bloquear el receptor principal de la Env de VIH-1.

Estas células, sembradas con los pseudovirus de cada condición se incubaban durante 2 h en centrifugación suave continua (1.200 rpm) a temperatura ambiente (25°C), para posteriormente incubarlas en reposo (estufa de cultivos a 37°C; 5% de CO_2) durante 4 h.

Pasado este tiempo, se recogían las células infectadas, se centrifugaban (5 minutos, 1.500 rpm) y se les retiraba el medio con los pseudovirus restantes, infructuosos en su infección, resuspendiendo cada condición en 300 μL de medio fresco, para sembrar triplicados de 100 μL en placas de 12 pocillos (3,5 cm^2 cada pocillo) y se completaba cada pocillo, hasta 1 mL de volumen final, con medio RPMI 1640 suplementado.

Tras una incubación de 48 h, se recogían y centrifugaban (5 minutos, 1.500 rpm) estas células, para lavarlas, resuspendiéndolas en 150 μL de solución tampón PBS-1X y pasarlas a una placa de 96 pocillos de fondo cónico, donde se volverían a centrifugar (5 minutos, 1.500 rpm), para aislar el sedimento con las células y, pasarlas finalmente a una placa de 96 pocillos de material opaco blanco (para evitar que la señal de luz de cada pocillo interfiera con la de los pocillos adyacentes), donde las células resuspendidas en 50 μL de PBS-1X eran mezcladas con 50 μL el sustrato de la Luciferasa del kit Steady-Glo (Promega). Tras 20 minutos en agitación continua se podía leer y cuantificar la señal lumínica producida, en el equipo lector de microplacas (Victor™ X5, PerkinElmer).

3.6.6. Ensayos de señalización en entrada viral:

Para estos ensayos recurríamos a un protocolo similar al visto en el apartado “3.7.5. Ensayos de infección viral”, con la salvedad de que en este caso, las células CEM.NKR-CCR5 eran incubadas solo 1 h (1.200 rpm), también con dosis sincrónicas de los pseudovirus cuantificados (500 ng de p24) para cada condición .

80

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

Transcurrido este tiempo, recogíamos estas células y las centrifugábamos (5 minutos, 1.500 rpm, 4°C).

Para los ensayos donde analizábamos la acetilación de la α -tubulina, en respuesta a la señalización sobre CD4 por parte de la Env de VIH-1, realizábamos el lisado de estas células permisivas y procedíamos a realizar análisis bioquímicos por *western blot*, siguiendo el mismo procedimiento que indicamos en el apartado “3.7.4. Análisis bioquímicos por *western blot*”, centrándonos en este caso en el marcaje de la α -tubulina y la α -tubulina acetilada, para calcular el ratio de la forma acetilada de la proteína frente a la α -tubulina total.

Por otro lado, para visualizar la reorganización en forma de pseudópodo de la F-actina en el fenómeno del “capping” y la reorganización de la α -tubulina acetilada, en el mismo polo de la célula, en respuesta a la señalización sobre CD4, mediada por las diferentes Env ensayadas, realizábamos ensayos de inmunofluorescencia en el microscopio confocal de fluorescencia y, las células permisivas sometidas a infección que habíamos recogido se pasaban a una placa de 96 pocillos de fondo cónico en 200 μ L de solución tampón PBS-1X, para comenzar su tratamiento y montaje para ensayos de microscopía.

A continuación se centrifugaba la placa 5 minutos a 1.500 rpm y se resuspendían las células con 200 μ L de la solución de fijación de paraformaldehído al 2%, durante 20 minutos en frío. Con lavado y centrifugación en PBS-1X entre medio, se permeabilizaban ahora las células en 50 μ L de solución de Tritón 0,1 % en PBS-1X. Tras volver a lavar y centrifugar con PBS-1X, el sedimento celular se sometía a sendos marcajes de 1 h con anticuerpo primario contra α -tubulina acetilada y 30 minutos con anticuerpo secundario conjugado con el colorante fluorescente Alexa Fluor™ 488 (es importante a partir de este paso, proteger las muestras de la luz). Tras estos marcajes se lavaban las células y se incubaban 20 minutos en una solución de 5 μ L de faloidina (Alexa Fluor™ 633 Phalloidin) en 200 μ L de PBS-1X, que se une específicamente a los filamentos de actina. El montaje sobre los cristales portaobjetos se realizaba con 2 μ L de la solución de montaje Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich), que contiene DAPI para marcaje del núcleo, resuspendiendo, en esta, 10 μ L de las diferentes condiciones de células, cubriéndolas y sellando con laca los cubres, para dejarlo secar a temperatura ambiente y protegido de la luz toda la noche.

Por último se obtenían imágenes de alta resolución (1024 x 1024 píxeles) en sección media xy de las células, con el objetivo 63X 1.4 OIL del equipo Leica TCS SP8 (Leica microsystem), de campos amplios y de células individuales representativas. El análisis del fenómeno del “capping” producido por las diferentes Env del ensayo se realizaba cuantificando la aparición de dicho fenómeno en campos celulares, por cada 150 células y obteniendo porcentajes de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

cada condición. Las imágenes se analizaban y cuantificaban con el programa MetaMorph (Universal Imaging, Downington, PA).

3.6.7. Ensayos de coimmunoprecipitación:

Para analizar la interacción entre proteínas, realizábamos ensayos de coimmunoprecipitación donde, cotransfectando, en células HEK-293T, construcciones de las proteínas a ensayar, marcadas con etiquetas peptídicas diferentes, podíamos evaluar el arrastre de las proteínas objeto de estudio desde la perspectiva de una u otra proteína del experimento.

Para ello, inicialmente las células, donde habíamos cotransfectado los constructos proteicos marcados, siguiendo las instrucciones indicadas en el apartado “3.7.2. Transfección de plásmidos para ensayos bioquímicos”, eran lisadas con 200 μ L de solución tampón de lisis específica para los experimentos de coimmunoprecipitación, que contiene un extra de inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsufonilo), para asegurar la estabilidad de las proteínas del lisado celular y, se cuantificaba la cantidad total de proteínas del lisado mediante el método del ácido bicinonínico.

Convenía, para ajustar los tiempos del experimento, haber realizado previamente la incubación con anticuerpos de las bolas magnéticas (PureProteome™ Protein G Magnetic Beads, Millipore). Para ello preparábamos 50 μ L de las mismas por cada condición (se cortaba la punta de la pipeta para asegurar la integridad de las bolas magnéticas), que, tras lavar de su solución de almacenamiento con la solución de lavado, específicamente preparada para experimentos de coimmunoprecipitación, se sometían a incubación con 1,5 μ g de los anticuerpos correspondientes, específicos para las etiquetas peptídicas incluidas en los constructos a ensayar (anti-EGFP y anti-HA). La incubación duraba 2 horas, a temperatura ambiente (25°C) y en continua agitación (agitador rotativo para tubos de microcentrífuga), tiempo durante el cual se realizaba la cuantificación proteica de los lisados, previamente mencionada. Una vez terminada la incubación, se lavaban 3 veces las bolas ya recubiertas de anticuerpo, con la solución de lavado preparada. En este momento se añadía, a las bolas magnéticas saturadas de anticuerpo, la cantidad de lisado celular calculada para la misma carga en todas las condiciones (entre 100 y 500 μ g de proteína), asegurándonos guardar una fracción de lisado celular original sin incubar (control de expresión de los constructos proteicos o “INPUT”). Se completaba el volumen en cada condición con la solución de lisis, hasta un total de 650 μ L y, se añadía RNasa A en todas las condiciones (concentración de trabajo de 1 mg/mL), para descartar interacciones debidas a ácidos nucleicos. De esta manera, los lisados celulares eran incubados con las bolas magnéticas saturadas con los

82

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Materiales y Métodos

anticuerpos específicos durante toda la noche, a 4°C y en continua agitación (agitador rotativo para tubos de microcentrífuga).

Al día siguiente, se retiraba el lisado de las bolas, que se guardaría a -20°C y, tras lavar 3 veces las bolas con la solución de lavado, se separaban las proteínas arrastradas de las bolas mediante incubación de 5 minutos, a 95°C, en la solución tampón de carga desnaturizante Laemmli (entre 50 µL cada condición), retirando finalmente las bolas magnéticas y conservando la solución. Las soluciones resultantes de cada condición se someterían a análisis bioquímicos mediante la técnica de *western blot*, así como también los lisados originales "INPUT" (véase el apartado "3.7.4. Análisis bioquímicos por *western blot*"), donde evaluaríamos si las proteínas objeto de estudio habían interactuado, apareciendo en este caso en la fracción arrastrada y, comprobando la correcta expresión de todos los constructos en los lisados originales.

Cabe destacar que la separación de las bolas magnéticas de las diferentes soluciones de lavado y lisados, a las que eran sometidas, se realizaba mediante una gradilla magnética, que permitía mantener las bolas, mientras se les retiraba la solución en la cual se hallaban suspendidas.

3.6.8. Procesado de datos y análisis estadísticos:

Para los análisis estadísticos y elaboración de histogramas de los resultados de los experimentos, se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Para comparar 2 grupos de datos se realizaba comparación de medianas aplicando un test no paramétrico de Mann-Whitney. Para evaluar la variación en la cantidad de las proteínas objeto de estudio o en la aparición del fenómeno del "capping", se analizaba la significancia en la comparación de medias entre distintas condiciones experimentales y control, aplicando test paramétricos t Student.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

RESULTADOS



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

4.1. LAS PROTEÍNAS ENV DEL VIH-1, DE UN CLÚSTER DE PACIENTES LTNP-EC, SON FUNCIONALMENTE DEFICIENTES EN SU ACTIVIDAD SEÑALIZADORA SOBRE EL RECEPTOR CD4 E INFECTIVA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL CICLO VIRAL:

Antes de empezar, es importante destacar que, los resultados referentes al primer objetivo de esta Tesis Doctoral, que se expondrán a continuación, pertenecen a un trabajo colaborativo enmarcado en la Red Española de Investigación en SIDA (RETIC-RIS) del Instituto Carlos III, junto con los grupos de investigación del Dr. Cecilio López, de la Unidad de Virología Molecular, del Centro Nacional de Microbiología (CNM, perteneciente al ISCiii); y el grupo del Dr. Julià Blanco, del Instituto de Investigación del Sida IrsiCaixa. Asimismo, los resultados que aquí serán descritos, corresponden, al trabajo, con el que contribuimos, en nuestro laboratorio, a dicha investigación, publicada en el artículo de 2018 "Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers" (Casado et al. 2018), del que soy coautor (Artículo incluido en el apartado 8. ANEXO DE PUBLICACIONES), durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Las conclusiones derivadas de estos resultados concretos, se complementarán y cobrarán importancia, por lo tanto, en el contexto del estudio completo, como será reflejado, de manera lógica, en el apartado de "DISCUSIÓN" del manuscrito de esta Tesis Doctoral.

4.1.1. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, producen una escasa infección, en comparación con Env control y de pacientes crónicos progresores:

Fruto de décadas de trabajo en la investigación del virus del VIH-1 en España, por parte de nuestros colaboradores, los doctores Cecilio López y Concepción Casado, podíamos disponer en este proyecto de los plásmidos de Env procedentes de pacientes de diferentes grupos de control de la enfermedad (Casado et al. 2013), para estudiar su funcionalidad e importancia en los procesos que conciernen a la entrada viral (descripción detallada de la procedencia y selección de las Env objeto de estudio, así como las Env control, en el apartado "MATERIALES Y MÉTODOS"). Para estudiar si las Env aisladas y seleccionadas de los pacientes LTNP-EC eran responsables de una deficiente entrada viral, en comparación con las Env de referencia de laboratorio SF_162 y 89ES_061, así como frente a las Env de diferentes pacientes progresores crónicos seleccionados como control; se realizaron ensayos de infección viral, que nos permitieron producir, sobre el mismo cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E, partículas virales de un solo ciclo que contenían el gen reportero *Luc* (Luciferasa), con cada una de las Env que queríamos estudiar, para infectar entonces células permisivas CEM.NKR-CCR5 en una cantidad de pseudovirus igual para cada condición y, cuantificar en estas la infección producida,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

a través de la señal de luz generada por la actividad de la proteína luciferasa (**Fig. 1**).

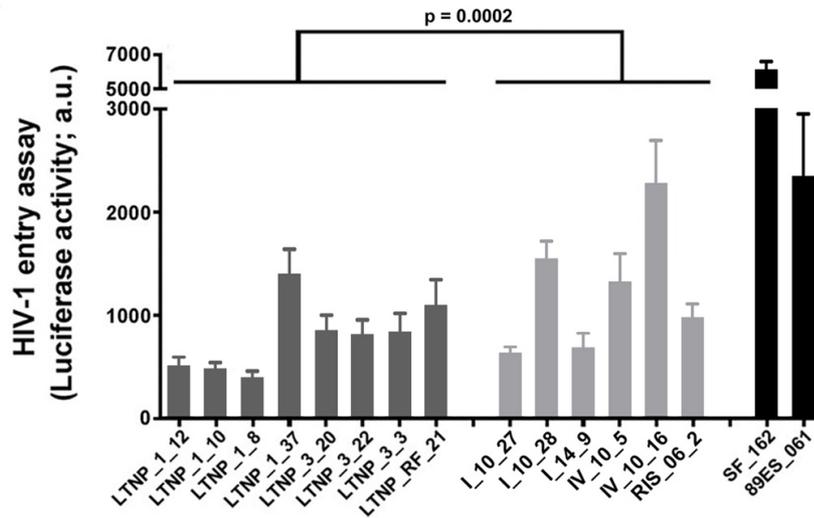


Figura 1. Análisis de la eficiencia en la entrada viral de diferentes proteínas de la Env de VIH-1, procedentes de pacientes LTNP-EC y pacientes control. Ensayo mediante la lectura de la actividad luciferasa, para medir la infección y entrada viral en células permisivas CEM.NKR-CCR5, a través de pseudovirus producidos, usando pNL4-3.Luc.R^E, con Env pertenecientes al clúster de pacientes LTNP-EC (barras grises oscuras) y de progresores (barras grises claras). Las barras negras corresponden a Env de referencia. Como control se usa anticuerpo neutralizante anti-CD4 (5µg/mL), para establecer la línea base de infección no productiva, en cada una de las condiciones (n=10, cada experimento realizado por triplicados, se indica el P-valor obtenido comparando la diferencia medianas entre ambos, aplicando un test no paramétrico de Mann-Whitney. Medida de la actividad luciferasa en unidades arbitrarias de luz (a.u.). Esta figura corresponde a la figura 2 B) del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018).

Podemos observar cómo, en comparación con las Env de referencia (barras en histograma **Fig. 1**) y los controles derivados de pacientes progresores crónicos (barras gris claro **Fig. 1**), las Env objeto de estudio (barras gris oscuro **Fig. 1**) producían una señal significativamente inferior ($p=0,0002$), es decir, estas Env infectaban en menor medida en nuestros experimentos. La deficiente capacidad para promover esta primera etapa de la infección viral, por parte de estas Env, concuerda con el perfil clínico LTNP-EC de los pacientes del clúster del que provienen.

4.1.2. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, promueven una menor acetilación de la α -tubulina en el proceso de la entrada viral:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

Teniendo en cuenta que se ha descrito que, para que se produzca una infección eficiente en el VIH-1, el contacto entre la proteína gp120 de la Env y el receptor CD4 de las células permisivas ha de promover una reorganización del citoesqueleto por acetilación de la α -tubulina, suficiente para superar la barrera que presenta la enzima HDAC6 endógena, mediante su actividad catalítica desacetiladora de la α -tubulina acetilada (Valenzuela-Fernández et al. 2005); se evaluó, entonces, la capacidad de las Env de pacientes LTNP-EC que estábamos estudiando, para promover dicha señalización, que produciría la estabilización de la α -tubulina acetilada, con respecto a la capacidad para promover el mismo fenómeno, de las Env de pacientes progresores y Env de referencia.

Se desarrollaron para ello, experimentos de infección temprana de células permisivas CEM.NKR-CCR5, usando pseudovirus producidos con las diferentes Env descritas. De estas células infectadas se realizaron ensayos bioquímicos de *western blot* (**Fig. 2**), para cuantificar el nivel de acetilación de la α -tubulina, relacionado pues, con las señales que promueven las primeras fases de la infección.

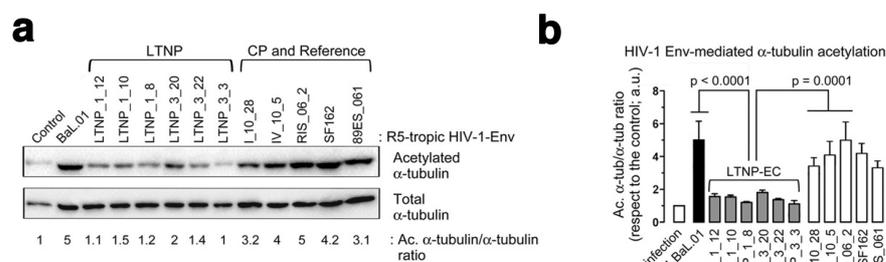


Figura 2. Efecto de las diferentes Env de VIH-1 en la acetilación de la α -tubulina. **a)** Análisis cuantitativos por *western blot* de la acetilación de tubulina, inducida por las Env procedentes de LTNP-EC, en células permisivas CEM.NKR-CCR5, comparada con las Env de cepas virales de pacientes progresores crónicos (CP) y Env de referencia. Se representa el ratio de tubulina acetilada frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. **b)** En las mismas condiciones descritas, histogramas mostrando las cuantificaciones la α -tubulina acetilada, frente a la cantidad total de tubulina (n=6, media +/- SEM). Se indica el P-valor obtenido aplicando un test t Student. Ratios de α -tubulina acetilada / α -tubulina en unidades arbitrarias de luz (a.u). Esta figura corresponde a las figuras 5 A) y B) del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018).

En estos experimentos se observa que, las Env procedentes de los pacientes LTNP-EC (barras gris oscuro **Fig. 2**) promovían una estabilización de la α -tubulina significativamente menor ($p < 0,0001$) que si las comparáramos con la Env de referencia Bal.01 (barra negra **Fig. 2**), así como frente a las Env del grupo de los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

progresores crónicos (barras blancas **Fig. 2**) ($p=0,0001$), las cuales, de hecho, presentaban una estabilización de la α -tubulina estadísticamente no diferenciable de la promovida por BaL.01.

4.1.3. Las Env de pacientes LTNP-EC del clúster estudiado, promueven una insuficiente reorganización del citoesqueleto de actina hacia un polo de la célula (“capping”), fenómeno necesario para la correcta entrada viral:

Así como habíamos descrito la deficiente señalización para modificar el citoesqueleto, incrementando la acetilación de la α -tubulina, por parte de las Env de los pacientes del clúster LTNP-EC, teníamos que estudiar si otro proceso, también característico de la señalización de Env sobre su receptor CD4 y, necesario en la infección viral, estaba ocurriendo. Este es el proceso conocido como “capping”; una serie de eventos que desencadenan la reorganización del citoesqueleto de actina para permitir el acumulo de los receptores y correceptores celulares, usados por el virus, en una estructura polarizada de tipo pseudópodo, que es fundamental para la entrada viral (Jiménez-Baranda et al. 2007; Barrero-Villar et al. 2009; García-Expósito et al. 2013). Es más, se describe como, la eficiente infección por VIH-1 se produce cuando las señales promovidas por la Env son lo suficientemente fuertes para la presentación de este fenómeno del “capping”, en al menos, entre el 20 y el 30% de las células del experimento (Barrero-Villar et al. 2009; García-Expósito et al. 2013).

Mediante microscopía confocal de fluorescencia, se analizó y cuantificó la aparición de este fenómeno de polarización del citoesqueleto de actina en estructuras de pseudópodo, así como la colocalización con la α -tubulina acetilada, en células permisivas CEM.NKR-CCR5, las cuales habían sido infectadas con pseudovirus que portaban varias de nuestras Env de pacientes LTNP-EC, así como Env de pacientes progresores crónicos y Env de referencia control (**Fig. 3**).

Resultados

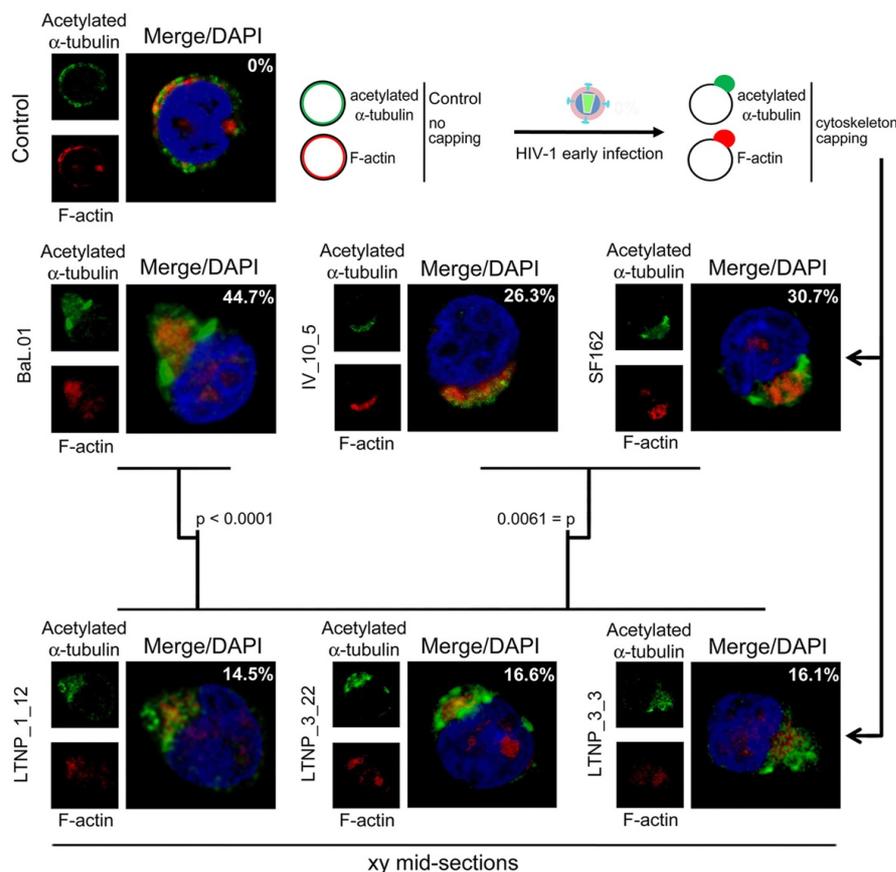


Figura 3. Efecto de las diferentes proteínas Env de VIH-1 en la reorganización de la α -tubulina acetilada y la F-actina, para la formación del fenómeno del “capping”. Imágenes de microscopía fluorescente confocal representativas de la redistribución de la tubulina acetilada y del citoesqueleto de actina, dando lugar a la formación de pseudópodos, en diferentes condiciones de células permisivas, infectadas con pseudovirus portando Env control de referencia, Env de LTNP-EC, así como células no infectadas control. Las imágenes compuestas muestran el núcleo de las células, marcado con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Cada imagen muestra un experimento representativo de 6, donde el porcentaje se obtiene del conteo en campos, de las células que muestran dicho patrón, por cada 150 de estas. Se indica el *P* valor obtenido aplicando un test t Student. Se muestra un esquema que representa las morfologías y perfiles del citoesqueleto observados. Esta figura corresponde a la figura 5 C) del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018).

Con estos experimentos observamos que tanto las Env de referencia BaL.01 y SF162, como la Env seleccionada de paciente controlador IV_10_5, promovían la codistribución de la α -tubulina acetilada y la F-actina en estructuras de

Resultados

pseudópodo características del “capping”, en porcentajes del 44,7, 30,7 y el 26,3% respectivamente (**Fig. 3 centro**). Estos porcentajes eran significativamente diferentes ($p=0,0061$) a los mostrados por las Env de pacientes LTNP-EC ensayadas (**Fig. 3 abajo**), las cuales mostraban este fenómeno solo entre un 14,5 y un 16,6 % de las células contabilizadas en campos aleatorios. Este bajo porcentaje indicaba una deficiencia en estas Env para mediar en la reorganización de la F-actina e inducir el “capping” y, por ende, una débil actividad señalizadora sobre CD4 de las Env de estos pacientes LTNP-EC en el proceso de entrada viral.

4.1.4. Revertir las mutaciones de una Env, que la diferenciaban del resto del clúster, hace que reduzca su infectividad a un nivel comparable a otra de las Env LTNP-EC estudiadas:

Una de las Env del clúster LTNP-EC estudiado, la denominada AS7, provenía de una paciente de la que no se había podido seguir la evolución clínica y solo se disponía de una muestra, con virus detectable, de 1989. Esta Env poseía 11 mutaciones de aminoácidos inusuales que se habían descrito características de este clúster (Casado et al. 2013), pero también presentaba 3 mutaciones adicionales que la diferenciaban del resto de Env de virus del clúster. Nuestros colaboradores de la Unidad de Virología Molecular del CNM (ISCiii) de Madrid lograron revertir dichas mutaciones a los residuos presentes en el resto de Env del clúster estudiado, dando lugar a las Env mutantes: AS7_I140T, AS7_V279A y AS7_I400T, con mutaciones, en la subunidad gp120 del complejo viral Env, en los residuos de aminoácido 140 (región o dominio variable V1), 279 (dominio constante C2) y 400 (dominio variable V4), respectivamente.

Para analizar la funcionalidad de dichas Env, se realizaron ensayos de infección viral donde produjimos pseudovirus con estas Env mutantes, así como con la Env AS7 original, la Env del clúster LTNP_1_12 y la Env de referencia BaL.01, como control. Estas envueltas se produjeron sobre el mismo cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E', de manera que pudiésemos generar partículas virales de un solo ciclo conteniendo el gen reportero *luc*, con las que infectar células permisivas CEM.NKR-CCR5, en cantidades de pseudovirus sincrónicas y, cuantificar la infección producida midiendo la señal de luz debida a la actividad de la proteína Luciferasa (**Fig. 4**).

Resultados

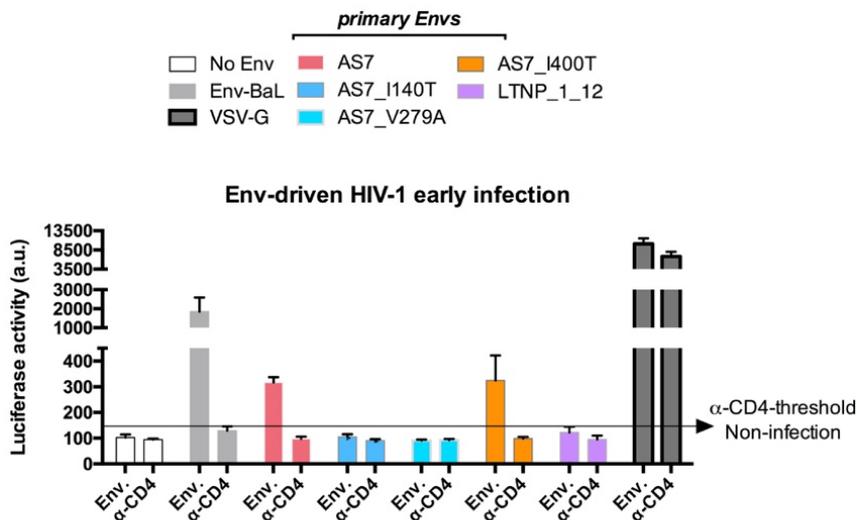


Figura 4. Análisis de la eficiencia en la entrada viral de Env mutantes derivadas del virus AS7, con mutaciones que reversionen su secuencia a la presente en las Env del clúster LTNP-EC. Ensayo mediante la lectura de la actividad luciferasa, para medir la infección y entrada viral en células permisivas CEM.NKR-CCRS, a través de pseudovirus producidos, usando pNL4-3.Luc.RE⁺, con la Env AS7, así como los mutantes derivados de esta: AS7_I140T, AS7_V279A y AS7_I400T. Se incluyen también como control, la Env del clúster, LTNP_1_12 y la de Env de referencia BaL.01. Se incluyen réplicas de cada condición con anticuerpo neutralizante anti-CD4 (5µg/mL), para establecer la línea base de infección no productiva y, se muestra la infección no dependiente de CD4 mediada por la Env VSV-G, como control de la calidad de la producción viral. Código de color del histograma explicado en la leyenda (n=6, cada experimento realizado por triplicado). Medida de la actividad luciferasa en unidades arbitrarias de luz (a.u.). Esta figura corresponde a la figura 6 B) del trabajo de Casado y colaboradores (Casado et al. 2018)

A la vista de estos experimentos se observa que, mientras que la Env AS7 original presentaba cierta infección, limitada pero detectable, las Env mutantes AS7_I140T y AS7_V279A presentaban una señal cercana a la señal basal y a la condición de inhibición mediante el anticuerpo anti-CD4 (5µg/mL), de manera comparable a la observada en la Env LTNP_1_12. Sin embargo, la Env con la mutación sobre el dominio V4, AS7_I400T, seguía demostrando una infección limitada comparable a la Env AS7 de la que provenía.

Se comprobaba de esta forma que ciertos residuos de aminoácidos inusuales en la proteína gp120 Env, característicos de este clúster, estaban relacionados con su limitada funcionalidad para mediar la infección viral.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

4.2. HDAC6 INTERACCIONA CON PR55-GAG Y PROMUEVE SU DEGRADACIÓN, Y ESTE FENÓMENO OCURRE DE MANERA INDEPENDIENTE A SU DOMINIO BUZ DE UNIÓN A UBIQUITINA:

4.2.1. Los constructos de HDAC6 delecionados en el dominio BUZ, inducen la degradación de Pr55-Gag con una eficiencia comparable a los constructos funcionales completos wt-HDAC6:

Teniendo en cuenta, experimentos y trabajos previos de nuestro laboratorio, algunos publicados en artículos de revistas científicas indexadas (Valera et al. 2015; Marrero-Hernandez et al. 2019; de Armas-Rillo 2017) donde se evidenciaba la afectación de la estabilidad de Pr55-Gag por parte de HDAC6, se hacía necesaria una más profunda caracterización de las características de la relación entre estas dos proteínas y la interacción, si finalmente la hubiese, entre las mismas.

Queríamos dilucidar si había una de la influencia o si era necesario el dominio BUZ (Kawaguchi et al. 2003) para la acción degradativa o desestabilizadora de la enzima HDAC6 sobre la poliproteína del VIH-1 Pr55-Gag. Este dominio aparece en la literatura científica definido también como ZnF-UBP (Seigneurin-Berny et al. 2001), DAUP (en inglés, “deacetylase-ubiquitin-specific protease”) (Amerik, Li, and Hochstrasser 2000), dedo HUB (en inglés, “HDAC6-, USP3- and BRAP2-related”) (Bertos, Wang, and Yang 2001) y PAZ (en inglés, “polyubiquitin-associated zinc finger”) (Hook et al. 2002); pero, consensualmente, en este trabajo, nos referiremos al mismo, como dominio BUZ. La influencia de BUZ en esta acción degradativa, en un principio resultaba previsible, debido a la reconocida afinidad del dominio BUZ de HDAC6 por la ubiquitina (Valera et al. 2015) y a la capacidad de Pr55-Gag de mono o di-ubiquitinarse en ciertas lisinas ubicadas en sus diferentes dominios, un proceso que se había descrito fundamental para su unión a membrana y la gemación de los nuevos viriones formados (Jäger, Gottwein, and Kräusslich 2007; Sette et al. 2013). Además, experimentos previos del laboratorio apuntaban en esta dirección.

Por ello, para poder caracterizar esta influencia de BUZ y describir, más profundamente, de qué manera HDAC6 mediaba la degradación de Pr55-Gag, se realizaron estudios bioquímicos, mediante análisis de *western blot*, donde se expresaba, en células HEK-293T, el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E, junto con la proteína Env de referencia de VIH-1 BaL.01, en condiciones de sobreexpresión sucesiva de 1 y 2 µg, de tres constructos diferentes de HDAC6 marcados con la etiqueta proteica “Influenza haemagglutinin” (HA) en su extremo N-terminal: el constructo de HDAC6 funcional, en su forma completa o salvaje (wt-HDAC6), su doble mutante, inactivo en su función desacetilasa en sus dominios hdac (“dead-mutant” (dm)-HDAC6), y el mutante objeto de estudio, el constructo de HDAC6 delecionado en el dominio BUZ (HDAC6-ΔBUZ). Se cuantificó entonces la cantidad

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

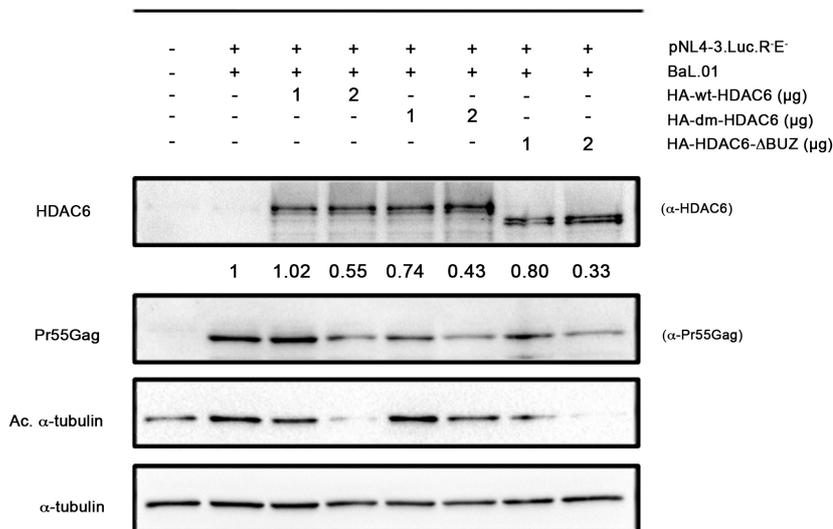
Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

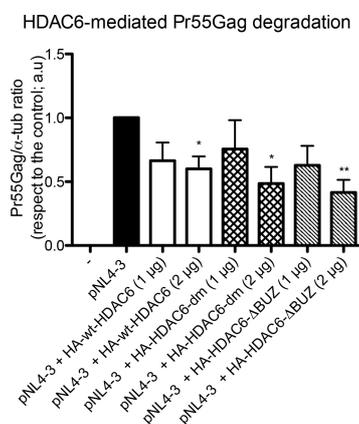
Resultados

de Pr55-Gag como medida resultante de la degradación por parte de cada variante de HDAC6 (Figura 5).

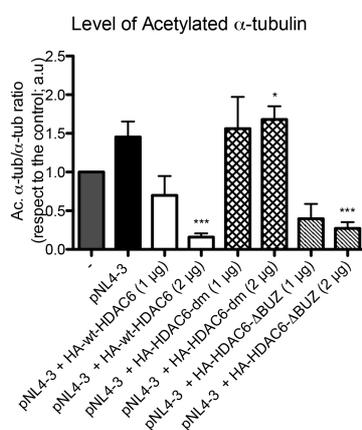
a



b



c



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Resultados

Figura 5. Efecto de la enzima HDAC6 en la estabilidad de Pr55-Gag, evaluando la influencia de sus dominios catalíticos y BUZ **a)** Imagen representativa de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag, mediante la sobreexpresión en HEK-293T de HA-wt-HDAC6, HA-dm-HDAC6 y HA-HDAC6-ΔBUZ (1 μg y 2 μg, cada uno, sucesivamente), cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.RE⁻ (1 μg) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1μg). Se muestra la banda de α-tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α-tubulina. **b)** En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando el cuerpo viral y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. **c)** En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la cantidad de α-tubulina acetilada frente a la cantidad de α-tubulina total; valores normalizados respecto al control negativo. (n=5 mínima de experimentos independientes, media +/-SEM). Cuando se indique, **P* < 0,05 ; ***P* < 0,01 y ****P* < 0,001 representan *P*-valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u).

Podemos observar, a partir de estos experimentos, como a medida que el constructo HDAC6-ΔBUZ era sobreexpresado, la variación en la cantidad de Pr55-Gag (**Fig.5 b**) presentaba una tendencia a la baja y, de hecho, cuando se sobreexpresaron 2 μg de este constructo carente del dominio BUZ, la medida de Pr55-Gag era significativamente menor (*p*<0,05) a la condición control sin expresión de ningún HDAC6 de origen exógeno. Asimismo, la degradación causada por las dos cantidades expresadas de HDAC6-ΔBUZ era comparable a la causada por las mismas cantidades de constructo funcional wt-HDAC6 (no había diferencia significativa entre ambas). Dicho constructo wt-HDAC6 manifestaba también una diferencia significativa en la medida de Pr55-Gag, en la condición de 2 μg, en concordancia con la degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6 ya descrita. El constructo con mutaciones en ambos dominios catalíticos, que impiden su actividad desacetiladora, también presentaba una variación en la cantidad de Pr55-Gag, que se manifestaba de manera significativa (*p*<0,01) cuando se sobreexpresaban 2 μg. Se analizó también la variación en la cantidad de α-tubulina acetilada (**Fig.5 c**), como medida de la actividad catalítica de los constructos de HDAC6 expresados. El nivel de la α-tubulina acetilada en los constructos HDAC6-ΔBUZ y wt-HDAC6 descendía de manera significativa (*p*<0,001) en las condiciones de 2 μg, frente al control negativo, indicando una intensa actividad desacetilasa en esas cantidades, mientras que el constructo con dicha actividad catalítica impedida, no mediaba un descenso e, incluso, presentaba un incremento, ligero pero significativo, (*p*<0,05) al sobreexpresar 2 μg.

En este experimento, la ausencia del dominio BUZ no resultaba un impedimento para la eficaz acción degradativa del HDAC6-ΔBUZ sobre Pr55-Gag, de manera que promovía una degradación comparable a la forma completa wt-HDAC6. Por otro lado, si bien la actividad desacetiladora α-tubulina estaba claramente mermada en el mutante dm-HDAC6 usado, se observaba una variación en la cantidad de Pr55-Gag al llegar a los 2 μg de sobreexpresión de este constructo.

Resultados

Los sobrenadantes resultantes de dichos experimentos (**Fig. 5**), que contenían los pseudovirus formados bajo cada una de las condiciones descritas, fueron a su vez sometidos a una cuantificación de la proteína viral CA-p24 mediante test p24-ELISA cuantitativo, para evaluar como afectaba la variante HDAC6- Δ BUZ a la producción viral, así como la forma wt-HDAC6 y dm-HDAC6, de manera que comprobásemos si había alguna diferencia frente a estas, al no presentar el dominio BUZ (**Fig. 6**).

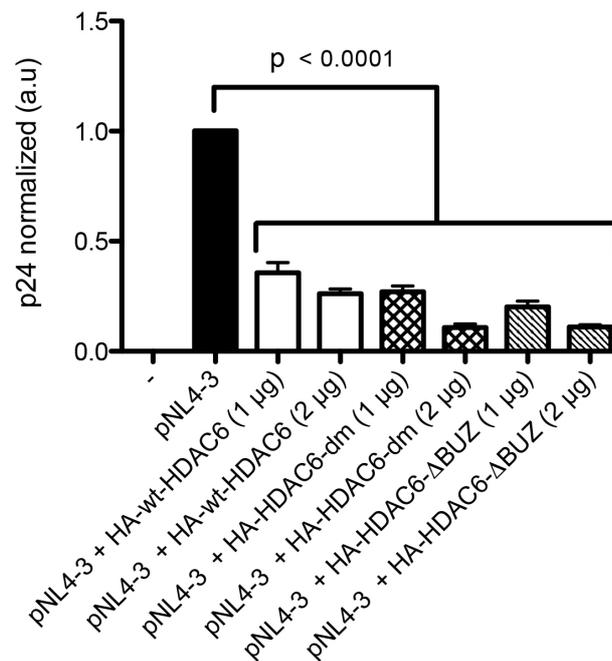


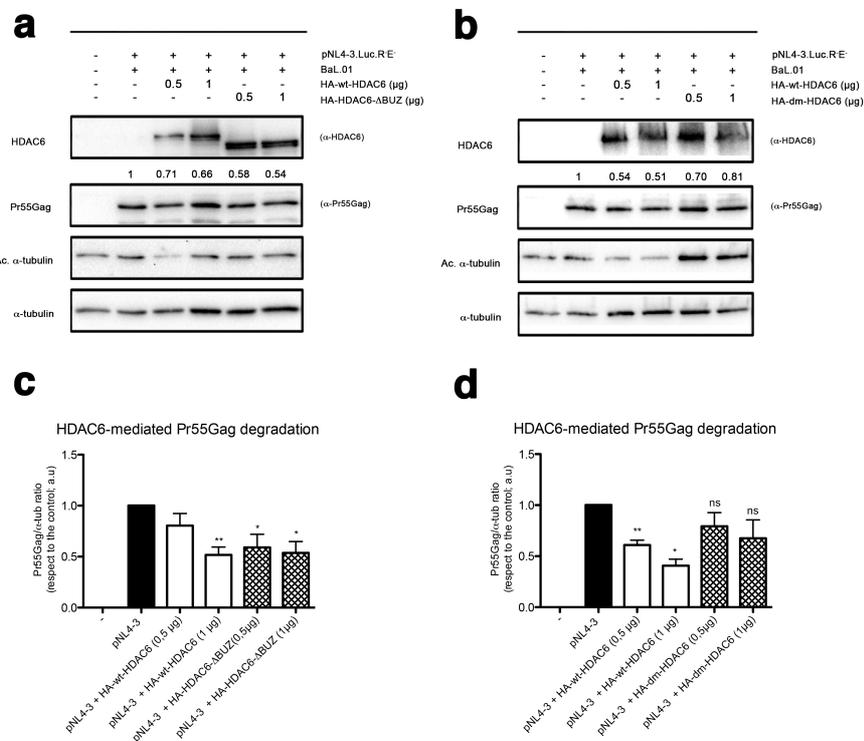
Figura 6. Efecto de la enzima HDAC6 en la producción viral, dependiendo de sus dominios catalíticos y BUZ. Análisis cuantitativo de la producción viral, mediante test p24-ELISA cuantitativo, en sobrenadantes de células HEK-293T donde se han sobreexpresado constructos de HA-wt-HDAC6, HA-dm-HDAC6 y HA-HDAC6- Δ BUZ (1 μ g y 2 μ g, cada uno, sucesivamente), cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.RE' (1 μ g) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1 μ g). Valores normalizados respecto al control negativo sin producción viral. (n=6 de experimentos independientes, media +/-SEM). Se indica el P valor obtenido aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u.).

En todos los casos se aprecia cómo, la sobreexpresión de cualquier variante de HDAC6, en las cantidades elegidas de 1 y 2 μ g, afectaba a la producción viral, reduciendo la cantidad de pseudovirus producidos muy significativamente ($p < 0,0001$) frente al control, donde se producían virus en condiciones de HDAC6 endógeno. En sintonía, por lo tanto, con los resultados obtenidos cuando medimos

Resultados

la degradación de Pr55-Gag, la producción viral se veía notablemente mermada aun en ausencia del dominio BUZ, por lo que se correspondía el perfil degradativo de HDAC6-ΔBUZ entre ambos experimentos (**Fig. 5 y Fig. 6**).

Se realizaron también experimentos similares pero esta vez probando cantidades menores de los constructos de HDAC6, de manera que pudiésemos evaluar si el HDAC6-ΔBUZ podía mostrar una diferencia en la degradación de Pr55-Gag, cuando se realizaba una sobreexpresión más modesta. Para ello, junto con el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E y la envuelta BaL.01, se sobreexpresaron, en este caso, 0,5 y 1 µg, de HDAC6-ΔBUZ frente a las mismas cantidades de wt-HDAC6, así como el mutante truncado en su actividad catalítica dm-HDAC6, también frente a wt-HDAC6, en las mismas condiciones (**Fig.7**).



Resultados

Figura 7. Efecto de la enzima HDAC6 en la estabilidad de Pr55-Gag, evaluando la influencia de sus dominios catalíticos y BUZ **a)** y **b)** Imágenes representativas de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag, mediante la sobreexpresión en HEK-293T del constructo funcional HA-wt-HDAC6, junto con uno de sus constructos mutantes: HA-HDAC6-ΔBUZ o HA-dm-HDAC6, respectivamente (0,5 μg y 1 μg, cada uno, sucesivamente). Se cotransfectaron con cuerpo viral pNL4-3.Luc.RE (1 μg) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1μg). Se muestra la banda de α-tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α-tubulina. **b)** y **d)** En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando el cuerpo viral y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. (n=5 mínima de experimentos independientes, media +/-SEM). Cuando se indique, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ representan P -valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u).

En estos experimentos observamos una degradación de Pr55-Gag por parte del constructo HDAC6-ΔBUZ (**Fig. 7 a y b**) que era significativa ($p < 0,05$) para ambas condiciones sobreexpresadas (0,5 y 1 μg) y que no difería estadísticamente de las degradaciones promovidas por la forma wt-HDAC6, aunque en estos experimentos concretos, la degradación promovida por este constructo funcional, a 0,5 μg de sobreexpresión, no resultaba significativa en comparación con el control, mas sí resultaba significativa en el caso de la degradación promovida por 1 μg de dicho wt-HDAC6. En estos experimentos, el mutante carente de actividad desacetilasa, dm-HDAC6 (**Fig. 7 c y d**), no producía sino una tendencia, no significativa, a degradar Pr55-Gag, mientras que aquí la forma wt-HDAC6 expresada sí que promovía la degradación de Pr55-Gag, en ambas concentraciones de plásmido sobreexpresado, de manera significativa (0,5 μg $p < 0,01$; 1 μg $p < 0,05$). La aparente actividad degradativa de un HDAC6 carente del dominio BUZ, sobre Pr55-Gag, seguía manifestándose en estas condiciones, más en el caso del dm-HDAC6 no promovía significativamente, con estas cantidades, dicha degradación, en consonancia con las observaciones previas de nuestro laboratorio (de Armas-Rillo 2017).

Para descartar un posible error de observación, en los datos de degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6-ΔBUZ, debido a los constructos concretos marcados con la etiqueta HA, que estábamos utilizando, realizamos también estos ensayos de degradación usando constructos marcados con la etiqueta proteica fluorescente "Discosoma Red fluorescent protein (DsRed)", en el extremo N-terminal. Sobreexpresamos, en líneas celulares HEK-293T, los constructos DsRed-wt-HDAC6 y DsRed-HDAC6-ΔBUZ, sucesivamente, en cantidades de 0,5 y 1 μg de sobreexpresión, que, en los experimentos previos, habíamos identificado suficientes para observar la degradación mediada por los constructos HDAC6-ΔBUZ y wt-HDAC6. Con los lisados celulares resultantes, realizamos estudios bioquímicos, mediante análisis de WB, para cuantificar la degradación de Pr55-Gag, promovida por estos constructos DsRed (**Fig. 8**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Resultados

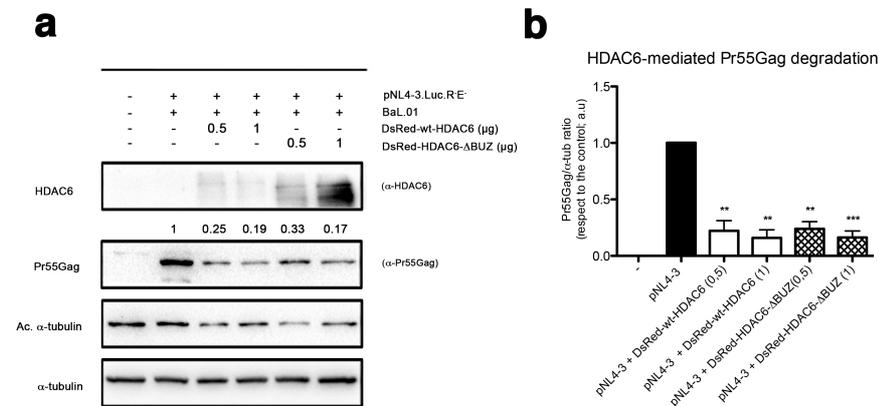


Figura 8. Efecto de la enzima HDAC6, fusionada en su extremo N-terminal con otra etiqueta fluorescente (DsRed), en la estabilidad de Pr55-Gag, evaluando la importancia de su dominio BUZ **a**) Imagen representativa de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag, mediante la sobreexpresión en HEK-293T de DsRed-wt-HDAC6 y DsRed-HDAC6-ΔBUZ (0,5 µg y 1 µg, cada uno, sucesivamente), cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.R^E (1 µg) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1µg). Se muestra la banda de α-tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α-tubulina. **b**) En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando el cuerpo viral y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. (n=4 de experimentos independientes, media +/-SEM). Cuando se indique, ***P* < 0,01 y ****P* < 0,001 representan *P*-valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u).

Comprobamos con estos experimentos que, cambiando la etiqueta usada para marcar los constructos, en este caso DsRed, la forma de HDAC6 deletada en su dominio BUZ seguía promoviendo el descenso de la cantidad de Pr55-Gag de forma significativa, en ambas condiciones (0,5 µg *p*<0,01; 1 µg *p*<0,001), así como también lo hacía el constructo funcional wt-HDAC6 (*p*<0,01, ambas concentraciones de plásmido). Es más, las degradaciones mediadas por ambos constructos (HDAC6-ΔBUZ y wt-HDAC6), en sintonía con los experimentos previos de este objetivo de la tesis, no eran estadísticamente diferenciables.

4.2.2. Pr55-Gag interacciona (coimmunoprecipita) con HDAC6, así como con una forma carente del dominio BUZ (HDAC6-ΔBUZ):

Una vez identificada una afectación a la estabilidad de Pr55-Gag por parte de constructos de HDAC6 que no contenían el dominio BUZ, en una medida comparable a la promovida por la forma wt-HDAC6, resultaba necesario estudiar si había una interacción física entre estas proteínas, de manera que debíamos

Resultados

demostrar que estas proteínas interactuaban directa o indirectamente y, dilucidar si esta interacción era posible entre Pr55-Gag y el constructo HDAC6- Δ BUZ.

Para ello se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación que incluía tanto la forma wt-HDAC6 funcional de HDAC6, como su constructo deleciónado en BUZ, HDAC6- Δ BUZ, para averiguar si estos interactuaban con Pr55-Gag.

Se sobreexpresaron, en células HEK-293T, los constructos de HDAC6 marcados con la etiqueta HA en el extremo N-terminal, HA-wt-HDAC6 y HA-HDAC6- Δ BUZ, junto con el constructo de Pr55-Gag clonado en fase de lectura en el gen de la proteína verde fluorescente EGFP, de manera que, mediante el empleo de bolas magnéticas con anticuerpos acoplados que reconocen las proteínas EGFP y HA, usadas como etiqueta, pudiésemos arrastrar las proteínas marcadas de los lisados celulares y comprobar si detectábamos la proteína contraparte, en caso de existir la interacción. Estos experimentos se realizaron, arrastrado paralelamente, bien a través de EGFP (desde Gag-EGFP) o bien a través del marcador HA (desde los constructos de HDAC6). Cabe destacar que, debido a la conocida afinidad por los ácidos nucleicos del dominio NC de Pr55-Gag (De Guzman et al. 1998), estos experimentos se realizaron añadiendo la ribonucleasa degradativa del ARN monocatenario, RNAsa A (1 mg/mL), en todas las condiciones, descartando así posibles interacciones mediadas por ácidos nucleicos. Se realizaron análisis bioquímicos mediante la técnica de *western blot* con los lisados resultantes de estas coimmunoprecipitaciones (**Fig. 9 a y b**), así como con los lisados originales, mostrando la carga total de proteína ("input"), de los que derivan estas, para comprobar la correcta expresión de todos los constructos incluidos en el experimento (**Fig. 9 c y d**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

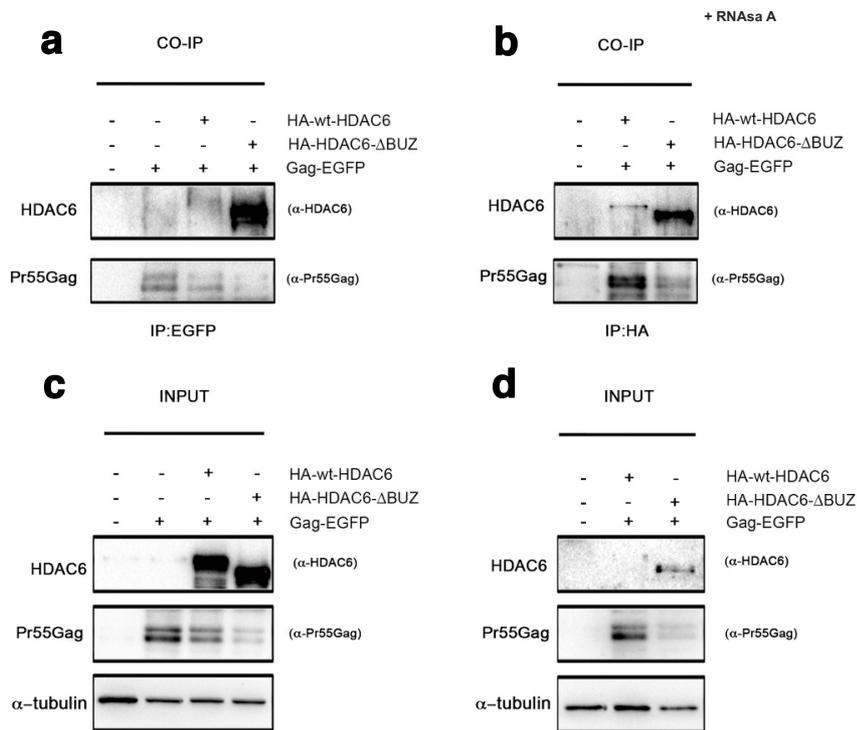


Figura 9. Co-IP de HDAC6 y Pr55-Gag. Estudio de la habilidad de HDAC6, con o sin su dominio BUZ, de coimmunoprecipitar con Pr55-Gag **a)** Imagen de *western blot* de la fracción sometida a incubación y coimmunoprecipitación, con anticuerpo anti-EGFP, de lisados celulares de HEK-293T expresando Gag-EGFP, cotransfectado con HA-wt-HDAC6 y HA-HDAC6-ΔBUZ (1 μg, cada uno, sucesivamente) **b)** Al igual que en **a)**, lisados celulares de HEK-293T expresando Gag-EGFP, cotransfectado con HA-wt-HDAC6 y HA-HDAC6-ΔBUZ (1 μg, cada uno, sucesivamente), son incubados y coimmunoprecipitados, esta vez con anticuerpo anti-HA. **c)** y **d)** corresponden a las imágenes de análisis por *western blot* de las fracciones de los respectivos lisados celulares de **a)** y **b)**, sin haber sido sometidas a coimmunoprecipitación. Control de carga representado por la α-tubulina. Las incubaciones se realizan en presencia de enzima RNasa A (1 mg/mL), para descartar posibles interacciones mediadas por ácidos nucleicos.

Se puede apreciar en estos experimentos paralelos como, cuando arrastráramos el constructo Gag-EGP, podíamos detectar tanto la forma wt-HDAC6 como HDAC6-ΔBUZ, en sus respectivos lisados, así como el HDAC6 endógeno, cuando no sobreexpresábamos ninguna forma de esta enzima (**Fig. 9 a**). Asimismo, cuando arrastráramos los constructos de HDAC6 a través de su etiqueta HA, tanto en el caso de HA-wt-HDAC6 como con el constructo HA-HDAC6-ΔBUZ, detectábamos la presencia de la proteína Pr55-Gag en el lisado sometido a coimmunoprecipitación (**Fig. 9 b**). Por lo tanto, podíamos describir una interacción directa o indirecta de Pr55-Gag con HDAC6, donde la presencia del dominio BUZ de unión a ubiquitina no era fundamental para la interacción entre estas proteínas. Dicha observación,

Resultados

además, estaba en consonancia con los experimentos previos, donde encontrábamos que la degradación mediada por el constructo HDAC- Δ BUZ era comparable a la que promovía la forma funcional wt-HDAC6 de la enzima.

4.2.3. HDAC6- Δ BUZ promueve la degradación de Pr55-Gag por la ruta autofágica, de forma comparable a la enzima HDAC6:

El trabajo realizado por nuestro equipo de investigación había demostrado que la degradación de la poliproteína Pr55-Gag promovida por la enzima HDAC6 ocurría, al menos en último término, por la ruta autofágica, mediante el uso de inhibidores específicos de dicha ruta como la 3-metiladenina (3-MA) (Marrero-Hernandez et al. 2019). Los experimentos presentados previamente en el desarrollo de esta tesis, indicaban una degradación por parte de HDAC6- Δ BUZ comparable a la promovida por la enzima completa, así como una interacción entre HDAC6 y Pr55-Gag no dependiente de la presencia del dominio BUZ. Pero si queríamos demostrar que la degradación de Pr55-Gag, por parte de una construcción de HDAC6 carente del mencionado dominio BUZ, ocurría de manera equiparable al wt-HDAC6, tenía que cumplirse, al menos, que la ruta de degradación siguiese siendo la misma.

Para ello, se realizaron análisis bioquímicos, por la técnica de *western blot*, de lisados celulares de HEK-293T donde, habíamos sobreexpresado cantidades crecientes (0,5 y 1 μ g) de los constructos wt-HDAC6 y HDAC6- Δ BUZ, junto con el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E y la envuelta de VIH-1 BaL.01, de forma acorde a los experimentos de degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6, previamente presentados en este trabajo. En este caso, se sometería además a las células del experimento a tratamiento de inhibición de la ruta autofágica, mediante el empleo de 3-metiladenina (3-MA) (**Fig. 10 b**). Paralelamente, condiciones equivalentes del experimento serían expuestas, únicamente, a la misma concentración del vehículo utilizado para la resuspensión y adición de dicha 3-Metiladenina, que en este caso es PBS-1X (**Fig. 10 a**). De esta manera nos aseguramos que dicho vehículo no ejerce ninguna influencia que dé lugar a errores de observación en el experimento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

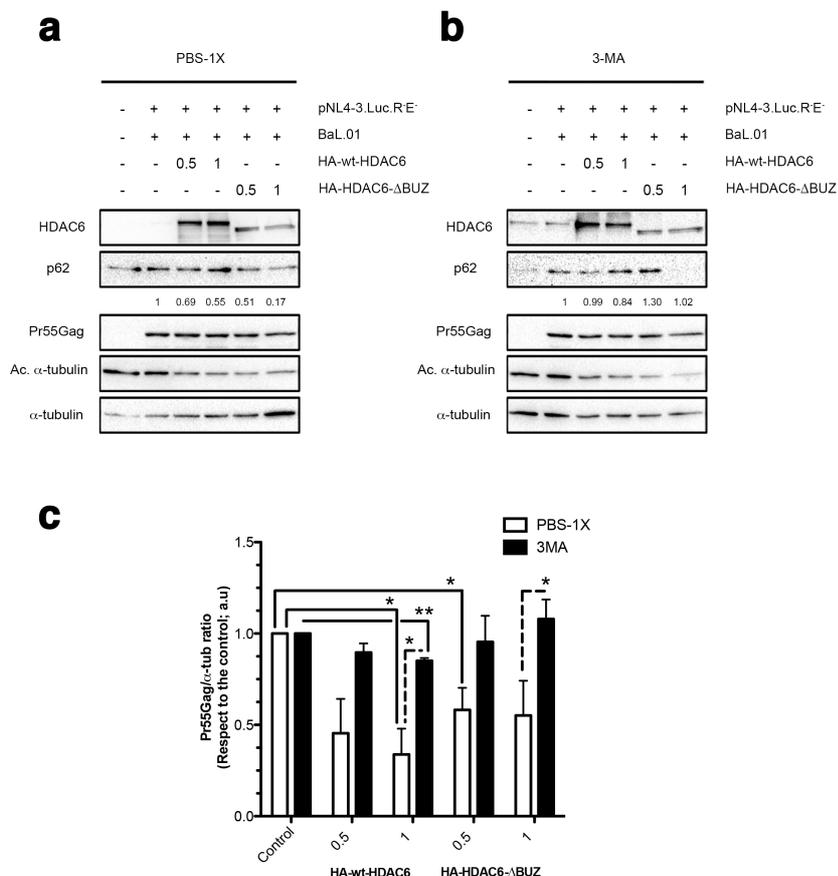


Figura 10. La degradación de Pr55-Gag mediada por HDAC6, es inhibida por 3-MA, también en el caso de un constructo de HDAC6 que carece del dominio BUZ. Imágenes representativas de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag en células HEK-293T, bajo: **a)** control de vehículo (PBS-1X) y **b)** tratadas con 3-MA. En ambos casos, se sobreexpresan, en dichas células HEK-293T, los constructos HA-wt-HDAC6 y HA-HDAC6-ΔBUZ (0,5 μg y 1 μg, cada uno, sucesivamente), cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.RE⁻ (1 μg) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1 μg). Se muestra la banda de la proteína p62/SQSTM1, como control de la inhibición de la autofagia mediada por 3-MA y la α-tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α-tubulina. **c)** En las mismas condiciones descritas en **a)** y **b)**, cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando el cuerpo viral y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. (n=4 mínima de experimentos independientes, media +/-SEM). Cuando se indique, *P < 0,05 ; **P < 0,01 representan P-valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u).

Resultados

En estos ensayos observamos que, mientras en las condiciones control se produce la degradación de Pr55-Gag por parte de ambos constructos, con variaciones significativas de la cantidad de Pr55-Gag resultante, respecto al control en las condiciones de 1 µg de wt-HDAC6 ($p < 0,05$) y 0.5 µg de HDAC6-ΔBUZ ($p < 0,05$); cuando se añade el inhibidor de la autofagia 3-MA se aprecia una tendencia evidente a la pérdida de dicho perfil de degradación. En el caso de la forma delecionada del dominio BUZ objeto de estudio, las variaciones de las cantidades de Pr55-Gag medidas en presencia de 3-MA no difieren estadísticamente de la expresión control en ausencia de constructos de HDAC6. Es más, cuando se sobreexpresa 1 µg de HDAC6-ΔBUZ, la diferencia entre la cantidad de Pr55-Gag medido, en condiciones control y de tratamiento inhibidor, es significativa ($p < 0,05$). Si bien en estos experimentos, en el caso de wt-HDAC6, al sobreexpresar 1 µg del mismo en condiciones de tratamiento con 3-MA, se aprecia cierta disminución significativa ($p < 0,01$) de la cantidad de Pr55-Gag frente al control negativo, la diferencia entre la degradación en esta condición de 1 µg de variante wt-HDAC6, entre el control de vehículo y el tratamiento con inhibidor, también fue significativa ($p < 0,05$), evidenciando una pérdida de dicha degradación al bloquear la ruta autofágica mediante 3-MA, como habían descrito trabajos previos del laboratorio (Marrero-Hernandez et al. 2019).

Estos experimentos confirmaban que el comportamiento de HDAC6-ΔBUZ degradando a Pr55-Gag, en cuanto a ruta degradativa, no difería del constructo completo wt-HDAC6, promoviendo la degradación de esta poliproteína mediante la ruta autofágica.

4.2.4. La presencia de APOBEC3G interfiere en la degradación de Pr55-Gag promovida por un constructo de HDAC6 carente del dominio BUZ, pero no en el caso de wt-HDAC6:

Los resultados realizados en este trabajo nos estaban indicando que la interacción y la degradación de Pr55-Gag por parte de un HDAC6 carente del dominio BUZ era posible, pero nuestra hipótesis inicial, que contemplaba que la importancia de BUZ para dicha degradación, se basaba tanto en las descripciones de la implicación de este dominio en el aporte de agregados proteicos a la formación de agrosomas, por parte de HDAC6 (Kawaguchi et al. 2003); como en experimentos preliminares previos de nuestro laboratorio, donde constructos de HDAC6-ΔBUZ parecían no promover la pérdida de Pr55-Gag, en el contexto del trabajo en que describía la protección de APOBEC3G, de la degradación mediada por la proteína accesoria del VIH-1 Vif, por parte de HDAC6. En ese trabajo se demostraba, también la interacción de A3G, no solo con un HDAC6 completo, sino también con su dominio BUZ expresado por separado y con HDAC6-ΔBUZ, carente del mismo (Valera et al. 2015). Resultaba, por lo tanto, interesante evaluar la influencia de esta enzima en la actividad degradativa de HDAC6 sobre Pr55-Gag.

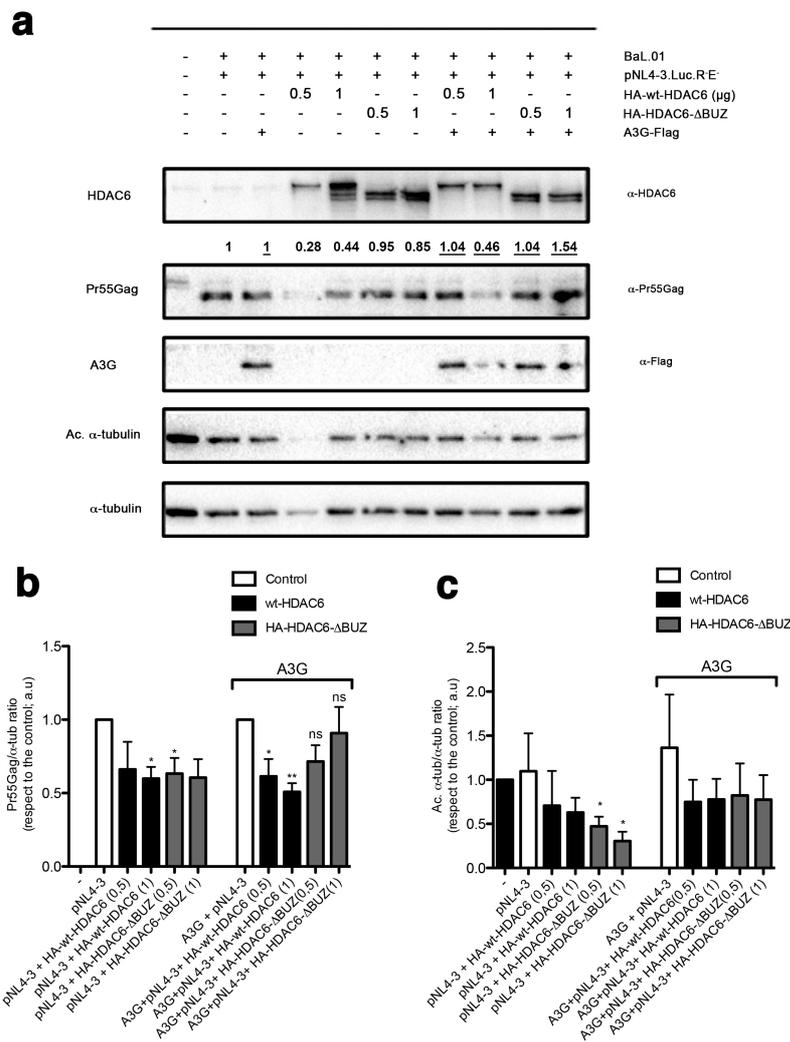
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

Las líneas celulares HEK-293T no expresan A3G (Valera et al. 2015), por lo que se diseñaron experimentos donde se pudiese evaluar y comparar, simultáneamente, la degradación de Pr55-Gag mediada por wt-HDAC6 y HDAC6-ΔBUZ, en ausencia o presencia de A3G, sobreexpresando un constructo recombinante del mismo. Para ello desarrollamos análisis bioquímicos mediante la técnica de *western blot* de lisados celulares de HEK-293T donde, de nuevo, realizábamos cotransfecciones estos constructos de HDAC6 en cantidades de 0,5 μg y 1 μg, junto con el cuerpo viral pNL4-3.Luc.R.E⁻ y la Env BaL.01. En este caso, las mismas condiciones se repetían cotransfectando, también, la construcción de A3G que contiene el epítipo de la etiqueta proteica Flag, A3G-Flag (1 μg) (Fig.11).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Resultados

Figura 11. Influencia de A3G, en la degradación de Pr55-Gag mediada por HDAC6, dependiendo de la presencia o no del dominio BUZ en la enzima HDAC6. **a)** Imagen representativa de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag, mediante la sobreexpresión en HEK-293T de HA-wt-HDAC6 y HA-HDAC6- Δ BUZ (0,5 μ g y 1 μ g, cada uno, sucesivamente), así como el constructo A3G-Flag (1 μ g), donde se indique, cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.R^E (1 μ g) y envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1 μ g). Se muestra la banda de α -tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α -tubulina. **b)** En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando el cuerpo viral y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. **c)** En las mismas condiciones descritas, cuantificación de la cantidad de α -tubulina acetilada frente a la cantidad de α -tubulina total; valores normalizados respecto al control negativo. **(a), b) y c)** n=3 mínima, media +/-SEM). Cuando se indique, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ representan P -valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u).

Se observaba en estos experimentos que, en presencia de A3G, la variación en la cantidad de Pr55-Gag resultante de la degradación promovida por wt-HDAC6, frente al control donde no se sobreexpresaba este, resultaba significativa ($p < 0,05$ en 0,5 μ g; $p < 0,01$ en 1 μ g), no viéndose afectado frente a la degradación en ausencia de A3G. Sin embargo, cuando sobreexpresábamos HDAC6- Δ BUZ en presencia de A3G, no se podían observar variaciones significativas en la medida de Pr55-Gag frente al control negativo, en contraste con la tendencia apreciable a la degradación de Pr55-Gag por parte de este constructo HDAC6- Δ BUZ, en ausencia de A3G, que se observaba de manera significativa en estos experimentos ($p < 0,05$ en 0,5 μ g), de manera consecuente con los experimentos previos de degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6- Δ BUZ, descritos previamente en los resultados de esta tesis.

4.2.5. La degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6, se ve comprometida en constructos mutados en las regiones NC, SP2 y p6 de Pr55-Gag:

De cara a evaluar cuales podrían ser los dominios de Pr55-Gag importantes para la acción degradativa que ejercía HDAC6 sobre este, los cuales podrían ser por lo tanto determinantes para la interacción entre ambas proteínas, disponíamos de construcciones de plásmidos virales que codificaban para poliproteínas Pr55-Gag, donde una serie de lisinas de su región C-terminal habían sido mutadas y sustituidas por argininas. Estos plásmidos provirales son p Δ R, y se fundamentan en el plásmido proviral pNL4-3^{tr} (Bohne and Kräusslich 2004), conteniendo todos los marcos de lectura abiertos del VIH-1, bajo el control del promotor del citomegalovirus, además, de conservar *rev* y *tat* intactos y, portando una mutación del sitio activo de la transcriptasa inversa (RT) y la proteasa viral (PR) inactiva, además de tener impedida la unión del primer de la retrotranscripción, lo que los convierte en no infecciosos y permite su uso seguro en laboratorio (Gottwein and Kräusslich 2005). Estos plásmidos habían sido clonados y cedidos a nuestro equipo desde el laboratorio del Dr. Hans-Georg Kräusslich, en Alemania, que estudiaba, con

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

estas herramientas experimentales, la importancia de la ubiquitinación de los residuos de lisina presentes diferentes regiones de Pr55-Gag, en la escisión de los viriones y su posterior maduración (Gottwein et al. 2006). En nuestro caso, podían servir para dilucidar si la modificación de aminoácidos en estas regiones interfería con el fenómeno de degradación descrito, de manera que podrían señalar sitios posibles de interacción a estudiar.

Para ello se realizaron ensayos bioquímicos donde analizábamos mediante la técnica de *western blot* la variación en las cantidades de Pr55-Gag medidas en lisados de HEK-293T, donde se sobreexpresaba 1 µg de wt-HDAC6 sucesivamente, cotransfectando dicho constructo junto con los plásmidos pNL4-3 pΔR mutantes de lisinas: pNC(KR), pSP2(KR), pp6(KR), que contienen mutaciones circunscritas únicamente a las lisinas de un dominio de Pr55-Gag (NC, SP2 y p6, respectivamente) (**Fig. 12 a**); así como pNCSP2(KR), pNCp6(KR) y pSP2p6(KR), que combinan las mutaciones de las lisinas dos de dichos dominios y, pNCSP2p6(KR), que presentaría todas las mutaciones de los tres dominios mencionados (**Fig. 12 b**). Cada una de las condiciones se comparó con su control, donde se expresaba cada uno de estos mutantes, sin cotransfectar wt-HDAC6. Además, se incluía en el experimento la condición control del cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E y la Env BaL.01, así como un plásmido control pNL4-3 pΔR sin mutaciones en el gen *gag*, para comprobar que ambos constructos eran equivalentes en cuanto a la degradación de Pr55-Gag mediada por wt-HDAC6 (**Fig. 12**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Resultados

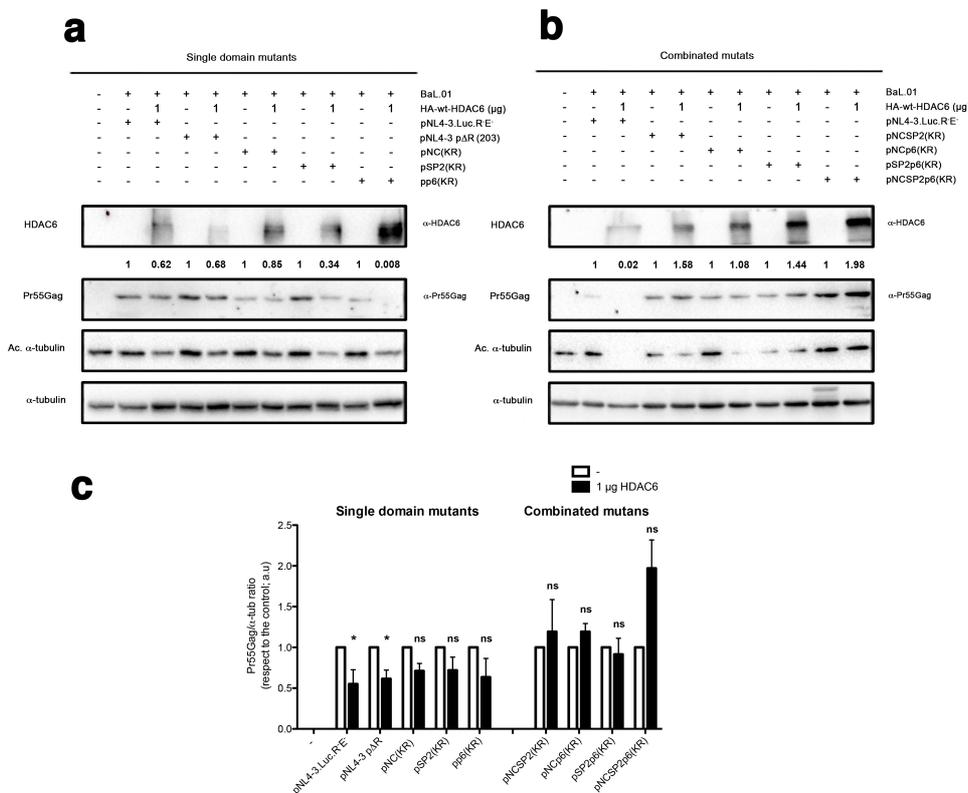


Figura 12. Influencia de las mutaciones de residuos de lisina, en diferentes regiones de Pr55-Gag, en la degradación de dicha poliproteína, mediada por HDAC6. Imágenes representativas de análisis cuantitativos, por *western blot*, de la degradación de Pr55-Gag, mediante la sobreexpresión en HEK-293T de HA-wt-HDAC6 (1 µg), cotransfectando con cuerpo viral pNL4-3.Luc.R'E (1 µg) y diferentes plásmidos mutantes pΔR **a)** con mutaciones (Lys→Arg) aisladas a cada región de Pr55-Gag: pNC(KR), pSP2(KR), pp6(KR) y **b)** combinaciones de mutaciones de dichas regiones: pNCSP2(KR), pNCp6(KR), pSP2p6(KR) y pNCSP2p6(KR). Se cotransfecta siempre con la envuelta de referencia de VIH BaL.01 (1 µg). Se muestra la banda de α-tubulina acetilada, como control de la actividad catalítica de HDAC6. Los valores mostrados corresponden a los ratios de Pr55-Gag frente al total de tubulina de cada condición, en el experimento representativo seleccionado. Control de carga total representado por la α-tubulina. **c)** En las mismas condiciones descritas para a) y b), cuantificación de la degradación de Pr55-Gag, valores normalizados por los valores de tubulina, respecto al control, expresando cada cuerpo viral específico y la envuelta, sin sobreexpresión de ningún constructo de HDAC6. **(a), b) y c)** n=4 mínima de experimentos independientes, media +/-SEM). Cuando se indique, *P < 0,05 representan P-valores obtenidos aplicando un test t Student. Ratios en unidades arbitrarias de luz (a.u.).

Analizando el resultado de estos experimentos observamos que, cuando sobreexpresamos wt-HDAC6 (1 µg) junto con constructos que presentan las mutaciones limitadas a una sola región, se puede observar en los histogramas una tendencia a la degradación de Pr55-Gag, aunque nunca significativa, como sí ocurre

Resultados

con los controles pNL4-3.Luc.R·E y el pNL4-3 pΔR ($p < 0,05$ en ambos casos). Cuando observamos los mutantes combinados, se pierde la tendencia a la disminución de Pr55-Gag que observábamos en los controles de cuerpo viral sin mutaciones y, no podemos apreciar disminuciones significativas en las cantidades de Pr55-Gag medidas en la muestra, respecto a estos controles sin sobreexpresión de HDAC6, por lo que podríamos estar observando un impedimento hacia esta degradación cuando se modifican varias de estas regiones simultáneamente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

DISCUSIÓN



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

5.1. LAS PROTEÍNAS ENV DEL VIH-1, DE UN CLÚSTER DE PACIENTES LTNP-EC, SON FUNCIONALMENTE DEFICIENTES EN SU ACTIVIDAD SEÑALIZADORA SOBRE EL RECEPTOR CD4 E INFECTIVA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL CICLO VIRAL:

Está claro que los individuos infectados por el VIH-1, pero que, permanecen asintomáticos e inmunocompetentes en ausencia de tratamiento, más allá de las predicciones temporales de lo que se considera un curso temporal normal de la enfermedad, suponen un importante campo de estudio para entender los mecanismos y factores mediante los cuales este virus se relaciona con el organismo y por lo tanto, la importancia de los mismos para el desarrollo del ciclo viral y la diseminación del virus dentro del individuo y hacia a nuevos hospedadores. Un escaso grupo, los conocidos como LTNP-EC, además de no progresar clínicamente hacia la fase tardía, por más de 10 años, permanecerán con cargas virales indetectables (revisado en (Casado et al. 2010)), lo que los convierte en una valiosísima fuente de datos para entender los fenómenos fundamentales para la patogénesis del VIH-1.

Mediante el trabajo de esta tesis doctoral, se analizó la funcionalidad y su importancia para contribuir al control de la enfermedad, del complejo de la Env aislado de virus de un pequeño clúster de pacientes LTNP-EC, demostrando que, de forma coherente con el fenotipo clínico de estos pacientes, dichas Env presentan una deficiente capacidad para señalizar sobre su receptor CD4 y promover fenómenos de reorganización del citoesqueleto, necesarios para la eficiente entrada viral, además de que, consecuentemente, estas Env manifiestan una escasa actividad infectiva.

Se ha descrito cómo en la infección del VIH-1, la actividad replicativa, es decir el “fitness” viral, capacidad de un virus para general progenie infecciosa en un entorno determinado (revisado en (Wargo and Kurath 2012)), en las primeras fases de la infección, sería un indicador fiable (incluso más que la carga viral, variable durante la enfermedad) del curso clínico y la progresión de la enfermedad, así como del establecimiento temprano de los reservorios virales latentes en la fase aguda. Es más, describían aquí cómo, podría ser la capacidad replicativa del virus fundador, heredada en los individuos infectados por el mismo, un determinante de la respuesta temprana inmune del organismo y el posterior curso clínico de la enfermedad (Claiborne et al. 2015).

De hecho, se ha descrito que el “fitness” viral, a pesar de ser el resultado final de todos los diferentes procesos biológicos que desarrolla el virus en su ciclo, se podría ver condicionado especialmente, e incluso de manera mayoritaria, por los eventos tempranos del ciclo, como la entrada viral, donde la Env jugaría un papel fundamental y, más allá de definir el tropismo, podría haber tenido un impacto en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

las diferencias de transmisión y progresión de la enfermedad que se observan cuando se comparan diferentes subtipos del VIH-1 diversificados por el mundo (Rangel et al. 2003). En este sentido, en el trabajo donde se identificaba inicialmente el clúster de pacientes LTNP-EC, objeto de nuestro estudio, se encontraba como las Env extraídas de estos pacientes presentaban una muy baja actividad replicativa en comparación con las Env procedentes de pacientes progresores crónicos (Casado et al. 2013), si bien sería objeto principal de nuestro actual trabajo la caracterización mecanística del porqué de este bajo "fitness" replicativo, que había condicionado una paupérrima diversificación viral y variabilidad del gen *env*, a lo largo de más de 25 años desde el evento de primoinfección.

Ha sido objeto de numerosos estudios la implicación de la Env en el complejo mecanismo de la entrada viral, donde la formación del poro de fusión dependerá del contacto de los receptores y correceptores con las glicoproteínas de la Env, para lo cual diferentes moléculas reguladoras del citoesqueleto se verán involucradas (análisis de los mecanismos y proteínas importantes implicadas por biología de sistemas con datos reales experimentales en (Santos, Valenzuela-Fernández, and Torres 2014). En especial, son diversas las evidencias que plantean que la movilización y reorganización de la F-actina, que ocurre previa a la formación del poro de fusión, juega un papel fundamental en el proceso de la entrada viral, siendo necesaria, la estructuración de dicha actina en una estructura con morfología de pseudópodo, que permita la colocalización de receptores y correceptores en la región de contacto con el virus, facilitando así la interacción de estos con la Env y la subsecuente fusión de membranas, un fenómeno bautizado como "capping" (Jiménez-Baranda et al. 2007; Barrero-Villar et al. 2009; García-Expósito et al. 2013). Es más, para una eficiente entrada viral, el contacto inicial entre la glicoproteína gp120 del complejo de la Env de VIH-1 con el receptor CD4, debe promover la estabilización de un córtex de microtúbulos en la región de contacto, mediante la acetilación de la α -tubulina (Valenzuela-Fernández et al. 2005).

Analizando en este trabajo, ambos fenómenos de señalización de la Env sobre CD4, fundamentales para la exitosa entrada viral y la infectividad, encontramos como los pacientes del clúster LTNP-EC estudiado, presentan Env disfuncionales tanto en la promoción de la reorganización de la actina del fenómeno del "capping" (Fig. 3), como en la estabilización de niveles elevados de acetilación en α -tubulina (Fig. 2). Es más, cuando analizábamos el porcentaje de aparición del pseudópodo de actina característico del "capping", no solo los porcentajes encontrados al ensayar infectando con las Env del clúster eran significativamente inferiores a los producidos por los virus formados con Env de progresores y Env control de referencia, sino que además se situaba en porcentajes entre el 14,5 y 16,6%, los cuales se corresponderían con infecciones deficientes, si tenemos en cuenta que, trabajos previos, donde describen los mecanismos celulares implicados en el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

“capping”, sitúan los porcentajes de aparición de dichas estructuras entre un 20 y un 30%, para una infección *in vitro* eficiente, no perturbada experimentalmente (Barrero-Villar et al. 2009; García-Expósito et al. 2013). En este experimento no solo observábamos la formación de las estructuras polarizadas de f-actina, características del “capping”, en una zona de la célula, donde el virus estaría interactuando, sino que además, pudimos comprobar cómo la α -tubulina acetilada colocaliza con estas estructuras (**Fig. 3**), evidenciando que ambos fenómenos suponen mecanismos cooperativos de remodelación del citoesqueleto, para la adaptación estructural de la célula por el virus VIH-1, de cara a la formación del poro de fusión y los eventos subsiguientes a la entrada viral.

Más aun, pudimos demostrar cómo, de hecho, la entrada viral mediada por los virus producidos con estas Env de LTNP-EC es significativamente inferior a la que promueven los virus que portan Env de pacientes controladores. Se observaba mediante este estudio, que comprende varios fenómenos cuantificables en la infección temprana del virus, que la deficiente capacidad señalizadora y reorganizadora del citoesqueleto en el contacto con el receptor CD4, que caracteriza a estas Env del clúster LTNP-EC, desembocaba en una reducida infectividad. Además en el trabajo publicado se incluyen experimentos donde, nuestros colaboradores de la Red RETIC-RIS del ISCiii, demostraban que al ensayar las Env del clúster no difería estadísticamente la expresión en superficie de estas con respecto a las Env control de pacientes progresores y a las Env de referencia (Casado et al. 2018), descartando así que las deficiencias observadas en señalización, infectividad y a grandes rasgos, de actividad replicativa de las Env de este clúster, se pudiesen deber a una insuficiente expresión en superficie del complejo de la Env.

El punto crítico que definía la disfuncionalidad de estas Env, permitirían identificarlo experimentos realizados también por nuestros colaboradores en el artículo publicado, donde, en total coherencia con los resultados de experimentos de señalización en entrada viral, fenómeno dependiente de la interacción de la Env con CD4; demostrarían que, de hecho, estas Env presentan escasa capacidad de unión al receptor CD4 de las células diana (Casado et al. 2018). Dichos resultados se obtuvieron mediante ensayos que evaluaban el comportamiento estas Env, procedentes del clúster, en el fenómeno de la transferencia viral; dado que este fenómeno, diferente y, en cualquier caso, previo a la infección viral clásica (transmisión), no media interacción con los correpectores y es únicamente dependiente de la unión con el receptor CD4 (Puigdomènech et al. 2009). Describiendo que las Env del clúster LTNP-EC estudiado presentan una menor habilidad para promover la transferencia de partículas virales, hacia linfocitos T CD4⁺ primarios, que las Env control de pacientes progresores, demostraban que estas Env tenían un defecto específico en la unión con su receptor CD4 (Casado et al. 2018). Asimismo, a continuación, se evaluaba la capacidad de mediar el evento

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

de fusión en la entrada viral, encontrando que las Env del clúster también presentan una capacidad fusogénica menor que las Env procedentes de pacientes progresores control, observándose además una correlación significativa entre los resultados del ensayo de transferencia, mediada por interacción entre la Env con CD4 y, esta reducida fusogenicidad (Casado et al. 2018).

Es mediante la suma y el análisis conjunto de todas estas observaciones publicadas, cuando los resultados de este trabajo cobran total sentido y adquieren todo su peso, describiendo como una deficiente unión a CD4 por parte de estas Env, condicionaría asimismo un deficiente evento de señalización, incapaz de promover la suficiente reorganización del citoesqueleto de actina y estabilidad de los microtúbulos acetilados, como para que la célula sea susceptible a la fusión de membranas y la entrada viral; eventos que determinarían enormemente una baja capacidad replicativa de los virus que posean estas Env y, que condicionarían el fenotipo clínico de control de la enfermedad de estos pacientes y la escasísima divergencia de sus virus, tras haber pasado más de 25 años desde que se infectaron.

Previamente a nuestro estudio, un grupo de investigadores había identificado en pacientes con perfiles de control de la enfermedad LTNP-EC (denominados “elite suppressors” en este trabajo), mutaciones en el gen *env* que condicionaban una menor entrada viral, con diferente dependencia de la cantidad expresada del receptor CD4 y el correceptor CCR5 en la célula infectada, deduciendo así un reducido uso de dichos receptores por parte de la Env de dichos controladores, frente a pacientes progresores crónicos (Lassen et al. 2009). Sin embargo, hasta nuestro trabajo, no se había llegado a caracterizar funcionalmente un defecto en las Env de pacientes LTNP-EC, en la utilización de su receptor, demostrando una menor unión a dicho CD4 y, a su vez presentando la deficiencia de los mecanismos de señalización implicados en la reorganización del citoesqueleto de la célula diana, que permiten la fusión de membranas y que finalmente condicionan la menor infectividad y actividad replicativa de los virus de estos pacientes. Lo que está claro que es ambos trabajos, el nuestro y el previamente citado artículo de 2009 (Lassen et al. 2009), fundamentan que la habilidad de los virus para mediar infecciones eficientes desde la primera fase del ciclo viral, es decir en la entrada viral, determina el curso de la enfermedad y el fenotipo clínico de los pacientes infectados, por lo que deficiencias de la Env viral para cumplir sus funciones y mediar este proceso de entrada viral, parecen poder ser responsables del establecimiento de perfiles LTNP-EC en dichos individuos.

No obstante, habría que tener en cuenta que, aunque las Env de estos pacientes demostraban ser claramente deficientes en su promoción de la entrada viral, estos pacientes también presentaban marcadores genéticos, relacionados con perfiles de control de la enfermedad, presentando combinaciones de diferentes alelos del HLA de clase I (*B27*, *B57/5801*, *B51*), polimorfismos como *HLA-C-35* (*rs9264942*) o

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

heterocigosis para *CCR5-Δ32*, si bien es cierto que la combinación de dichos marcadores difería entre cada paciente (Casado et al. 2013). Por ende, había sido notable como la influencia de la misma deficiencia en la Env de un mismo virus fundador había promovido la aparición del mismo fenotipo clínico en estos pacientes, que si bien contaban con factores reconocidos de protección ante el VIH-1, poseían un fondo genético diferente entre ellos. Este trabajo fundamentaba, por lo tanto, que el establecimiento de perfiles clínicos de progresión lenta de la enfermedad y en concreto, un fenotipo de control del virus tan extremo como es el de los pacientes controladores de elite, que en este caso, en ausencia de terapia, habían permanecido sin síntomas durante más de 25 años; resulta en último término de la cooperación entre características genéticas protectoras del individuo y defectos notables en alguna proteína del virus, que condicionan una menor actividad replicativa desde el inicio de la infección, como en este caso, la glicoproteína de la Env. Este enfoque que plantea el control de la enfermedad por el individuo como resultado de factores genéticos del propio hospedador y del virus, ha sido defendido en numerosas ocasiones en la literatura científica, donde se ha asociado también perfiles de progresión lenta a dicha coexistencia de factores (Sandónis et al. 2009; Casado et al. 2010; Casado et al. 2013; Zaunders, Dyer, and Churchill 2011). Más aun, este trabajo podría servir de indicio que avalase la coevolución entre el ser humano y el virus del VIH-1, de cara a una coexistencia estable entre ambos entes, en el relativamente corto periodo de tiempo transcurrido desde que este virus dio el salto desde los primates al ser humano, estimado en torno a 1908 para el grupo M más numeroso (Worobey et al. 2008). En este sentido, algunos trabajos describen que las presiones del ser humano sobre el virus VIH-1, tanto a través sistema inmune como debidas a la terapia antirretroviral, suelen producir adaptaciones que conllevan además disminución del fitness viral y una menor patogenicidad de los virus resultantes (revisado en (Telenti 2005)). Si bien algunos trabajos discrepan respecto a la validez de los modelos que plantean coevolución de virus con el humano en periodos cortos de tiempo, planteando que dicha coevolución requiere de periodos de miles hasta millones de años, desde nuestros ancestros o nuestros parientes primates (Sharp and Simmonds 2011), podríamos razonar también que el carácter pandémico del virus del VIH-1, habiendo infectado más de 75,7 millones de individuos, solo desde las primeras identificaciones ((UNAIDS) 2020), podría haber forzado y acelerado el curso temporal de esta coevolución, más allá de lo que permitirían tiempos más largos de interacción, en escalas de población más reducidos que la especie humana moderna.

Cabe destacar que la vía intravenosa, por la cual se infectaron todos estos pacientes habría sido determinante para que dicho fenómeno de primoinfección pudiese ser posible. Teniendo en cuenta que esta vía de contagio, se estima, podría ser la más eficiente para la transmisión del virus (con hasta un 95% de probabilidad de contagio) (Shaw and Hunter 2012), este hecho podría haber favorecido que estos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

virus lograsen superar la barrera a la transmisión que implica su escasa infectividad y, una posible reducida carga viral por parte del paciente fundador, aunque se desconocería el fenotipo clínico del mismo. Asimismo, es factible que, el defecto funcional de la Env de estos virus condicionase en la fase aguda el reducido “fitness replicativo”, fenómeno que, se ha descrito, permitiría el control del virus en la fase temprana por parte de la respuesta inmune y condicionaría el desarrollo posterior de la enfermedad (Claiborne et al. 2015) (Yue et al. 2015), en este caso, de control del virus y la no progresión a largo plazo.

Por otro lado, el concepto de heredabilidad, dentro del contexto de la virología, define la fracción de variabilidad en el fenotipo clínico de los pacientes, explicable por las características genéticas del virus, es decir podría definir estadísticamente la propensión de pacientes infectados con virus filogenéticamente cercanos, a presentar un desarrollo de la enfermedad similar, dado que esas características virales serían “heredadas” por todos los pacientes infectados con dichos virus (Alizon et al. 2010). Hasta ahora, la heredabilidad en virus VIH-1 había sido estudiada, principalmente, analizando la influencia en el SPVL (carga viral en el “set point”) resultante de las características genéticas virales, mediante análisis filogenéticos para grandes cohortes, encontrándose que al menos un tercio de la variabilidad del SPVL en Europa, se correspondía con la variación genética viral (Blanquart et al. 2017). También se había descrito que la explicación más parsimoniosa para la similitud en el SPVL, encontrada entre individuos que se habían infectado de parejas serodiscordantes, resultaba ser la transmisión de semejantes características virales en los virus que infectaban al nuevo individuo (Hollingsworth et al. 2010). Nuestro trabajo fundamentaría, de manera novedosa, como las características de las Env de los virus de un clúster de pacientes, han sido heredadas de hecho por todos los virus de esos pacientes, desde un mismo virus fundador, incluso cuando estos pacientes presentaban diferente perfil genético. Es más, estas características genéticas virales heredadas, resultaban ser condicionantes de un defecto en la funcionalidad del complejo de la Env, que condicionó el desarrollo del mismo perfil clínico de no progresión de la enfermedad, en todos los pacientes de dicho clúster.

Si bien todas las Env extraídas de los virus de este clúster compartían 11 mutaciones inusuales, respecto a diferentes grupos de secuencias subtipo B consenso, ancestrales y de la cohorte española (Casado et al. 2013), la Env extraída de la paciente AS7 presentaba además 3 mutaciones adicionales que la diferenciaban del resto de las secuencias de la Env del clúster. La única muestra de la que se disponía de esta paciente, antes de que se perdiera el seguimiento de la misma, presentaba viremia detectable y, consecuentemente la Env AS7 muestra cierta capacidad infectiva (**Fig. 4**). El ensayo de los constructos de la Env, resultantes de revertir la mutación de estos tres residuos de aminoácidos, hacia la secuencia del resto del clúster, demostró que, al menos dos de estos residuos, en

118

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

los dominios V1 y C2 de gp120, habían sido condicionantes de la recuperación de la infectividad que manifestaba la Env AS7 respecto al clúster, por lo que estos residuos aminoacídicos en las secuencias del clúster, en combinación con las 11 mutaciones que compartían, parecían ser responsables de la deficiente capacidad infectiva de estos virus. La reversión del residuo 400 de gp120 en V4, no demostraba una pérdida de infectividad con respecto a la Env original AS7 (**Fig. 4**), por lo que no parecía que esta mutación hubiese condicionado un cambio en las características de la Env, al menos de cara a la infectividad. Por desgracia, el seguimiento clínico de la paciente AS7 se limitaba a la única muestra que le había sido extraída en 1989, con viremia detectable, por lo que no se disponía de más valiosos datos clínicos que indicasen que perfil clínico de progresión de la enfermedad presentaba, ni cómo evolucionaba en tal caso la variabilidad de la secuencia de sus Env, dado que la capacidad infectiva de la misma podría permitir una actividad replicativa superior.

Aparte del caso de la paciente AS7, donde el propio virus podría haber superado, en parte, sus defectos genéticos, logrando recuperar su infectividad y pudiendo condicionar, tal vez un cambio en el perfil de progresión; cabe destacar que el paciente LTNP_1, después de 20 años de seguimiento clínico, a partir de 2010, había comenzado a incrementar su carga viral detectable y, en el trabajo donde se identifica este clúster, indican que los virus detectados habían revertido 6 de las mutaciones inusuales de la Env características del clúster (Casado et al. 2013), lo cual fundamentaba aún más la importancia de las mismas para la infectividad de los virus, debida al defecto en la función señalizadora que describimos en este trabajo.

Se han descrito, en la literatura científica, otros casos en los cuales el perfil de controlador de elite se perdía debido a la reinfección con un nuevo virus, más infectivo y que no podía ser controlado inmunológicamente por el individuo (Caetano et al. 2019). En cualquier caso, los pacientes del clúster LTNP-EC de este trabajo, no demostraron pérdidas de su perfil LTNP, durante todos los años de seguimiento y aún más años de enfermedad, teniendo en cuenta las características ancestrales de sus virus, que sitúa su primoinfección en torno a 1977-1978 (Casado et al. 2013). Desconocemos si estos pacientes, infectados con los virus que presentan las Env defectuosas objeto de estudio, podrían ser susceptibles a una reinfección con otra variante viral de VIH-1, pero esta pregunta plantea interesantes nuevos estudios donde estas Env y, los defectos funcionales que conllevan sus mutaciones, podrían ser interesantes candidatos para estudiar nuevas estrategias, en la búsqueda de vacunas contra esta enfermedad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

5.2. HDAC6 INTERACCIONA CON PR55-GAG Y PROMUEVE SU DEGRADACIÓN, Y ESTE FENÓMENO OCURRE DE MANERA INDEPENDIENTE A SU DOMINIO BUZ DE UNIÓN A UBIQUITINA:

El segundo objetivo de nuestro trabajo consistía en tratar de entender y caracterizar más profundamente como se producía la regulación negativa de la poliproteína estructural del VIH-1 Pr55-Gag, influenciada por la presencia de la enzima HDAC6. Esta degradación había sido objeto de estudio en trabajos previos de nuestro laboratorio (de Armas-Rillo 2017; Marrero-Hernandez et al. 2019), que habían llegado a dilucidar qué cantidades crecientes de HDAC6 promovían la degradación del Pr55-Gag que se habría de agregarse en la membrana plasmática, para el ensamblaje de nuevos viriones. La sobreexpresión de HDAC6 promovía la desaparición de dichos agregados de Pr55-Gag de la membrana plasmática, pudiéndose ser restablecidos con la sobreexpresión de la proteína accesoria del virus Nef, que degrada a HDAC6 y que, incluso podía recuperar el Pr55-Gag degradado por el HDAC6 endógeno. Además, la ruta degradativa por la que se estaba produciendo esta degradación era la autofágica (Marrero-Hernandez et al. 2019). Lo que no había quedado demostrado es si estas proteínas interactuaban en el desarrollo de este fenómeno degradativo descrito, dado que la caracterización de HDAC6 como un factor de restricción con actividad *per se* sobre Pr55-Gag, requería que dicha interacción se produjese y, que, por lo tanto, la regulación negativa de Pr55-Gag no fuese debida, de manera indirecta, a la acción de la enzima HDAC6 sobre alguno de sus muchos sustratos descritos, mediante algún mecanismo que desconocíamos.

Parecía razonable la hipótesis inicial de la que partíamos, para realizar este trabajo, la cual planteaba que esta interacción, de estar produciéndose, podría venir mediada a través de su dominio BUZ, debido a su reconocida capacidad de unión a residuos de ubiquitina (Seigneurin-Berny et al. 2001; Pai et al. 2007), de manera que podría reconocer residuos ubiquitinables, descritos en diferentes dominios del extremo C-terminal de la poliproteína Pr55-Gag, fundamentales para la correcta formación de nuevas partículas virales (Jäger, Gottwein, and Kräusslich 2007; Sette et al. 2013). Sin embargo, los resultados del trabajo desarrollado en nuestra tesis desmintieron esta hipótesis, describiendo que HDAC6 interacciona con Pr55-Gag de manera independiente a la presencia o no, en esta enzima, del dominio BUZ, así como, demostrábamos que HDAC6 promueve la degradación de Pr55-Gag, al menos en último término, por ruta autofágica y, esta actividad degradativa no se ve afectada cuando HDAC6 carece del susodicho dominio BUZ. Es decir, este trabajo apunta a la importancia de alguna región en HDAC6, aún por identificar, pero que, en cualquier caso, no se trataría del dominio BUZ, que permitiría a esta enzima interactuar con Pr55-Gag y promover su degradación por ruta autofágica.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

En los experimentos realizados para evaluar la variación en la cantidad de Pr55-Gag a medida que sobreexpresábamos cantidades crecientes de los diferentes constructos de HDAC6 (de los cuales nos interesaba especialmente el efecto que produciría el HDAC6- Δ BUZ, por carecer del dominio que estábamos cuestionando en nuestra hipótesis), pudimos comprobar cómo tanto sobreexpresando cantidades de 1 y 2 μ g, como 0,5 y 1 μ g de constructos HDAC6, el efecto degradativo, sobre Pr55-Gag, de un HDAC6 en su forma completa wt-HDAC6, no difería en absoluto del efecto observado cuando ensayábamos la forma carente del dominio BUZ. En ambas construcciones apreciábamos la degradación de Pr55-Gag, dosis dependiente de la sobreexpresión de HDAC6 y, obteníamos disminuciones de Pr55-Gag significativas (**Fig. 5**) y (**Fig. 7 a y b**). Es más, demostramos que este efecto no se debía a un error de observación influenciado por la etiqueta peptídica con la cual teníamos marcados los constructos de HDAC6 que habíamos usado, ya que, si usábamos los constructos wt-HDAC6 y HDAC6- Δ BUZ, marcados esta vez con la etiqueta proteica DsRed, el fenómeno degradativo sobre Pr55-Gag que estábamos describiendo no se veía afectado y, de manera equiparable a los resultados obtenidos con la etiqueta proteica HA, el constructo portando la delección del dominio BUZ (HDAC6- Δ BUZ) seguía promoviendo disminuciones significativas de Pr55-Gag, de manera dosis dependiente y, que resultaban equivalentes a las producidas por wt-HDAC6 (**Fig. 8**).

La producción de viriones también se veía significativamente mermada tras la sobreexpresión de estos constructos de HDAC6 en las células productoras de virus (**Fig. 6**). Este resultado era esperable, teniendo en cuenta que cuantificamos la proteína p24 de la cápside, la cual deriva directamente del procesamiento proteolítico de la poliproteína Pr55-Gag, por parte de la proteasa viral, en los viriones escindidos, promoviendo así su maduración (de Marco et al. 2010). Por lo tanto, disminuciones de la poliproteína precursora Pr55-Gag en la célula productora, habrían de producir consecuentemente menores producciones virales. No obstante poder comprobarlo en nuestros experimentos, aporta un control más de que, las disminuciones de Pr55-Gag observadas y cuantificadas en los lisados celulares, por medio de análisis bioquímicos por la técnica de *western blot*, no son resultado de errores de observación por limitaciones de la técnica y se corresponden con coherentes disminuciones en la producción de viriones.

Por otro lado, los resultados obtenidos empleando el constructo dm-HDAC6, que, mediante mutaciones en sus dos dominios catalíticos, tenía impedida su actividad desacetilasa; cuando sobreexpresábamos 2 μ g del mismo, indicaban que se producía la disminución de Pr55-Gag en estas condiciones, de manera significativa. Estos resultados resultaban discrepantes con respecto a trabajos previos del laboratorio, los cuales habían señalado la importancia de la actividad catalítica desacetilasa intacta de HDAC6 para la degradación de Pr55-Gag (de Armas-Rillo 2017), observación que además resultaba coherente con la importancia de esta

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

capacidad catalítica en las rutas degradativas, donde HDAC6 por un lado mediante la desacetilación de microtúbulos acetilados, promueve el transporte de agregados proteicos a los agrosomas (Kawaguchi et al. 2003) y, posteriormente, desacetilando la cortactina, promueve que dicha proteína polimerice la red de F-actina necesaria para la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Lee et al. 2010). El bloqueo de la actividad catalítica de este constructo se podía observar cuando cuantificábamos los niveles de uno de los sustratos de HDAC6, la α -tubulina acetilada, frente a la α -tubulina total, comprobando que, como era de esperar, este constructo no mediaba una disminución de la acetilación de la α -tubulina, a diferencia de los constructos wt-HDAC6 y HDAC6- Δ BUZ, cuya actividad catalítica intacta, permite que produzcan disminuciones de la cantidad de α -tubulina acetilada significativas (**Fig. 5 c**).

No podemos explicar por qué observábamos esa disminución significativa de Pr55-Gag al sobreexpresar 2 μ g del mutante inactivo en su función desacetilasa, dm-HDAC6, pero tal vez, una cantidad tan elevada de este constructo, con respecto a la cantidad que se expresaría de la enzima HDAC6 en condiciones endógenas, podía estar alterando procesos celulares que no pudiésemos controlar, o bien, la posible interacción (posteriormente confirmada) de HDAC6 con el Pr55-Gag, podría hacer que este constructo secuestrase a Pr55-Gag e, independientemente de su actividad catalítica, desembocase en un proceso degradativo o de reciclaje celular sobre la misma. Es por esto que, decidimos afinar las condiciones de sobreexpresión de HDAC6, ensayando cantidades de 0,5 y 1 μ g de los tres constructos, de manera que, en estas condiciones, dejaban de observarse disminuciones significativas de Pr55-Gag cuando se ensayaba el dm-HDAC6, mientras que las formas wt-HDAC6 y HDCA6- Δ BUZ seguían manifestando sus cualidades degradativas sobre la poliproteína. Este resultado si era coherente con las descripciones previas sobre la importancia de la capacidad catalítica desacetilasa de HDAC6 en la degradación de Pr55-Gag. Asimismo, dado que estas cantidades de 0,5 y 1 μ g de sobreexpresión demostraban ser suficientes para la observación del fenómeno degradativo de HDAC6 sobre Pr55-Gag, sin arriesgarnos a posibles errores de observación debidos a excesivas cantidades de los constructos, decidimos que serían las condiciones estándar a seguir en el resto de experimentos del trabajo.

Los experimentos de coimmunoprecipitación nos permitieron demostrar que, en efecto, HDAC6 interacciona directa o indirectamente con la poliproteína Pr55-Gag, pero que dicha interacción no ocurre, en cualquier caso, a través del dominio BUZ de unión a ubiquitina, ya que el constructo HDAC6- Δ BUZ aparecía en la fracción arrastrada por la proteína Gag-EGFP recombinante empleada en el experimento (**Fig. 9 a**) y, a su vez, también Pr55-Gag se veía arrastrado por dicho constructo, cuando las condiciones del experimento consistían en arrastrar, a través de la etiqueta HA, los constructos de HDAC6 (**Fig. 9 b**). Es más, no solo Pr55-Gag demostraba interactuar con estos constructos wt-HDAC6 y HDAC6- Δ BUZ, sino que al arrastrar Gag-EGFP, en ausencia de los mismos, aparecía el HDAC6 endógeno

Discusión

(Fig. 9 a), lo que nos indicaba que, en efecto Pr55-Gag interacciona con la proteína HDAC6 presente en las células humanas en la naturaleza y, no solo con nuestras construcciones recombinantes de laboratorio. Más aun, en estos experimentos también controlamos, añadiendo RNasa A en todas las condiciones, que las interacciones que pudiésemos observar no se debiesen a uniones a través de ácidos nucleicos entre nuestras proteínas. Este control resultaba del todo pertinente, debido a que está ampliamente descrita la afinidad del dominio NC de la poliproteína Pr55-Gag por los ácidos nucleicos, a través de dos dominios dedo de zinc, altamente conservados en su estructura, los cuales le permiten unirse específicamente a la región de encapsidación Psi (ψ) del ARN viral genómico, para la dimerización del mismo e incorporación a los viriones nacientes (De Guzman et al. 1998).

Teniendo en cuenta estos resultados, la interacción entre HDAC6 y Pr55-Gag estaría ocurriendo a través de algún dominio que aún no hemos identificado en la enzima HDAC6, pero que, al menos podemos asegurar que no se trata del dominio BUZ. Si la interacción con Pr55-Gag a través de BUZ fuese aún posible, al menos, su magnitud no sería la suficiente, con respecto a la unión mediada por otra región de la enzima, como para suponer una pérdida notable del resultado final de degradación de Pr55-Gag, tal y como observábamos en los experimentos donde analizábamos la disminución de la Pr55-Gag promovida por HDAC6, donde el constructo HDC6- Δ BUZ demostraba ser tan eficiente como el wt-HDAC6 para inducir este fenómeno.

Sin embargo, no podíamos describir que HDAC6 promovía su acción degradativa descrita sobre Pr55-Gag, de manera no dependiente del dominio BUZ, si no demostrábamos que la ruta degradativa implicada en la disminución de Pr55-Gag observada cuando sobreexpresábamos el HDAC6- Δ BUZ, era la ruta autofágica, como ya habían demostrado trabajos previos de nuestro laboratorio para el constructo completo wt-HDAC6 (Marrero-Hernandez et al. 2019). En efecto, nuestros resultados indicaron que, mediante el tratamiento de las condiciones de experimento con 3-metiladenina, se pierde el perfil de disminución de Pr55-Gag observado al sobreexpresar el HDAC6- Δ BUZ, al igual que ocurre para la forma wt-HDAC6. El empleo de 3-metiladenina nos ofrece una herramienta válida para la inhibición de la ruta autofágica, debido a que su mecanismo de acción, inhibiendo la actividad de la PI3K de clase III, impide la formación del PI(3)P (fosfatidilinositol 3-fosfato), el cual es necesario para la formación de los autofagosomas, bloqueando de esta manera la ruta autofágica en una etapa temprana (revisado en (Burman and Ktistakis 2010). Además, esta estrategia había sido empleada previamente y, de manera exitosa, por nuestro laboratorio para definir la importancia de la ruta autofágica en las degradaciones promovidas por HDAC6 de la proteína accesoria del VIH-1 Vif y de la propia poliproteína Pr55-Gag (Valera et al. 2015; Marrero-Hernandez et al. 2019). Cabe destacar que la ruta autofágica que participa, en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

último término, en la degradación de Pr55-Gag promovida por HDAC6, no es la autofagia basal o inducida por escasez de nutrientes, la cual ocurre sin mediación de HDAC6, sino el proceso de degradación conocido como autofagia selectiva o QC, encargada del aclaramiento de agregados proteicos o proteínas aberrantes que pueden causar patologías (Lee et al. 2010). Esta ruta implica previamente el mecanismo de transporte de los agregados proteicos a la formación de los agresomas, proceso que en el caso de Pr55-Gag, en base a nuestros datos, ocurriría por una interacción de HDAC6 con esta poliproteína no dependiente del dominio BUZ.

Por otro lado, nuestro grupo había descrito la existencia de la interacción de HDAC6 con la enzima APOBEC3G (A3G), que ocurría con tanto con una proteína HDAC6 completa, como con su dominio BUZ aislado, pero, además, era posible en ausencia de dicho dominio en la proteína, demostrando A3G interacción con el constructo HDAC6- Δ BUZ (Valera et al. 2015). A3G es una enzima con actividad citidina desaminasa, que se expresa en linfocitos y actúa como un factor de restricción anti-VIH-1 en el proceso de retrotranscripción, siendo contrarrestada mediante su degradación, por ruta proteasómica, promovida por la proteína accesoria Vif (Stopak et al. 2003) (Marin et al. 2003). Los experimentos de degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6, presentados en esta tesis, habían sido realizados en líneas celulares HEK-293T, las cuales no expresan A3G (Valera et al. 2015) y, teniendo en cuenta que es una enzima presente de manera natural en las células diana del VIH-1, además de las interacciones descritas de la misma con HDAC6, resultaba del todo pertinente evaluar la influencia que podía tener su presencia en el fenómeno degradativo sobre Pr55-Gag, que estábamos describiendo y, si podía interferir en el resultado del mismo.

Nuestros resultados indicaron que la presencia de A3G dificulta la degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6- Δ BUZ, aunque no se observa ninguna influencia sobre el fenómeno degradativo cuando es promovido por la forma completa wt-HDAC6 de la enzima. Es decir, en presencia de A3G, un HDAC6 carente del dominio BUZ, encuentra dificultada su capacidad de promover la degradación de Pr55-Gag y, teniendo en cuenta la interacción descrita entre A3G y este constructo, podríamos deducir que A3G podría estar bloqueando en el constructo HDAC6- Δ BUZ, la región, aún por identificar, mediante la cual HDAC6 y Pr55-Gag interaccionan. Sería posible que A3G interaccionara de otra manera con un HDAC6 completo, tal vez a través del dominio BUZ (por el cual también presenta afinidad descrita (Valera et al. 2015)), por lo que, en este caso, no interfiriese con la acción de HDAC6 sobre Pr55-Gag, tal y como observamos en nuestros resultados.

Si bien habría que tener en cuenta también que la interacción de A3G con Pr55-Gag, a través del dominio NC está descrita y es la que permite la incorporación de este factor de restricción a los viriones nacientes (Alce and Popik 2004), nuestro

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

razonamiento nos inclina más teorizar que, la interferencia observada en la degradación de Pr55-Gag estaría debiéndose a la interacción concreta de A3G con el HDAC6- Δ BUZ, ya que si se tratase de un impedimento debido a la unión de Pr55-Gag con A3G, debería verse afectado también el constructo wt-HDAC6, pero este seguía demostrando degradaciones significativas de Pr55-Gag, aun en presencia de A3G.

Nuestros resultados describiendo la interacción de HDAC6 con una proteína, para promover su entrada en rutas degradativas, a través de un dominio distinto a su dominio BUZ, suponen resultados que se alejan de la implicación, prácticamente dogmática, que se le atribuye a este dominio de cara a la interacción con residuos de ubiquitina presentes en los agregados proteicos, para el transporte de los mismos, a la formación de agresomas, por parte de HDAC6 (Kawaguchi et al. 2003; Ouyang et al. 2012). De hecho, la interacción de HDAC6 con la proteína accesoria Vif descrita por nuestro grupo, ocurre precisamente a través de este dominio BUZ, desencadenando la degradación de Vif mediante su transporte a la formación de agresomas, que entran finalmente en la ruta autofágica (Valera et al. 2015). Sin embargo, nuestras descripciones no resultan descabelladas, si tenemos en cuenta que también se han encontrado interacciones de HDAC6 con proteínas mediante dominios diferentes a BUZ, como en el caso de la proteína TAU, a la cual se une HDAC6 a través de su dominio SE14, describiéndose incluso la acumulación de TAU en estructuras perinucleares tipo agresoma, como resultado de esta interacción (Ding, Dolan, and Johnson 2008).

Por otro lado, es bien conocida la promiscuidad de la poliproteína Pr55-Gag para interactuar con multitud de moléculas, especialmente a través de su dominio NC (revisado en (Klingler et al. 2020), con el que, ya hemos citado previamente, media la unión a la enzima A3G (Alce and Popik 2004). Pero, además, recientemente se ha descrito como la proteína IQGAP1 (en inglés, "IQ motif-containing GTPase activating protein 1") promueve la regulación negativa de los niveles en membrana de Pr55-Gag, en el proceso de formación de viriones, mediante una interacción que depende de los dominios NC y p6 de Pr55-Gag, lo que resulta en una menor producción viral (Sabo, de Los Santos, and Goff 2020). IQGAP1 es una proteína que se expresa de manera ubicua en las células del organismo y que desempeña funciones de regulación del citoesqueleto, modulando la polimerización de la actina y e interviniendo en la regulación de los microtúbulos (revisado en (Briggs and Sacks 2003)), funciones que, curiosamente guardan cierta similitud con las de la enzima HDAC6.

En ese sentido, nuestros experimentos ensayando construcciones del cuerpo viral, donde habían sido mutados ciertos aminoácidos de lisina localizados en las regiones NC, SP2 y p6 de la poliproteína, nos indicaron que la acumulación de más de uno de estos dominios con mutaciones en su secuencia, dificulta el efecto

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

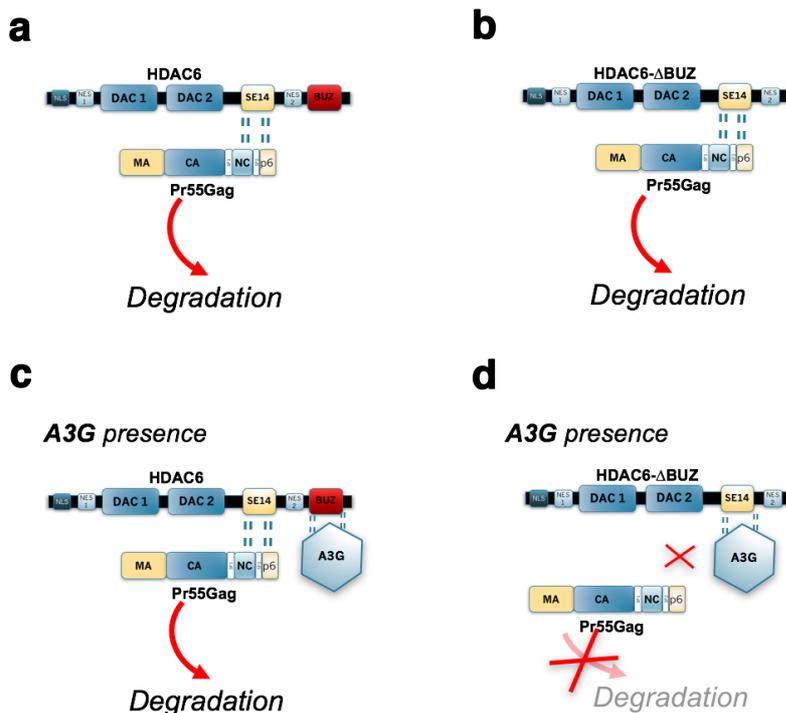
Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

degradativo promovido por HDAC6 (**Fig. 12**), lo cual podría indicar que la integridad de la secuencia de dominios de Pr55-Gag es importante para su interacción con esta enzima.

Si bien los trabajos del equipo del Dr. Hans-Georg Kräusslich, empleando precisamente estos constructos mutados, habían descrito que la ubiquitinación de estas lisinas era un proceso fundamental para el proceso de escisión de los viriones (Gottwein et al. 2006), no podemos obviar la importancia de los residuos de lisina para numerosas modificaciones postraduccionales de las proteínas, además de la ubiquitinación, como acetilaciones, metilaciones y muchas otras acilaciones (revisado en (Wang and Cole 2020)), así como en la interacción entre proteínas (Sun et al. 2013). Las modificaciones en los residuos de lisina de los dominios NC, SP2 y p6 de Pr55-Gag podrían implicar alteraciones, más allá de la ubiquitinación de los mismos, que tal vez afecten a la región de unión de esta poliproteína con HDAC6, pero requerimos de realizar más estudios para comprobar en profundidad la importancia de estos dominios en dicha interacción.

Finalmente, tras una mirada amplia hacia los resultados de nuestro trabajo, podríamos teorizar sobre el proceso de interacción entre HDAC6 y Pr55-Gag, planteando un modelo que se ajusta a nuestros resultados (**Fig. 13**).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Discusión

Figura 13. Representación esquemática del modelo teórico que podríamos plantear a raíz de nuestros resultados.

En este modelo teórico, HDAC6 interaccionaría con Pr55-Gag a través de una región diferente del dominio BUZ, que estaría presente también en el constructo HDAC6- Δ BUZ, por lo que la degradación de esta poliproteína ocurriría, indistintamente, promovida por un constructo completo wt-HDAC6 (**Fig.13 a**), equivalente a la proteína HDAC6 endógena, así como con dicha construcción HDAC6- Δ BUZ (**Fig.13 b**). Sin embargo, en presencia de A3G, si bien la forma completa de la enzima podría interaccionar con Pr55-Gag y promover su degradación, pese a que A3G pueda interaccionar con HDAC6, debido a que estas interacciones podrían darse diferentes dominios (tal vez el susodicho dominio BUZ para A3G) (**Fig. 13 c**); en el caso de la forma HDAC6- Δ BUZ, Pr55-Gag y A3G podrían tener que competir por una misma región para interaccionar con este constructo, viéndose mermada en este caso la interacción con Pr55-Gag y su consiguiente degradación (**Fig. 13 d**).

Dichas regiones de interacción entre HDAC6 y Pr55-Gag, requieren aún de una identificación minuciosa, pero teniendo en cuenta nuestros resultados que descartan el dominio BUZ de HDAC6 y, las descripciones en la literatura científica de interacciones de esta enzima con otras proteínas como TAU (Ding, Dolan, and Johnson 2008), el dominio SE14 podría ser un buen candidato a evaluar para esta interacción en futuros trabajos experimentales. Por otro lado, los resultados de los experimentos empleando construcciones del cuerpo viral mutadas en los dominios NC, SP2 y p6 nos inclinan a pensar en la importancia de estos dominios para dicha interacción con HDAC6.

En cualquier caso, el estudio realizado en esta tesis presenta descripciones novedosas de la interacción entre HDAC6 y la poliproteína estructural Pr55-Gag del virus VIH-1, que abren camino a futuros trabajos, prometedores de cara al empleo de estrategias terapéuticas basadas en esta enzima, demostradamente cumplidora de los requisitos para considerarla un factor de restricción anti-VIH-1.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

CONCLUSIONES



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Conclusiones

En primer lugar, las Env de un clúster de pacientes LTNP-EC presentan una deficiente señalización sobre CD4 en la entrada viral y una escasa infectividad, que es consecuente con el perfil de progresión de los pacientes.

- Las Env del clúster LTNP-EC estudiado presentan una inferior entrada viral frente a controles de Env de pacientes progresores crónicos.

- Las Env del clúster LTNP- promueven una inferior estabilización de la α -tubulina acetilada a la que promueven las Env de pacientes progresores crónicos.

- Estas Env también promueven una menor reorganización de la actina para la formación del fenómeno del "capping", a la promovida por Env de pacientes progresores.

- La secuencia conservada en el tiempo, en las Env de este clúster LTNP-EC, es fundamental para su deficiente infectividad, fundamentando la heredabilidad de estas características para condicionar fenotipos clínicos.

En segundo lugar, HDAC6 interacciona con Pr55-Gag y promueve su degradación, y este fenómeno ocurre de manera independiente a su dominio BUZ de unión a ubiquitina.

- Un HDAC6 carente del dominio BUZ promueve la degradación de Pr55-Gag de forma comparable a un constructo completo.

- Pr55-Gag interacciona con HDAC6 por una región diferente al dominio BUZ.

- La degradación de Pr55-Gag promovida por un HDAC6 carente del dominio BUZ, ocurre por la ruta autofágica, al igual que para el constructo wt-HDAC6.

- La presencia de A3G dificulta la degradación de Pr55-Gag por parte de HDAC6- Δ BUZ.

- Mutaciones combinadas en residuos de lisina de Pr55-Gag, en sus dominios NC, SP2 y p6, impiden su degradación promovida por HDAC6.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

BIBLIOGRAFÍA



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- (UNAIDS), Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2020. "Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet." In, 6.
- Agostini, I., J. M. Navarro, F. Rey, M. Bouhamdan, B. Spire, R. Vigne, and J. Sire. 1996. 'The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIIB', *J Mol Biol*, 261: 599-606.
- Ahmad, N., and S. Venkatesan. 1988. 'Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR', *Science*, 241: 1481-5.
- Aiken, C., and D. Trono. 1995. 'Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis', *J Virol*, 69: 5048-56.
- Akimoto, H., H. Kaneko, I. Sekigawa, H. Hashimoto, Y. Kaneko, and N. Yamamoto. 1998. 'Binding of HIV-2 envelope glycoprotein to CD8 molecules and related chemokine production', *Immunology*, 95: 214-8.
- Alce, T. M., and W. Popik. 2004. 'APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein', *J Biol Chem*, 279: 34083-6.
- Alfadhli, A., A. O. Staubus, P. R. Tedbury, M. Novikova, E. O. Freed, and E. Barklis. 2019. 'Analysis of HIV-1 Matrix-Envelope Cytoplasmic Tail Interactions', *J Virol*, 93.
- Alizon, S., and C. Magnus. 2012. 'Modelling the course of an HIV infection: insights from ecology and evolution', *Viruses*, 4: 1984-2013.
- Alizon, S., V. von Wyl, T. Stadler, R. D. Kouyos, S. Yerly, B. Hirschel, J. Böni, C. Shah, T. Klimkait, H. Furrer, A. Rauch, P. L. Vernazza, E. Bernasconi, M. Battegay, P. Bürgisser, A. Telenti, H. F. Günthard, and S. Bonhoeffer. 2010. 'Phylogenetic approach reveals that virus genotype largely determines HIV set-point viral load', *PLoS Pathog*, 6: e1001123.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. 'CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1', *Science*, 272: 1955-8.
- Alvarez Losada, S., C. Cantó-Nogués, and M. A. Muñoz-Fernández. 2002. 'A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells', *Neurobiol Dis*, 11: 469-78.
- Amerik, A. Y., S. J. Li, and M. Hochstrasser. 2000. 'Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Biol Chem*, 381: 981-92.
- Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson, G. Biberfeld, and J. Albert. 2000. 'Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection', *Arch Intern Med*, 160: 3286-93.
- Apetrei, C., A. Kaur, N. W. Lerche, M. Metzger, I. Pandrea, J. Hardcastle, S. Falkenstein, R. Bohm, J. Koehler, V. Traina-Dorge, T. Williams, S. Staprans, G. Plaque, R. S. Veazey, H. McClure, A. A. Lackner, B. Gormus, D. L. Robertson, and P. A. Marx. 2005. 'Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm', *J Virol*, 79: 8991-9005.
- Araujo, L. A., and S. E. Almeida. 2013. 'HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition', *Viruses*, 5: 595-604.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Arendt, V., M. Amand, G. Iserentant, M. Lemaire, C. Masquelier, G. F. Ndayisaba, C. Verhofstede, E. Karita, S. Allen, A. Chevigné, J. C. Schmit, D. P. Bercoff, and C. Seguin-Devaux. 2019. 'Predominance of the heterozygous CCR5 delta-24 deletion in African individuals resistant to HIV infection might be related to a defect in CCR5 addressing at the cell surface', *J Int AIDS Soc*, 22: e25384.
- Argañaraz, E. R., M. Schindler, F. Kirchoff, M. J. Cortes, and J. Lama. 2003. 'Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication', *J Biol Chem*, 278: 33912-9.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. Sowder, 2nd, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson. 1992. 'Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines', *Science*, 258: 1935-8.
- Atkins, K. M., L. Thomas, R. T. Youker, M. J. Harriff, F. Pissani, H. You, and G. Thomas. 2008. 'HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multikinase cascade that triggers major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation: analysis using short interfering RNA and knock-out mice', *J Biol Chem*, 283: 11772-84.
- Baltimore, D. 1970. 'RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses', *Nature*, 226: 1209-11.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. 'Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)', *Science*, 220: 868-71.
- Barre-Sinoussi, F., L. Montagnier, R. Lidereau, J. Sisman, J. Wood, and J. C. Chermann. 1979. 'Enhancement of retrovirus production by anti-interferon serum', *Ann Microbiol (Paris)*, 130B: 349-62.
- Barrero-Villar, M., J. R. Cabrero, M. Gordón-Alonso, J. Barroso-González, S. Alvarez-Losada, M. A. Muñoz-Fernández, F. Sánchez-Madrid, and A. Valenzuela-Fernández. 2009. 'Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes', *J Cell Sci*, 122: 103-13.
- Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle, and B. R. Cullen. 1993. 'Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection', *J Exp Med*, 177: 1561-6.
- Bernstein, H. B., S. P. Tucker, E. Hunter, J. S. Schutzbach, and R. W. Compans. 1994. 'Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides', *J Virol*, 68: 463-8.
- Bertos, N. R., B. Gilquin, G. K. Chan, T. J. Yen, S. Khochbin, and X. J. Yang. 2004. 'Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention', *J Biol Chem*, 279: 48246-54.
- Bertos, N. R., A. H. Wang, and X. J. Yang. 2001. 'Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation', *Biochem Cell Biol*, 79: 243-52.
- Bjoern-Erik O. Jensen, Dieter Häussinger, Elena Knops, Annemarie Wensing, Javier Martínez-Picado, Monique Nijhuis, Maria Salgado, Jacob D. Estes, Nadine Lübke, Rolf Kaiser, Thomas Harrer, Johannes Fischer, Julian Schulze zur Wiesch, Johanna M. Eberhard, Guido Kobbe. 2020. "CCR5Δ32 SCT-INDUCED HIV REMISSION: TRACES OF HIV DNA BUT FADING IMMUNE REACTIVITY." In

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Conference on Retroviruses and Opportunistic (2020) Infections [Internet].*
Boston, Massachusetts.
- Bjørkøy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, and T. Johansen. 2005. 'p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death', *J Cell Biol*, 171: 603-14.
- Blanquart, F., C. Wymant, M. Cornelissen, A. Gall, M. Bakker, D. Bezemer, M. Hall, M. Hillebregt, S. H. Ong, J. Albert, N. Bannert, J. Fellay, K. Fransen, A. J. Gourlay, M. K. Grabowski, B. Gunsenheimer-Bartmeyer, H. F. Günthard, P. Kivela, R. Kouyos, O. Laeyendecker, K. Liitsola, L. Meyer, K. Porter, M. Ristola, A. van Sighem, G. Vanham, B. Berkhout, P. Kellam, P. Reiss, and C. Fraser. 2017. 'Viral genetic variation accounts for a third of variability in HIV-1 set-point viral load in Europe', *PLoS Biol*, 15: e2001855.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. 1996. 'The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry', *Nature*, 382: 829-33.
- Bohne, J., and H. G. Kräusslich. 2004. 'Mutation of the major 5' splice site renders a CMV-driven HIV-1 proviral clone Tat-dependent: connections between transcription and splicing', *FEBS Lett*, 563: 113-8.
- Bour, S., and K. Strebel. 1996. 'The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses', *J Virol*, 70: 8285-300.
- Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, P. K. Clark, E. Arnold, and S. H. Hughes. 2006. 'Why do HIV-1 and HIV-2 use different pathways to develop AZT resistance?', *PLoS Pathog*, 2: e10.
- Briggs, M. W., and D. B. Sacks. 2003. 'IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation', *EMBO Rep*, 4: 571-4.
- Buchbinder, S. P., M. H. Katz, N. A. Hessel, P. M. O'Malley, and S. D. Holmberg. 1994. 'Long-term HIV-1 infection without immunologic progression', *AIDS*, 8: 1123-8.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, and M. Stevenson. 1993. 'Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 6125-9.
- Burke, D. S. 1997. 'Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy', *Emerg Infect Dis*, 3: 253-9.
- Burman, C., and N. T. Ktistakis. 2010. 'Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate', *FEBS Lett*, 584: 1302-12.
- Caetano, D. G., F. H. Côrtes, G. Bello, S. S. D. de Azevedo, B. Hoagland, L. M. Villela, B. Grinsztejn, V. G. Veloso, M. L. Guimarães, and M. G. Morgado. 2019. 'A case report of HIV-1 superinfection in an HIV controller leading to loss of viremia control: a retrospective of 10 years of follow-up', *BMC Infect Dis*, 19: 588.
- Callebaut, C., J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J. P. Briand, and A. G. Hovanessian. 1998. 'Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells', *J Biol Chem*, 273: 21988-97.
- Calugi, G., F. Montella, C. Favalli, and A. Benedetto. 2006. 'Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env', *J Virol*, 80: 11892-6.
- Campbell-Yesufu, O. T., and R. T. Gandhi. 2011. 'Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection', *Clin Infect Dis*, 52: 780-7.
- Capalbo, G., T. Mueller-Kuller, S. Markovic, S. A. Klein, U. Dietrich, D. Hoelzer, O. G. Ottmann, and U. J. Scheuring. 2011. 'Knockdown of ERM family member moesin in host cells increases HIV type 1 replication', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27: 1317-22.
- Carnes, S. K., J. Zhou, and C. Aiken. 2018. 'HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus', *J Virol*, 92.
- Carrington, M., G. W. Nelson, M. P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J. J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, and S. J. O'Brien. 1999. 'HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage', *Science*, 283: 1748-52.
- Casado, C., S. Colombo, A. Rauch, R. Martínez, H. F. Günthard, S. Garcia, C. Rodríguez, J. Del Romero, A. Telenti, and C. López-Galíndez. 2010. 'Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression', *PLoS One*, 5: e11079.
- Casado, C., S. Marrero-Hernández, D. Márquez-Arce, M. Pernas, S. Marfil, F. Borràs-Grañana, I. Olivares, R. Cabrera-Rodríguez, M. S. Valera, L. de Armas-Rillo, P. Lemey, J. Blanco, A. Valenzuela-Fernández, and C. Lopez-Galíndez. 2018. 'Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers', *mBio*, 9.
- Casado, C., M. Pernas, V. Sandonis, T. Alvaro-Cifuentes, I. Olivares, R. Fuentes, L. Martínez-Prats, E. Grau, L. Ruiz, R. Delgado, C. Rodríguez, J. del Romero, and C. López-Galíndez. 2013. 'Identification of a cluster of HIV-1 controllers infected with low replicating viruses', *PLoS One*, 8: e77663.
- Case, K. 1986. 'Nomenclature: human immunodeficiency virus', *Ann Intern Med*, 105: 133.
- Cen, S., Y. Huang, A. Khorchid, J. L. Darlix, M. A. Wainberg, and L. Kleiman. 1999. 'The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA³Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA', *J Virol*, 73: 4485-8.
- Centers for Disease, Control. 1982. 'A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 31: 305-7.
- Cervera, L., F. Gòdia, F. Tarrés-Freixas, C. Aguilar-Gurrieri, J. Carrillo, J. Blanco, and S. Gutiérrez-Granados. 2019. 'Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits', *Appl Microbiol Biotechnol*, 103: 7367-84.
- Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. 1997. 'Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein', *Cell*, 89: 263-73.
- Chaudhuri, R., O. W. Lindwasser, W. J. Smith, J. H. Hurley, and J. S. Bonifacio. 2007. 'Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor', *J Virol*, 81: 3877-90.
- Checkley, M. A., B. G. Luttge, and E. O. Freed. 2011. 'HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation', *J Mol Biol*, 410: 582-608.
- Chen, Y., R. Winchester, B. Korber, J. Gagliano, Y. Bryson, C. Hutto, N. Martin, G. McSherry, A. Petru, D. Wara, and A. Ammann. 1997. 'Influence of HLA alleles on

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- the rate of progression of vertically transmitted HIV infection in children: association of several HLA-DR13 alleles with long-term survivorship and the potential association of HLA-A*2301 with rapid progression to AIDS. Long-Term Survivor Study', *Hum Immunol*, 55: 154-62.
- Chu, C., and P. A. Selwyn. 2010. 'Diagnosis and initial management of acute HIV infection', *Am Fam Physician*, 81: 1239-44.
- Chukkapalli, V., I. B. Hogue, V. Boyko, W. S. Hu, and A. Ono. 2008. 'Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding', *J Virol*, 82: 2405-17.
- Chung, J., J. J. Rossi, and U. Jung. 2011. 'Current progress and challenges in HIV gene therapy', *Future Virol*, 6: 1319-28.
- Claiborne, D. T., J. L. Prince, E. Scully, G. Macharia, L. Micci, B. Lawson, J. Kopycinski, M. J. Deymier, T. H. Vanderford, K. Nganou-Makamdop, Z. Ende, K. Brooks, J. Tang, T. Yu, S. Lakhi, W. Kilembe, G. Silvestri, D. Douek, P. A. Goepfert, M. A. Price, S. A. Allen, M. Paiardini, M. Altfeld, J. Gilmour, and E. Hunter. 2015. 'Replicative fitness of transmitted HIV-1 drives acute immune activation, proviral load in memory CD4+ T cells, and disease progression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E1480-9.
- Clark, S. J., W. A. Jefferies, A. N. Barclay, J. Gagnon, and A. F. Williams. 1987. 'Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 1649-53.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986. 'Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS', *Science*, 233: 343-6.
- Clayton, L. K., M. Sieh, D. A. Pious, and E. L. Reinherz. 1989. 'Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding', *Nature*, 339: 548-51.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. 'Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells', *Science*, 270: 1811-5.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1996. 'The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection', *Nat Med*, 2: 1244-7.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1988. 'Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1', *Nature*, 334: 532-4.
- Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger, and D. Baltimore. 1999. 'The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells', *Immunity*, 10: 661-71.
- Connor, R. I., K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N. R. Landau. 1997. 'Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals', *J Exp Med*, 185: 621-8.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Cooper, D. A., J. Gold, P. Maclean, B. Donovan, R. Finlayson, T. G. Barnes, H. M. Michelmore, P. Brooke, and R. Penny. 1985. 'Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion', *Lancet*, 1: 537-40.
- Craigie, R. 2012. 'The molecular biology of HIV integrase', *Future Virol*, 7: 679-86.
- Crowe, S., J. Mills, and M. S. McGrath. 1987. 'Quantitative immunocytofluorographic analysis of CD4 surface antigen expression and HIV infection of human peripheral blood monocyte/macrophages', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 3: 135-45.
- Cruz, N. V., R. Amorim, F. E. Oliveira, F. A. Speranza, and L. J. Costa. 2013. 'Mutations in the nef and vif genes associated with progression to AIDS in elite controller and slow-progressor patients', *J Med Virol*, 85: 563-74.
- D'Arc, M., C. Furtado, J. D. Siqueira, H. N. Seuanez, A. Ayoub, M. Peeters, and M. A. Soares. 2018. 'Assessment of the gorilla gut virome in association with natural simian immunodeficiency virus infection', *Retrovirology*, 15: 19.
- Datta, S. A., P. K. Clark, L. Fan, B. Ma, D. P. Harvin, R. C. Sowder, 2nd, R. Nussinov, Y. X. Wang, and A. Rein. 2016. 'Dimerization of the SP1 Region of HIV-1 Gag Induces a Helical Conformation and Association into Helical Bundles: Implications for Particle Assembly', *J Virol*, 90: 1773-87.
- Datta, S. A., L. G. Temeselew, R. M. Crist, F. Soheilian, A. Kamata, J. Mirro, D. Harvin, K. Nagashima, R. E. Cachau, and A. Rein. 2011. 'On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch?', *J Virol*, 85: 4111-21.
- de Armas-Rillo, L. 2017. 'Estudio de los procesos celulares implicados en la infección por VIH-1: HDAC6 como nuevo factor de restricción', Universidad de La Laguna.
- De Cock, K. M., G. Adjuorlolo, E. Ekpin, T. Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly, and H. D. Gayle. 1993. 'Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic', *JAMA*, 270: 2083-6.
- De Feo, C. J., and C. D. Weiss. 2012. 'Escape from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry inhibitors', *Viruses*, 4: 3859-911.
- De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers. 1998. 'Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element', *Science*, 279: 384-8.
- De Maio, F. A., C. A. Rocco, P. C. Aulicino, R. Bologna, A. Mangano, and L. Sen. 2012. 'Unusual substitutions in HIV-1 vif from children infected perinatally without progression to AIDS for more than 8 years without therapy', *J Med Virol*, 84: 1844-52.
- de Marco, A., B. Müller, B. Glass, J. D. Riches, H. G. Kräusslich, and J. A. Briggs. 2010. 'Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography', *PLoS Pathog*, 6: e1001215.
- de Silva, T. I., Y. Peng, A. Leligdowicz, I. Zaidi, L. Li, H. Griffin, M. E. Blais, T. Vincent, M. Saraiva, L. M. Yindom, C. van Tienen, P. Easterbrook, A. Jaye, H. Whittle, T. Dong, and S. L. Rowland-Jones. 2013. 'Correlates of T-cell-mediated viral control and phenotype of CD8(+) T cells in HIV-2, a naturally contained human retroviral infection', *Blood*, 121: 4330-9.
- Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Dowton, and J. Mills. 1995. 'Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients', *Science*, 270: 988-91.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. 'Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1', *Nature*, 381: 661-6.
- Dennison, S. M., K. M. Anasti, F. H. Jaeger, S. M. Stewart, J. Pollara, P. Liu, E. L. Kunz, R. Zhang, N. Vandergrift, S. Permar, G. Ferrari, G. D. Tomaras, M. Bonsignori, N. L. Michael, J. H. Kim, J. Kaewkungwal, S. Nitayaphan, P. Pitisuttithum, S. Reks-Ngarm, H. X. Liao, B. F. Haynes, and S. M. Alam. 2014. 'Vaccine-induced HIV-1 envelope gp120 constant region 1-specific antibodies expose a CD4-inducible epitope and block the interaction of HIV-1 gp140 with galactosylceramide', *J Virol*, 88: 9406-17.
- Dharan, A., S. Talley, A. Tripathi, J. I. Mamede, M. Majetschak, T. J. Hope, and E. M. Campbell. 2016. 'KIF5B and Nup358 Cooperatively Mediate the Nuclear Import of HIV-1 during Infection', *PLoS Pathog*, 12: e1005700.
- Di Nunzio, F., T. Fricke, A. Miccio, J. C. Valle-Casuso, P. Perez, P. Souque, E. Rizzi, M. Severgnini, F. Mavilio, P. Charneau, and F. Diaz-Griffero. 2013. 'Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication', *Virology*, 440: 8-18.
- Dick, R. A., K. K. Zadrozny, C. Xu, F. K. M. Schur, T. D. Lyddon, C. L. Ricana, J. M. Wagner, J. R. Perilla, B. K. Ganser-Pornillos, M. C. Johnson, O. Pornillos, and V. M. Vogt. 2018. 'Inositol phosphates are assembly co-factors for HIV-1', *Nature*, 560: 509-12.
- Ding, H., P. J. Dolan, and G. V. Johnson. 2008. 'Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau', *J Neurochem*, 106: 2119-30.
- Divita, G., K. Rittinger, C. Geourjon, G. Deléage, and R. S. Goody. 1995. 'Dimerization kinetics of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase: a two step process', *J Mol Biol*, 245: 508-21.
- Doms, R. W., P. L. Earl, and B. Moss. 1991. 'The assembly of the HIV-1 env glycoprotein into dimers and tetramers', *Adv Exp Med Biol*, 300: 203-19; discussion 20-1.
- Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. 'HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5', *Nature*, 381: 667-73.
- Dubois, N., K. K. Khoo, S. Ghossein, T. Seissler, P. Wolff, W. J. McKinstry, J. Mak, J. C. Paillart, R. Marquet, and S. Bernacchi. 2018. 'The C-terminal p6 domain of the HIV-1 Pr55(Gag) precursor is required for specific binding to the genomic RNA', *RNA Biol*, 15: 923-36.
- 'The Durban Declaration'. 2000. *Nature*, 406: 15-6.
- Dussupt, V., M. P. Javid, G. Abou-Jaoudé, J. A. Jadwin, J. de La Cruz, K. Nagashima, and F. Bouamr. 2009. 'The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPxN late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding', *PLoS Pathog*, 5: e1000339.
- Earp, L. J., S. E. Delos, H. E. Park, and J. M. White. 2005. 'The many mechanisms of viral membrane fusion proteins', *Curr Top Microbiol Immunol*, 285: 25-66.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Egan, M. A., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano. 1996. 'Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein', *J Virol*, 70: 6547-56.
- Esposito, D., and R. Craigie. 1999. 'HIV integrase structure and function', *Adv Virus Res*, 52: 319-33.
- Essex, M., M. F. McLane, T. H. Lee, L. Falk, C. W. Howe, J. I. Mullins, C. Cabradilla, and D. P. Francis. 1983. 'Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS', *Science*, 220: 859-62.
- Etemad, B., A. Fellows, B. Kwambana, A. Kamat, Y. Feng, S. Lee, and M. Sagar. 2009. 'Human immunodeficiency virus type 1 V1-to-V5 envelope variants from the chronic phase of infection use CCR5 and fuse more efficiently than those from early after infection', *J Virol*, 83: 9694-708.
- Eugen-Olsen, J., A. K. Iversen, P. Garred, U. Koppelhus, C. Pedersen, T. L. Benfield, A. M. Sorensen, T. Katzenstein, E. Dickmeiss, J. Gerstoft, P. Skinhøj, A. Sveigaard, J. O. Nielsen, and B. Hofmann. 1997. 'Heterozygosity for a deletion in the CCR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals', *AIDS*, 11: 305-10.
- Falcon, A., M. T. Cuevas, A. Rodriguez-Frandsen, N. Reyes, F. Pozo, S. Moreno, J. Ledesma, J. Martínez-Alarcón, A. Nieto, and I. Casas. 2015. 'CCR5 deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection', *J Gen Virol*, 96: 2074-78.
- Farnet, C. M., and F. D. Bushman. 1997. 'HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro', *Cell*, 88: 483-92.
- Farrow, M. A., M. Somasundaran, C. Zhang, D. Gabuzda, J. L. Sullivan, and T. C. Greenough. 2005. 'Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 21: 565-74.
- Feeney, M. E., Y. Tang, K. A. Rosevelt, A. J. Leslie, K. McIntosh, N. Karthas, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. 'Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child', *J Virol*, 78: 8927-30.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. 'HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor', *Science*, 272: 872-7.
- Fernandez, J., D. M. Portilho, A. Danckaert, S. Munier, A. Becker, P. Roux, A. Zambo, S. Shorte, Y. Jacob, P. O. Vidalain, P. Charneau, F. Clavel, and N. J. Arhel. 2015. 'Microtubule-associated proteins 1 (MAP1) promote human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) intracytoplasmic routing to the nucleus', *J Biol Chem*, 290: 4631-46.
- Flores-Villanueva, P. O., E. J. Yunis, J. C. Delgado, E. Vittinghoff, S. Buchbinder, J. Y. Leung, A. M. Ugliarolo, O. P. Clavijo, E. S. Rosenberg, S. A. Kalams, J. D. Braun, S. L. Boswell, B. D. Walker, and A. E. Goldfeld. 2001. 'Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 5140-5.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Ford, E. S., C. E. Puronen, and I. Sereti. 2009. 'Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm', *Curr Opin HIV AIDS*, 4: 206-14.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban. 1994. 'Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions', *Nature*, 372: 359-62.
- Friedman-Kien, A. E. 1981. 'Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men', *J Am Acad Dermatol*, 5: 468-71.
- Fultz, P. N., H. M. McClure, D. C. Anderson, R. B. Swenson, R. Anand, and A. Srinivasan. 1986. 'Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 5286-90.
- Gallo, R. C., and L. Montagnier. 2003. 'The discovery of HIV as the cause of AIDS', *N Engl J Med*, 349: 2283-5.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic. 1983. 'Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)', *Science*, 220: 865-7.
- Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, and R. Blumenthal. 2003. 'The HIV Env-mediated fusion reaction', *Biochim Biophys Acta*, 1614: 36-50.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1999. 'Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*', *Nature*, 397: 436-41.
- Garcia, J. V., and A. D. Miller. 1991. 'Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef', *Nature*, 350: 508-11.
- García-Expósito, L., S. Ziglio, J. Barroso-González, L. de Armas-Rillo, M. S. Valera, D. Zipeto, J. D. Machado, and A. Valenzuela-Fernández. 2013. 'Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection', *Retrovirology*, 10: 39.
- Gelmann, E. P., M. Popovic, D. Blayney, H. Masur, G. Sidhu, R. E. Stahl, and R. C. Gallo. 1983. 'Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS', *Science*, 220: 862-5.
- German Advisory Committee Blood, Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood. 2016. 'Human Immunodeficiency Virus (HIV)', *Transfus Med Hemother*, 43: 203-22.
- Glass, W. G., D. H. McDermott, J. K. Lim, S. Lekhong, S. F. Yu, W. A. Frank, J. Pape, R. C. Cheshier, and P. M. Murphy. 2006. 'CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection', *J Exp Med*, 203: 35-40.
- Goffinet, C., I. Allespach, S. Homann, H. M. Tervo, A. Habermann, D. Rupp, L. Oberbremer, C. Kern, N. Tibroni, S. Welsch, J. Krijnse-Locker, G. Banting, H. G. Kräusslich, O. T. Fackler, and O. T. Keppler. 2009. 'HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor', *Cell Host Microbe*, 5: 285-97.
- Gottlieb, G. S., S. E. Hawes, H. D. Agne, J. E. Stern, C. W. Critchlow, N. B. Kiviat, and P. S. Sow. 2006. 'Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission', *AIDS*, 20: 895-900.
- Gottlieb, G. S., P. S. Sow, S. E. Hawes, I. Ndoye, M. Redman, A. M. Coll-Seck, M. A. Faye-Niang, A. Diop, J. M. Kuypers, C. W. Critchlow, R. Respass, J. I. Mullins, and N. B. Kiviat. 2002. 'Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4+ T cell

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa', *J Infect Dis*, 185: 905-14.
- Gottlieb, M. S. 2006. 'Pneumocystis pneumonia--Los Angeles, 1981', *Am J Public Health*, 96: 980-1; discussion 82-3.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. 1981. 'Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency', *N Engl J Med*, 305: 1425-31.
- Gottwein, E., S. Jäger, A. Habermann, and H. G. Kräusslich. 2006. 'Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect', *J Virol*, 80: 6267-75.
- Gottwein, E., and H. G. Kräusslich. 2005. 'Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination', *J Virol*, 79: 9134-44.
- Goulder, P. J., M. Bunce, P. Krausa, K. McIntyre, S. Crowley, B. Morgan, A. Edwards, P. Giangrande, R. E. Phillips, and A. J. McMichael. 1996. 'Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1691-8.
- Graves, M. C., M. C. Meidel, Y. C. Pan, M. Manneberg, H. W. Lahm, and F. Grüniger-Leitch. 1990. 'Identification of a human immunodeficiency virus-1 protease cleavage site within the 66,000 Dalton subunit of reverse transcriptase', *Biochem Biophys Res Commun*, 168: 30-6.
- Gray, R. H., M. J. Wawer, R. Brookmeyer, N. K. Sewankambo, D. Serwadda, F. Wabwire-Mangen, T. Lutalo, X. Li, T. vanCott, and T. C. Quinn. 2001. 'Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda', *Lancet*, 357: 1149-53.
- Grozier, C. M., C. A. Hassig, and S. L. Schreiber. 1999. 'Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 4868-73.
- Guo, X., H. Ruan, X. Li, L. Qin, Y. Tao, X. Qi, J. Gao, L. Gan, S. Duan, and W. Shen. 2015. 'Subcellular Localization of Class I Histone Deacetylases in the Developing *Xenopus tectum*', *Front Cell Neurosci*, 9: 510.
- Gupta, R. K., S. Abdul-Jawad, L. E. McCoy, H. P. Mok, D. Peppia, M. Salgado, J. Martinez-Picado, M. Nijhuis, A. M. J. Wensing, H. Lee, P. Grant, E. Nastouli, J. Lambert, M. Pace, F. Salasc, C. Monit, A. J. Innes, L. Muir, L. Waters, J. Frater, A. M. L. Lever, S. G. Edwards, I. H. Gabriel, and E. Olavarria. 2019. 'HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation', *Nature*, 568: 244-48.
- Gupta, R. K., D. Peppia, A. L. Hill, C. Gálvez, M. Salgado, M. Pace, L. E. McCoy, S. A. Griffith, J. Thornhill, A. Alrubayyi, L. E. P. Huyveneers, E. Nastouli, P. Grant, S. G. Edwards, A. J. Innes, J. Frater, M. Nijhuis, A. M. J. Wensing, J. Martinez-Picado, and E. Olavarria. 2020. 'Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report', *Lancet HIV*, 7: e340-e47.
- Gurdasani, D., L. Iles, D. G. Dillon, E. H. Young, A. D. Olson, V. Naranbhai, S. Fidler, E. Gkrania-Klotsas, F. A. Post, P. Kellam, K. Porter, and M. S. Sandhu. 2014. 'A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression', *AIDS*, 28: 149-62.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon. 1987. 'Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2', *Nature*, 326: 662-9.
- Haberland, M., R. L. Montgomery, and E. N. Olson. 2009. 'The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy', *Nat Rev Genet*, 10: 32-42.
- Hagogian, A., D. Rao, A. Katz, S. Sanford, and S. Barnhart. 2017. 'Anti-homosexual legislation and HIV-related stigma in African nations: what has been the role of PEPFAR?', *Glob Health Action*, 10: 1306391.
- Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten. 1992. 'Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160', *Nature*, 360: 358-61.
- Hao, H. N., F. C. Chiu, L. Losev, K. M. Weidenheim, W. K. Rashbaum, and W. D. Lyman. 1997. 'HIV infection of human fetal neural cells is mediated by gp120 binding to a cell membrane-associated molecule that is not CD4 nor galactocerebroside', *Brain Res*, 764: 149-57.
- Harouse, J. M., S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, and F. Gonzalez-Scarano. 1991. 'Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide', *Science*, 253: 320-3.
- Harris, M. 1995. 'The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins', *Biochem Soc Trans*, 23: 557-61.
- Harris, R. S., S. K. Petersen-Mahrt, and M. S. Neuberger. 2002. 'RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators', *Mol Cell*, 10: 1247-53.
- Hattori, N., F. Michaels, K. Fagnoli, L. Marcon, R. C. Gallo, and G. Franchini. 1990. 'The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8080-4.
- Hawes, S. E., P. S. Sow, J. E. Stern, C. W. Critchlow, G. S. Gottlieb, and N. B. Kiviat. 2008. 'Lower levels of HIV-2 than HIV-1 in the female genital tract: correlates and longitudinal assessment of viral shedding', *AIDS*, 22: 2517-25.
- Heinzinger, N. K., M. I. Bukrinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. 'The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7311-5.
- Hill, M. K., A. Bellamy-McIntyre, L. J. Vella, S. M. Campbell, J. A. Marshall, G. Tachedjian, and J. Mak. 2007. 'Alteration of the proline at position 7 of the HIV-1 spacer peptide p1 suppresses viral infectivity in a strain dependent manner', *Curr HIV Res*, 5: 69-78.
- Hill, M. K., M. Shehu-Xhilaga, S. M. Crowe, and J. Mak. 2002. 'Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability', *J Virol*, 76: 11245-53.
- Hill, M., G. Tachedjian, and J. Mak. 2005. 'The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins', *Curr HIV Res*, 3: 73-85.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Hizi, A., R. Tal, M. Shaharabany, and S. Loya. 1991. 'Catalytic properties of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2', *J Biol Chem*, 266: 6230-9.
- Hollingsworth, T. D., O. Laeyendecker, G. Shirreff, C. A. Donnelly, D. Serwadda, M. J. Wawer, N. Kiwanuka, F. Nalugoda, A. Collinson-Streng, V. Ssempijja, W. P. Hanage, T. C. Quinn, R. H. Gray, and C. Fraser. 2010. 'HIV-1 transmitting couples have similar viral load set-points in Rakai, Uganda', *PLoS Pathog*, 6: e1000876.
- Hook, S. S., A. Orian, S. M. Cowley, and R. N. Eisenman. 2002. 'Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13425-30.
- Hu, W. S., and S. H. Hughes. 2012. 'HIV-1 reverse transcription', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Hu, W. S., and H. M. Temin. 1990. 'Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 1556-60.
- Huang, J., E. Barr, and D. A. Rudnick. 2013. 'Characterization of the regulation and function of zinc-dependent histone deacetylases during rodent liver regeneration', *Hepatology*, 57: 1742-51.
- Huang, X., H. Chen, W. Li, H. Li, X. Jin, A. S. Perelson, Z. Fox, T. Zhang, X. Xu, and H. Wu. 2012. 'Precise determination of time to reach viral load set point after acute HIV-1 infection', *J Acquir Immune Defic Syndr*, 61: 448-54.
- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X. F. Wang, and T. P. Yao. 2002. 'HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase', *Nature*, 417: 455-8.
- Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson. 1990. 'Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1', *Nature*, 345: 356-9.
- Huo, L., D. Li, X. Sun, X. Shi, P. Karna, W. Yang, M. Liu, W. Qiao, R. Aneja, and J. Zhou. 2011. 'Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6', *J Biol Chem*, 286: 9280-6.
- Hütter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Müssig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kücherer, O. Blau, I. W. Blau, W. K. Hofmann, and E. Thiel. 2009. 'Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation', *N Engl J Med*, 360: 692-8.
- Iyengar, S., J. E. Hildreth, and D. H. Schwartz. 1998. 'Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells', *J Virol*, 72: 5251-5.
- Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus. 1988. 'Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression', *Nature*, 331: 280-3.
- Jacques, P. S., B. M. Wöhrli, K. J. Howard, and S. F. Le Grice. 1994. 'Modulation of HIV-1 reverse transcriptase function in "selectively deleted" p66/p51 heterodimers', *J Biol Chem*, 269: 1388-93.
- Jäger, S., E. Gottwein, and H. G. Kräusslich. 2007. 'Ubiquitination of human immunodeficiency virus type 1 Gag is highly dependent on Gag membrane association', *J Virol*, 81: 9193-201.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Jayaraman, B., J. D. Fernandes, S. Yang, C. Smith, and A. D. Frankel. 2019. 'Highly Mutable Linker Regions Regulate HIV-1 Rev Function and Stability', *Sci Rep*, 9: 5139.
- Jiménez-Baranda, S., C. Gómez-Moutón, A. Rojas, L. Martínez-Prats, E. Mira, R. Ana Lacalle, A. Valencia, D. S. Dimitrov, A. Viola, R. Delgado, A. C. Martínez, and S. Mañes. 2007. 'Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors', *Nat Cell Biol*, 9: 838-46.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, and R. R. Kopito. 1998. 'Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins', *J Cell Biol*, 143: 1883-98.
- Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. 'Acute human immunodeficiency virus type 1 infection', *N Engl J Med*, 339: 33-9.
- Kaneko, H., L. P. Neoh, N. Takeda, H. Akimoto, T. Hishikawa, H. Hashimoto, S. Hirose, S. Karaki, M. Takiguchi, H. Nakauchi, Y. Kaneko, N. Yamamoto, and I. Sekigawa. 1997. 'Human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein binds to CD8 as well as to CD4 molecules on human T cells', *J Virol*, 71: 8918-22.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin. 1987. 'Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product', *Nature*, 330: 489-93.
- Karacostas, V., E. J. Wolffe, K. Nagashima, M. A. Gonda, and B. Moss. 1993. 'Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles', *Virology*, 193: 661-71.
- Kariuki, S. M., P. Selhorst, K. K. Ariën, and J. R. Dorfman. 2017. 'The HIV-1 transmission bottleneck', *Retrovirology*, 14: 22.
- Karpas, A. 2004. 'Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology', *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79: 911-33.
- Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Muñoz, A. J. Saah, J. J. Goedert, C. Winkler, S. J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, and D. L. Mann. 1996. 'Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection', *Nat Med*, 2: 405-11.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito, and T. P. Yao. 2003. 'The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress', *Cell*, 115: 727-38.
- Keele, B. F., J. H. Jones, K. A. Terio, J. D. Estes, R. S. Rudicell, M. L. Wilson, Y. Li, G. H. Learn, T. M. Beasley, J. Schumacher-Stankey, E. Wroblewski, A. Mosser, J. Raphael, S. Kamenya, E. V. Lonsdorf, D. A. Travis, T. Mlengya, M. J. Kinsel, J. G. Else, G. Silvestri, J. Goodall, P. M. Sharp, G. M. Shaw, A. E. Pusey, and B. H. Hahn. 2009. 'Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz', *Nature*, 460: 515-9.
- Kelleher, A. D., C. Long, E. C. Holmes, R. L. Allen, J. Wilson, C. Conlon, C. Workman, S. Shaunak, K. Olson, P. Goulder, C. Brander, G. Ogg, J. S. Sullivan, W. Dyer, I. Jones, A. J. McMichael, S. Rowland-Jones, and R. E. Phillips. 2001. 'Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses', *J Exp Med*, 193: 375-86.
- Kestler, H. W., 3rd, K. Mori, D. P. Silva, T. Kodama, N. W. King, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers. 1990. 'Nef genes of SIV', *J Med Primatol*, 19: 421-9.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Kim, J. Y., S. Shen, K. Dietz, Y. He, O. Howell, R. Reynolds, and P. Casaccia. 2010. 'HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage', *Nat Neurosci*, 13: 180-9.
- Kim, K., A. Dauphin, S. Komurlu, S. M. McCauley, L. Yurkovetskiy, C. Carbone, W. E. Diehl, C. Strambio-De-Castilla, E. M. Campbell, and J. Luban. 2019. 'Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5 α ', *Nat Microbiol*, 4: 2044-51.
- Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Chermann, and et al. 1984. 'Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes', *Science*, 225: 59-63.
- Klaver, B., and B. Berkhout. 1994. 'Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus', *J Virol*, 68: 3830-40.
- Klingler, J., H. Anton, E. Réal, M. Zeiger, C. Moog, Y. Mély, and E. Boutant. 2020. 'How HIV-1 Gag Manipulates Its Host Cell Proteins: A Focus on Interactors of the Nucleocapsid Domain', *Viruses*, 12.
- Kondo, E., and H. G. Göttlinger. 1996. 'A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr', *J Virol*, 70: 159-64.
- Könnnyű, B., S. K. Sadiq, T. Turányi, R. Hírmondó, B. Müller, H. G. Kräusslich, P. V. Coveney, and V. Müller. 2013. 'Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach', *PLoS Comput Biol*, 9: e1003103.
- Kovacs, J. J., P. J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J. T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt, and T. P. Yao. 2005. 'HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor', *Mol Cell*, 18: 601-7.
- Kuritzkes, D. R. 2016. 'Hematopoietic stem cell transplantation for HIV cure', *J Clin Invest*, 126: 432-7.
- Lahm, A., C. Paolini, M. Pallaoro, M. C. Nardi, P. Jones, P. Neddermann, S. Sambucini, M. J. Bottomley, P. Lo Surdo, A. Carfi, U. Koch, R. De Francesco, C. Steinkühler, and P. Gallinari. 2007. 'Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17335-40.
- Lapins, J., H. Gaines, S. Lindbäck, P. Lidbrink, and L. Emtestam. 1997. 'Skin and mucosal characteristics of symptomatic primary HIV-1 infection', *AIDS Patient Care STDS*, 11: 67-70.
- Lassen, K. G., M. A. Lobritz, J. R. Bailey, S. Johnston, S. Nguyen, B. Lee, T. Chou, R. F. Siliciano, M. Markowitz, and E. J. Arts. 2009. 'Elite suppressor-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics', *PLoS Pathog*, 5: e1000377.
- Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, and J. S. Sullivan. 1999. 'Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort', *N Engl J Med*, 340: 1715-22.
- Lee, J. Y., H. Koga, Y. Kawaguchi, W. Tang, E. Wong, Y. S. Gao, U. B. Pandey, S. Kaushik, E. Tresse, J. Lu, J. P. Taylor, A. M. Cuervo, and T. P. Yao. 2010. 'HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy', *Embo j*, 29: 969-80.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi, and A. M. Vandamme. 2003. 'Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 6588-92.
- Leoz, M., F. Feyertag, A. Kfutwah, P. Mauclere, G. Lachenal, F. Damond, F. De Oliveira, V. Lemee, F. Simon, D. L. Robertson, and J. C. Plantier. 2015. 'The Two-Phase Emergence of Non Pandemic HIV-1 Group O in Cameroon', *PLoS Pathog*, 11: e1005029.
- Levy, Jay A. 2007. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*.
- Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau. 1996. 'Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection', *Cell*, 86: 367-77.
- Liu, S., C. Kong, J. Wu, H. Ying, and H. Zhu. 2012. 'Effect of CCR5-Δ32 heterozygosity on HIV-1 susceptibility: a meta-analysis', *PLoS One*, 7: e35020.
- Liu, Y., L. Peng, E. Seto, S. Huang, and Y. Qiu. 2012. 'Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation', *J Biol Chem*, 287: 29168-74.
- Louis, J. M., E. M. Wondrak, A. R. Kimmel, P. T. Wingfield, and N. T. Nashed. 1999. 'Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism', *J Biol Chem*, 274: 23437-42.
- Lu, M., W. Witke, D. J. Kwiatkowski, and K. S. Kosik. 1997. 'Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice', *J Cell Biol*, 138: 1279-87.
- Luciw, P. A., C. Cheng-Mayer, and J. A. Levy. 1987. 'Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 1434-8.
- Lynch, R. M., T. Shen, S. Gnanakaran, and C. A. Derdeyn. 2009. 'Appreciating HIV type 1 diversity: subtype differences in Env', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 25: 237-48.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. 'The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain', *Cell*, 47: 333-48.
- Maddon, P. J., D. R. Littman, M. Godfrey, D. E. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. 'The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family', *Cell*, 42: 93-104.
- Malhotra, U., S. Holte, S. Dutta, M. M. Berrey, E. Delpit, D. M. Koelle, A. Sette, L. Corey, and M. J. McElrath. 2001. 'Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment', *J Clin Invest*, 107: 505-17.
- Malikov, V., E. S. da Silva, V. Jovasevic, G. Bennett, D. A. de Souza Aranha Vieira, B. Schulte, F. Diaz-Griffero, D. Walsh, and M. H. Naghavi. 2015. 'HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus', *Nat Commun*, 6: 6660.
- Malim, M. H., and P. D. Bieniasz. 2012. 'HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006940.
- Manzotti, G., F. Torricelli, B. Donati, V. Sancisi, M. Gugnoni, and A. Ciarrocchi. 2019. 'HDACs control RUNX2 expression in cancer cells through redundant and cell context-dependent mechanisms', *J Exp Clin Cancer Res*, 38: 346.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat. 2003. 'HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation', *Nat Med*, 9: 1398-403.
- Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, and et al. 1994. 'Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1', *Science*, 265: 1587-90.
- Marrero-Hernandez, S., D. Marquez-Arce, R. Cabrera-Rodriguez, J. Estevez-Herrera, S. Perez-Yanes, J. Barroso-Gonzalez, R. Madrid, J. D. Machado, J. Blanco, and A. Valenzuela-Fernandez. 2019. 'HIV-1 Nef Targets HDAC6 to Assure Viral Production and Virus Infection', *Front Microbiol*, 10: 2437.
- Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2002. 'Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS', *Nat Genet*, 31: 429-34.
- Martinez-Picado, J., J. G. Prado, E. E. Fry, K. Pfafferoth, A. Leslie, S. Chetty, C. Thobakgale, I. Honeyborne, H. Crawford, P. Matthews, T. Pillay, C. Rousseau, J. I. Mullins, C. Brander, B. D. Walker, D. I. Stuart, P. Kiepiela, and P. Goulder. 2006. 'Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1', *J Virol*, 80: 3617-23.
- Martinson, J. J., N. H. Chapman, D. C. Rees, Y. T. Liu, and J. B. Clegg. 1997. 'Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion', *Nat Genet*, 16: 100-3.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2002. 'In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation', *Embo j*, 21: 6820-31.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman. 1988. 'Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus', *Cell*, 53: 55-67.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, and E. N. Olson. 2001. 'Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases', *Mol Cell Biol*, 21: 6312-21.
- Medler, T. R., J. M. Craig, A. A. Fiorillo, Y. B. Feeney, J. C. Harrell, and C. V. Clevenger. 2016. 'HDAC6 Deacetylates HMG2 to Regulate Stat5a Activity and Breast Cancer Growth', *Mol Cancer Res*, 14: 994-1008.
- Melo, M. G., E. Sprinz, P. M. Gorbach, B. Santos, T. M. Rocha, M. Simon, M. Almeida, R. Lira, M. C. Chaves, T. Kerin, I. Varella, and K. Nielsen-Saines. 2019. 'HIV-1 heterosexual transmission and association with sexually transmitted infections in the era of treatment as prevention', *Int J Infect Dis*, 87: 128-34.
- Mercenne, G., S. Bernacchi, D. Richer, G. Bec, S. Henriët, J. C. Paillart, and R. Marquet. 2010. 'HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation', *Nucleic Acids Res*, 38: 633-46.
- Michel, N., K. Ganter, S. Venzke, J. Bitzegeio, O. T. Fackler, and O. T. Keppler. 2006. 'The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling', *Mol Biol Cell*, 17: 3578-90.
- Miedema, F., L. Meyaard, M. Koot, M. R. Klein, M. T. Roos, M. Groenink, R. A. Fouchier, A. B. Van't Wout, M. Tersmette, P. T. Schellekens, and et al. 1994. 'Changing

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- virus-host interactions in the course of HIV-1 infection', *Immunol Rev*, 140: 35-72.
- Migueles, S. A., M. S. Sabbaghian, W. L. Shupert, M. P. Bettinotti, F. M. Marincola, L. Martino, C. W. Hallahan, S. M. Selig, D. Schwartz, J. Sullivan, and M. Connors. 2000. 'HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2709-14.
- Miura, T., M. A. Brockman, A. Schneidewind, M. Lobritz, F. Pereyra, A. Rathod, B. L. Block, Z. L. Brumme, C. J. Brumme, B. Baker, A. C. Rothchild, B. Li, A. Trocha, E. Cutrell, N. Frahm, C. Brander, I. Toth, E. J. Arts, T. M. Allen, and B. D. Walker. 2009. 'HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition', *J Virol*, 83: 2743-55.
- Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo. 1976. 'Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows', *Science*, 193: 1007-8.
- Muriaux, D., H. De Rocquigny, B. P. Roques, and J. Paoletti. 1996. 'NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer', *J Biol Chem*, 271: 33686-92.
- Mzingwane, M. L., and C. T. Tiemessen. 2017. 'Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs', *Rev Med Virol*, 27.
- Naghavi, M. H., S. Valente, T. Hatzioannou, K. de Los Santos, Y. Wen, C. Mott, G. G. Gundersen, and S. P. Goff. 2007. 'Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells', *Embo j*, 26: 41-52.
- Navia, M. A., P. M. Fitzgerald, B. M. McKeever, C. T. Leu, J. C. Heimbach, W. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke, and J. P. Springer. 1989. 'Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1', *Nature*, 337: 615-20.
- Navis, M., I. Schellens, D. van Baarle, J. Borghans, P. van Swieten, F. Miedema, N. Kootstra, and H. Schuitemaker. 2007. 'Viral replication capacity as a correlate of HLA B57/B5801-associated nonprogressive HIV-1 infection', *J Immunol*, 179: 3133-43.
- Niederman, T. M., B. J. Thielan, and L. Ratner. 1989. 'Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 1128-32.
- Nisole, S., B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J. P. Briand, and A. G. Hovanessian. 1999. 'The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans', *J Biol Chem*, 274: 27875-84.
- Nisole, S., C. Lynch, J. P. Stoye, and M. W. Yap. 2004. 'A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13324-8.
- Nixon, D. F., A. R. Townsend, J. G. Elvin, C. R. Rizza, J. Gallwey, and A. J. McMichael. 1988. 'HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides', *Nature*, 336: 484-7.
- NobelPrize.org. 2008. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008." In.
- O'Donovan, D., K. Ariyoshi, P. Milligan, M. Ota, L. Yamuah, R. Sarge-Njie, and H. Whittle. 2000. 'Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. MRC/Gambia Government/University College London Medical School working group on mother-child transmission of HIV', *AIDS*, 14: 441-8.
- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelerie, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. 'The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1', *Nature*, 382: 833-5.
- Olshevsky, U., E. Helseth, C. Furman, J. Li, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1990. 'Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding', *J Virol*, 64: 5701-7.
- Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert. 2000. 'Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag', *Virology*, 278: 111-21.
- Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson. 1998. 'Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus', *J Virol*, 72: 2962-8.
- Ouyang, H., Y. O. Ali, M. Ravichandran, A. Dong, W. Qiu, F. MacKenzie, S. Dhe-Paganon, C. H. Arrowsmith, and R. G. Zhai. 2012. 'Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini', *J Biol Chem*, 287: 2317-27.
- Pai, M. T., S. R. Tzeng, J. J. Kovacs, M. A. Keaton, S. S. Li, T. P. Yao, and P. Zhou. 2007. 'Solution structure of the Ubp-M BUZ domain, a highly specific protein module that recognizes the C-terminal tail of free ubiquitin', *J Mol Biol*, 370: 290-302.
- Panda, A. K., A. Padhi, and B. A. K. Prusty. 2020. 'CCR5 Δ 32 minor allele is associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and death: An epidemiological investigation', *Clin Chim Acta*, 510: 60-61.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, J. A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Øvervatn, G. Bjørkøy, and T. Johansen. 2007. 'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy', *J Biol Chem*, 282: 24131-45.
- Peeters, M., V. Courgnaud, B. Abela, P. Auzel, X. Pourrut, F. Bibollet-Ruche, S. Loul, F. Liegeois, C. Butel, D. Koulagna, E. Mpoudi-Ngole, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and E. Delaporte. 2002. 'Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat', *Emerg Infect Dis*, 8: 451-7.
- Peeters, M., M. D'Arc, and E. Delaporte. 2014. 'Origin and diversity of human retroviruses', *AIDS Rev*, 16: 23-34.
- Peeters, M., C. Honore, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte. 1989. 'Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon', *AIDS*, 3: 625-30.
- Peliska, J. A., S. Balasubramanian, D. P. Giedroc, and S. J. Benkovic. 1994. 'Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein accelerates HIV-1 reverse transcriptase catalyzed DNA strand transfer reactions and modulates RNase H activity', *Biochemistry*, 33: 13817-23.
- Pettit, S. C., L. E. Everitt, S. Choudhury, B. M. Dunn, and A. H. Kaplan. 2004. 'Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- activated protease occurs by an intramolecular mechanism', *J Virol*, 78: 8477-85.
- Piguet, V., L. Wan, C. Borel, A. Mangasarian, N. Demaurex, G. Thomas, and D. Trono. 2000. 'HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes', *Nat Cell Biol*, 2: 163-7.
- Pilcher, C. D., H. C. Tien, J. J. Eron, Jr., P. L. Vernazza, S. Y. Leu, P. W. Stewart, L. E. Goh, and M. S. Cohen. 2004. 'Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV', *J Infect Dis*, 189: 1785-92.
- Piot, P., T. C. Quinn, H. Taelman, F. M. Feinsod, K. B. Minlangu, O. Wobin, N. Mbendi, P. Mazebo, K. Ndangi, W. Stevens, and et al. 1984. 'Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire', *Lancet*, 2: 65-9.
- Plantier, J. C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemeé, F. Damond, D. L. Robertson, and F. Simon. 2009. 'A new human immunodeficiency virus derived from gorillas', *Nat Med*, 15: 871-2.
- Poeschla, E. M. 2008. 'Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication', *Cell Mol Life Sci*, 65: 1403-24.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980. 'Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 7415-9.
- Poljak, L., S. M. Batson, D. Ficheux, B. P. Roques, J. L. Darlix, and E. Käs. 2003. 'Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins', *J Mol Biol*, 329: 411-21.
- Pollakis, G., A. Abebe, A. Kliphuis, M. I. Chalaby, M. Bakker, Y. Mengistu, M. Brouwer, J. Goudsmit, H. Schuitemaker, and W. A. Paxton. 2004. 'Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals', *J Virol*, 78: 2841-52.
- Popov, S., E. Popova, M. Inoue, Y. Wu, and H. Göttlinger. 2018. 'HIV-1 gag recruits PACSIN2 to promote virus spreading', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 7093-98.
- Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. 'Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex', *J Biol Chem*, 273: 13347-52.
- Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki. 1999. 'Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2', *J Infect Dis*, 180: 1116-21.
- Pornillos, O., B. K. Ganser-Pornillos, and M. Yeager. 2011. 'Atomic-level modelling of the HIV capsid', *Nature*, 469: 424-7.
- Post, K., J. Guo, K. J. Howard, M. D. Powell, J. T. Miller, A. Hizi, S. F. Le Grice, and J. G. Levin. 2003. 'Human immunodeficiency virus type 2 reverse transcriptase activity in model systems that mimic steps in reverse transcription', *J Virol*, 77: 7623-34.
- Puigdomènech, I., M. Massanella, C. Cabrera, B. Clotet, and J. Blanco. 2009. 'On the steps of cell-to-cell HIV transmission between CD4 T cells', *Retrovirology*, 6: 89.
- Rabson, A. B., and M. A. Martin. 1985. 'Molecular organization of the AIDS retrovirus', *Cell*, 40: 477-80.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Rangel, H. R., J. Weber, B. Chakraborty, A. Gutierrez, M. L. Marotta, M. Mirza, P. Kiser, M. A. Martinez, J. A. Este, and M. E. Quiñones-Mateu. 2003. 'Role of the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene in viral fitness', *J Virol*, 77: 9069-73.
- Rausch, J. W., and S. F. Le Grice. 2015. 'HIV Rev Assembly on the Rev Response Element (RRE): A Structural Perspective', *Viruses*, 7: 3053-75.
- Rinaldo, C. R. 2013. 'HIV-1 Trans Infection of CD4(+) T Cells by Professional Antigen Presenting Cells', *Scientifica (Cairo)*, 2013: 164203.
- Robb, M. L., L. A. Eller, H. Kibuuka, K. Rono, L. Maganga, S. Nitayaphan, E. Kroon, F. K. Sawe, S. Sinei, S. Sriplienchan, L. L. Jagodzinski, J. Malia, M. Manak, M. S. de Souza, S. Tovanabutra, E. Sanders-Buell, M. Rolland, J. Dorsey-Spitz, M. A. Eller, M. Milazzo, Q. Li, A. Lewandowski, H. Wu, E. Swann, R. J. O'Connell, S. Peel, P. Dawson, J. H. Kim, and N. L. Michael. 2016. 'Prospective Study of Acute HIV-1 Infection in Adults in East Africa and Thailand', *N Engl J Med*, 374: 2120-30.
- Roeth, J. F., M. Williams, M. R. Kasper, T. M. Filzen, and K. L. Collins. 2004. 'HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail', *J Cell Biol*, 167: 903-13.
- Rosa, A., A. Chande, S. Ziglio, V. De Sanctis, R. Bertorelli, S. L. Goh, S. M. McCauley, A. Nowosielska, S. E. Antonarakis, J. Luban, F. A. Santoni, and M. Pizzato. 2015. 'HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation', *Nature*, 526: 212-7.
- Ruiz-Mateos, E., L. Tarancon-Diez, A. I. Alvarez-Rios, B. Dominguez-Molina, M. Genebat, I. Pulido, M. A. Abad, M. A. Muñoz-Fernandez, and M. Leal. 2018. 'Association of heterozygous CCR5Δ32 deletion with survival in HIV-infection: A cohort study', *Antiviral Res*, 150: 15-19.
- Ruscetti, F. W., D. A. Morgan, and R. C. Gallo. 1977. 'Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro', *J Immunol*, 119: 131-8.
- Saad, J. S., J. Miller, J. Tai, A. Kim, R. H. Ghanam, and M. F. Summers. 2006. 'Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11364-9.
- Sabo, Y., K. de Los Santos, and S. P. Goff. 2020. 'IQGAP1 Negatively Regulates HIV-1 Gag Trafficking and Virion Production', *Cell Rep*, 30: 4065-81.e4.
- Sakai, K., X. Y. Ma, I. Gordienko, and D. J. Volsky. 1991. 'Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of the vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity', *J Virol*, 65: 5765-73.
- Sandonís, V., C. Casado, T. Alvaro, M. Pernas, I. Olivares, S. García, C. Rodríguez, J. del Romero, and C. López-Galíndez. 2009. 'A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNP', *Virology*, 391: 73-82.
- Santos, G., A. Valenzuela-Fernández, and N. V. Torres. 2014. 'Quantitative analysis of the processes and signaling events involved in early HIV-1 infection of T cells', *PLoS One*, 9: e103845.
- Schindler, M., S. Würfl, P. Benaroch, T. C. Greenough, R. Daniels, P. Easterbrook, M. Brenner, J. Münch, and F. Kirchhoff. 2003. 'Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles', *J Virol*, 77: 10548-56.
- Schubert, U., L. C. Antón, I. Bacík, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orłowski, K. Strebel, and J. W. Yewdell. 1998. 'CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway', *J Virol*, 72: 2280-8.
- Schwartz, O., V. Maréchal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard. 1996. 'Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein', *Nat Med*, 2: 338-42.
- Schwer, B., and E. Verdin. 2008. 'Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins', *Cell Metab*, 7: 104-12.
- Seibenhener, M. L., J. R. Babu, T. Geetha, H. C. Wong, N. R. Krishna, and M. W. Wooten. 2004. 'Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation', *Mol Cell Biol*, 24: 8055-68.
- Seigneurin-Berny, D., A. Verdel, S. Curtet, C. Lemerrier, J. Garin, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2001. 'Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways', *Mol Cell Biol*, 21: 8035-44.
- Selden, L. A., H. J. Kinosian, J. Newman, B. Lincoln, C. Hurwitz, L. C. Gershman, and J. E. Estes. 1998. 'Severing of F-actin by the amino-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin', *Biophys J*, 75: 3092-100.
- Selig, L., J. C. Pages, V. Tanchou, S. Prévéral, C. Berlioz-Torrent, L. X. Liu, L. Erdtmann, J. Darlix, R. Benarous, and S. Benichou. 1999. 'Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses', *J Virol*, 73: 592-600.
- Serra-Moreno, R., and D. T. Evans. 2012. 'Adaptation of human and simian immunodeficiency viruses for resistance to tetherin/BST-2', *Curr HIV Res*, 10: 277-82.
- Serrador, J. M., J. R. Cabrero, D. Sancho, M. Mittelbrunn, A. Urzainqui, and F. Sánchez-Madrid. 2004. 'HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization', *Immunity*, 20: 417-28.
- Sette, P., V. Dussupt, and F. Bouamr. 2012. 'Identification of the HIV-1 NC binding interface in Alix Bro1 reveals a role for RNA', *J Virol*, 86: 11608-15.
- Sette, P., K. Nagashima, R. C. Piper, and F. Bouamr. 2013. 'Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding', *Retrovirology*, 10: 79.
- Sharp, P. M., and B. H. Hahn. 2011. 'Origins of HIV and the AIDS pandemic', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1: a006841.
- Sharp, P. M., and P. Simmonds. 2011. 'Evaluating the evidence for virus/host co-evolution', *Curr Opin Virol*, 1: 436-41.
- Shaw, G. M., and E. Hunter. 2012. 'HIV transmission', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Shaw, J. M., P. W. Hunt, J. W. Critchfield, D. H. McConnell, J. C. Garcia, R. B. Pollard, M. Somsouk, S. G. Deeks, and B. L. Shacklett. 2013. 'Short communication: HIV+ viremic slow progressors maintain low regulatory T cell numbers in rectal mucosa but exhibit high T cell activation', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 29: 172-7.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim. 2002. 'Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein', *Nature*, 418: 646-50.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Shehu-Xhilaga, M., J. Y. Lee, S. Campbell, J. A. Marshall, S. M. Crowe, and J. Mak. 2002. 'Overexpression and incorporation of GagPol precursor does not impede packaging of HIV-1 tRNA(Lys3) but promotes intracellular budding of virus-like particles', *J Biomed Sci*, 9: 697-705.
- Sheppard, H. W., C. Celum, N. L. Michael, S. O'Brien, M. Dean, M. Carrington, D. Dondero, and S. P. Buchbinder. 2002. 'HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion', *J Acquir Immune Defic Syndr*, 29: 307-13.
- Siegal, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg, and et al. 1981. 'Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions', *N Engl J Med*, 305: 1439-44.
- Silver, Z. A., G. M. Dickinson, M. S. Seaman, and R. C. Desrosiers. 2019. 'A Highly Unusual V1 Region of Env in an Elite Controller of HIV Infection', *J Virol*, 93.
- Silvestri, G., D. L. Sodora, R. A. Koup, M. Paiardini, S. P. O'Neil, H. M. McClure, S. I. Staprans, and M. B. Feinberg. 2003. 'Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia', *Immunity*, 18: 441-52.
- Simon, F., S. Matheron, C. Tamalet, I. Loussert-Ajaka, S. Bartczak, J. M. Pepin, C. Dhiver, E. Gamba, C. Elbim, J. A. Gastaut, and et al. 1993. 'Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2', *AIDS*, 7: 1411-7.
- Smoleń-Dzirba, J., M. Rosińska, J. Janiec, M. Beniowski, M. Cycoń, J. Bratosiewicz-Wąsik, and T. J. Wąsik. 2017. 'HIV-1 Infection in Persons Homozygous for CCR5-Δ32 Allele: The Next Case and the Review', *AIDS Rev*, 19: 219-30.
- Sol-Foulon, N., A. Moris, C. Nobile, C. Boccaccio, A. Engering, J. P. Abastado, J. M. Heard, Y. van Kooyk, and O. Schwartz. 2002. 'HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread', *Immunity*, 16: 145-55.
- Solloch, U. V., K. Lang, V. Lange, I. Böhme, A. H. Schmidt, and J. Sauter. 2017. 'Frequencies of gene variant CCR5-Δ32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers', *Hum Immunol*, 78: 710-17.
- Stacey, A. R., P. J. Norris, L. Qin, E. A. Haygreen, E. Taylor, J. Heitman, M. Lebedeva, A. DeCamp, D. Li, D. Grove, S. G. Self, and P. Borrow. 2009. 'Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections', *J Virol*, 83: 3719-33.
- Steckbeck, J. D., J. K. Craig, C. O. Barnes, and R. C. Montelaro. 2011. 'Highly conserved structural properties of the C-terminal tail of HIV-1 gp41 protein despite substantial sequence variation among diverse clades: implications for functions in viral replication', *J Biol Chem*, 286: 27156-66.
- Stewart, G. J., L. J. Ashton, R. A. Biti, R. A. Ffrench, B. H. Bennetts, N. R. Newcombe, E. M. Benson, A. Carr, D. A. Cooper, and J. M. Kaldor. 1997. 'Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group', *AIDS*, 11: 1833-8.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene. 2003. 'HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability', *Mol Cell*, 12: 591-601.
- Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. 'The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys', *Nature*, 427: 848-53.
- Stremlau, M., M. Perron, M. Lee, Y. Li, B. Song, H. Javanbakht, F. Diaz-Griffero, D. J. Anderson, W. I. Sundquist, and J. Sodroski. 2006. 'Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5514-9.
- Sun, A. Q., Y. Luo, D. S. Backos, S. Xu, N. Balasubramanian, P. Reigan, and F. J. Suchy. 2013. 'Identification of functionally relevant lysine residues that modulate human farnesoid X receptor activation', *Mol Pharmacol*, 83: 1078-86.
- Taunton, J., C. A. Hassig, and S. L. Schreiber. 1996. 'A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p', *Science*, 272: 408-11.
- Tedbury, P. R., and E. O. Freed. 2014. 'The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation', *Trends Microbiol*, 22: 372-8.
- Telenti, A. 2005. 'Adaptation, co-evolution, and human susceptibility to HIV-1 infection', *Infect Genet Evol*, 5: 327-34.
- Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. 'RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus', *Nature*, 226: 1211-3.
- Thomas, R., R. Apps, Y. Qi, X. Gao, V. Male, C. O'Huigin, G. O'Connor, D. Ge, J. Fellay, J. N. Martin, J. Margolick, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, M. P. Martin, A. Telenti, S. G. Deeks, B. D. Walker, D. Goldstein, D. W. McVicar, A. Moffett, and M. Carrington. 2009. 'HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C', *Nat Genet*, 41: 1290-4.
- Ugolini, S., I. Mondor, and Q. J. Sattentau. 1999. 'HIV-1 attachment: another look', *Trends Microbiol*, 7: 144-9.
- Usami, Y., S. Popov, E. Popova, and H. G. Göttlinger. 2008. 'Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase', *J Virol*, 82: 4898-907.
- Usami, Y., Y. Wu, and H. G. Göttlinger. 2015. 'SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef', *Nature*, 526: 218-23.
- Valenzuela, A., J. Blanco, B. Krust, R. Franco, and A. G. Hovanessian. 1997. 'Neutralizing antibodies against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 block the CD4-dependent and -independent binding of virus to cells', *J Virol*, 71: 8289-98.
- Valenzuela-Fernández, A., S. Alvarez, M. Gordon-Alonso, M. Barrero, A. Ursa, J. R. Cabrero, G. Fernández, S. Naranjo-Suárez, M. Yáñez-Mo, J. M. Serrador, M. A. Muñoz-Fernández, and F. Sánchez-Madrid. 2005. 'Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection', *Mol Biol Cell*, 16: 5445-54.
- Valera, M. S., L. de Armas-Rillo, J. Barroso-Gonzalez, S. Ziglio, J. Batisse, N. Dubois, S. Marrero-Hernandez, S. Borel, L. Garcia-Exposito, M. Biard-Piechaczyk, J. C. Paillart, and A. Valenzuela-Fernandez. 2015. 'The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation', *Retrovirology*, 12: 53.

157

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Vallari, A., V. Holzmayer, B. Harris, J. Yamaguchi, C. Ngansop, F. Makamche, D. Mbanya, L. Kaptue, N. Ndembi, L. Gurtler, S. Devare, and C. A. Brennan. 2011. 'Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon', *J Virol*, 85: 1403-7.
- Van Damme, N., D. Goff, C. Katsura, R. L. Jorgenson, R. Mitchell, M. C. Johnson, E. B. Stephens, and J. Guatelli. 2008. 'The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein', *Cell Host Microbe*, 3: 245-52.
- Van de Perre, P., D. Rouvroy, P. Lepage, J. Bogaerts, P. Kestelyn, J. Kayihigi, A. C. Hekker, J. P. Butzler, and N. Clumeck. 1984. 'Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda', *Lancet*, 2: 62-5.
- Van Heuverswyn, F., Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B. F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E. M. Ngolle, P. M. Sharp, G. M. Shaw, E. Delaporte, B. H. Hahn, and M. Peeters. 2006. 'Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas', *Nature*, 444: 164.
- Van Heuverswyn, F., and M. Peeters. 2007. 'The origins of HIV and implications for the global epidemic', *Curr Infect Dis Rep*, 9: 338-46.
- van Manen, D., N. A. Kootstra, B. Boeser-Nunnink, M. A. Handulle, A. B. van't Wout, and H. Schuitemaker. 2009. 'Association of HLA-C and HCP5 gene regions with the clinical course of HIV-1 infection', *AIDS*, 23: 19-28.
- Vanhamel, J., A. Bruggemans, and Z. Debyser. 2019. 'Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know?', *J Virus Erad*, 5: 3-9.
- Vazquez-Santiago, F. J., and V. Rivera-Amill. 2015. 'Envelope gene evolution and HIV-1 neuropathogenesis', *J Neuroinfect Dis*, 6.
- Veazey, R. S., M. DeMaria, L. V. Chalifoux, D. E. Shvets, D. R. Pauley, H. L. Knight, M. Rosenzweig, R. P. Johnson, R. C. Desrosiers, and A. A. Lackner. 1998. 'Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection', *Science*, 280: 427-31.
- Verdel, A., and S. Khochbin. 1999. 'Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers', *J Biol Chem*, 274: 2440-5.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter. 2001. 'Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 7724-9.
- Visseaux, B., F. Damond, S. Matheron, D. Descamps, and C. Charpentier. 2016. 'Hiv-2 molecular epidemiology', *Infect Genet Evol*, 46: 233-40.
- Volz, E. M., E. Ionides, E. O. Romero-Severson, M. G. Brandt, E. Mokotoff, and J. S. Koopman. 2013. 'HIV-1 transmission during early infection in men who have sex with men: a phylodynamic analysis', *PLoS Med*, 10: e1001568; discussion e68.
- von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono. 1993. 'Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells', *J Virol*, 67: 4945-55.
- Vorster, P. J., J. Guo, A. Yoder, W. Wang, Y. Zheng, X. Xu, D. Yu, M. Spear, and Y. Wu. 2011. 'LIM kinase 1 modulates cortical actin and CXCR4 cycling and is activated by HIV-1 to initiate viral infection', *J Biol Chem*, 286: 12554-64.
- Wang, A. H., and X. J. Yang. 2001. 'Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals', *Mol Cell Biol*, 21: 5992-6005.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Wang, C., P. W. Horby, F. G. Hayden, and G. F. Gao. 2020. 'A novel coronavirus outbreak of global health concern', *Lancet*, 395: 470-73.
- Wang, L., S. Mukherjee, F. Jia, O. Narayan, and L. J. Zhao. 1995. 'Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat', *J Biol Chem*, 270: 25564-9.
- Wang, Z. A., and P. A. Cole. 2020. 'The Chemical Biology of Reversible Lysine Post-translational Modifications', *Cell Chem Biol*, 27: 953-69.
- Ward, A. B., and I. A. Wilson. 2015. 'Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure', *Trends Biochem Sci*, 40: 101-7.
- Wargo, A. R., and G. Kurath. 2012. 'Viral fitness: definitions, measurement, and current insights', *Curr Opin Virol*, 2: 538-45.
- Wawer, M. J., R. H. Gray, N. K. Sewankambo, D. Serwadda, X. Li, O. Laeyendecker, N. Kiwanuka, G. Kigozi, M. Kiddugavu, T. Lutalo, F. Nalugoda, F. Wabwire-Mangen, M. P. Meehan, and T. C. Quinn. 2005. 'Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda', *J Infect Dis*, 191: 1403-9.
- Waymack, J. R., and V. Sundareshan. 2020. 'Acquired Immune Deficiency Syndrome.' in, *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)).
- Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones. 1998. 'A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA', *Cell*, 92: 451-62.
- Wertheim, J. O., and M. Worobey. 2009. 'Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2', *PLoS Comput Biol*, 5: e1000377.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. 'Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4', *J Virol*, 66: 7193-200.
- Worobey, M., M. Gemmel, D. E. Teuwen, T. Haselkorn, K. Kunstman, M. Bunce, J. J. Muyembe, J. M. Kabongo, R. M. Kalengayi, E. Van Marck, M. T. Gilbert, and S. M. Wolinsky. 2008. 'Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960', *Nature*, 455: 661-4.
- Wu, H., P. D. Kwong, and W. A. Hendrickson. 1997. 'Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4', *Nature*, 387: 527-30.
- Wu, Y., and A. Yoder. 2009. 'Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis', *PLoS Pathog*, 5: e1000520.
- Xiong, Y., P. Kern, H. Chang, and E. Reinherz. 2001. 'T Cell Receptor Binding to a pMHCII Ligand Is Kinetically Distinct from and Independent of CD4', *J Biol Chem*, 276: 5659-67.
- Yang, X. J., and E. Seto. 2008. 'The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 206-18.
- Yoder, A., D. Yu, L. Dong, S. R. Iyer, X. Xu, J. Kelly, J. Liu, W. Wang, P. J. Vorster, L. Agulto, D. A. Stephany, J. N. Cooper, J. W. Marsh, and Y. Wu. 2008. 'HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells', *Cell*, 134: 782-92.
- Yu, M., E. Wang, Y. Liu, D. Cao, N. Jin, C. W. Zhang, M. Bartlam, Z. Rao, P. Tien, and G. F. Gao. 2002. 'Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus', *J Gen Virol*, 83: 623-29.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Bibliografía

- Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu. 2003. 'Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex', *Science*, 302: 1056-60.
- Yue, L., K. J. Pfafferoth, J. Baalwa, K. Conrod, C. C. Dong, C. Chui, R. Rong, D. T. Claiborne, J. L. Prince, J. Tang, R. M. Ribeiro, E. Cormier, B. H. Hahn, A. S. Perelson, G. M. Shaw, E. Karita, J. Gilmour, P. Goepfert, C. A. Derdeyn, S. A. Allen, P. Borrow, and E. Hunter. 2015. 'Transmitted virus fitness and host T cell responses collectively define divergent infection outcomes in two HIV-1 recipients', *PLoS Pathog*, 11: e1004565.
- Zaunders, J., W. B. Dyer, and M. Churchill. 2011. 'The Sydney Blood Bank Cohort: implications for viral fitness as a cause of elite control', *Curr Opin HIV AIDS*, 6: 151-6.
- Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao. 2003. 'The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA', *Nature*, 424: 94-8.
- Zhang, X., Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X. J. Yang, S. R. Dent, T. P. Yao, W. S. Lane, and E. Seto. 2007. 'HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin', *Mol Cell*, 27: 197-213.
- Zhang, Y., and E. Barklis. 1995. 'Nucleocapsid protein effects on the specificity of retrovirus RNA encapsidation', *J Virol*, 69: 5716-22.
- Zhang, Y., N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin, and P. Matthias. 2003. 'HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo', *Embo j*, 22: 1168-79.
- Zheng, R., T. M. Jenkins, and R. Craigie. 1996. 'Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 13659-64.
- Zhou, W., and M. D. Resh. 1996. 'Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein', *J Virol*, 70: 8540-8.
- Zhu, N., D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, and W. Tan. 2020. 'A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019', *N Engl J Med*, 382: 727-33.
- Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor, and K. H. Roux. 2003. 'Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15812-7.
- Zotova, A. A., A. A. Ateamasova, A. V. Filatov, and D. V. Mazurov. 2019. '[HIV Restriction Factors and Their Ambiguous Role during Infection]', *Mol Biol (Mosk)*, 53: 240-55.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

ANEXO DE PUBLICACIONES



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, el trabajo resultante del Objetivo 1, aquí descrito, dio lugar a la publicación, como coautor, de un artículo de investigación en la revista *mBio*[®], incluido a partir de la siguiente página de este apartado anexo y, cuya referencia bibliográfica es:

- Casado C, Marrero-Hernández S, **Márquez-Arce D**, Pernas M, Marfil S, Borràs-Grañana F, Olivares I, Cabrera-Rodríguez R, Valera MS, de Armas-Rillo L, Lemey P, Blanco J, Valenzuela-Fernández A, Lopez-Galíndez C. *Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers*. *mBio*. 2018 Apr 10;9(2):e02338-17. doi: 10.1128/mBio.02338-17

Además, durante el periodo formativo de esta Tesis Doctoral, también se publicaron, como coautor, otros dos artículos estrechamente relacionados con la temática de esta Tesis, aunque no derivados directamente de los resultados del trabajo experimental aquí presentado, cuyas referencias bibliográficas se exponen a continuación:

- Cabrera-Rodríguez R, Hebmann V, Marfil S, Pernas M, Marrero-Hernández S, Cabrera C, Urrea V, Casado C, Olivares I, **Márquez-Arce D**, Pérez-Yanes S, Estévez-Herrera J, Clotet B, Espert L, López-Galíndez C, Biard-Piechaczyk M, Valenzuela-Fernández A, Blanco J. *HIV-1 envelope glycoproteins isolated from Viremic Non-Progressor individuals are fully functional and cytopathic*. *Sci Rep*. 2019 Apr 3;9(1):5544. doi: 10.1038/s41598-019-42075-3
- Marrero-Hernández S, **Márquez-Arce D**, Cabrera-Rodríguez R, Estévez-Herrera J, Pérez-Yanes S, Barroso-González J, Madrid R, Machado JD, Blanco J, Valenzuela-Fernández A. *HIV-1 Nef Targets HDAC6 to Assure Viral Production and Virus Infection*. *Front Microbiol*. 2019 Oct 30;10:2437. doi: 10.3389/fmicb.2019.02437

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46



RESEARCH ARTICLE



Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers

Concepción Casado,^a Sara Marrero-Hernández,^b Daniel Márquez-Arce,^b María Pernas,^a Sílvia Marfil,^c Ferran Borràs-Grañana,^d Isabel Olivares,^a Romina Cabrera-Rodríguez,^b María-Soledad Valera,^b Laura de Armas-Rillo,^b Philippe Lemey,^e Julia Blanco,^{c,d} Agustín Valenzuela-Fernández,^b Cecilio Lopez-Galindez^a

^aUnidad de Virología Molecular, Laboratorio de Referencia e Investigación en Retrovirus, Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^bLaboratorio de Inmunología Celular y Viral, Unidad de Virología I UETSPC, Unidad de Farmacología, Sección de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de La Laguna (ULL), Tenerife, Spain

^cInstitut de Recerca de la Sida IrsiCaixa, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain

^dUniversitat de Vic, Universitat Central de Catalunya, UVIC, Vic, Spain

^eDepartment of Microbiology and Immunology, Rega Institute, KU Leuven, University of Leuven, Leuven, Belgium

ABSTRACT A small group of HIV-1-infected individuals, called long-term nonprogressors (LTNPs), and in particular a subgroup of LTNPs, elite controllers (LTNP-ECs), display permanent control of viral replication and lack of clinical progression. This control is the result of a complex interaction of host, immune, and viral factors. We identified, by phylogenetic analysis, a cluster of LTNP-ECs infected with very similar low-replication HIV-1 viruses, suggesting the contribution of common viral features to the clinical LTNP-EC phenotype. HIV-1 envelope (Env) glycoprotein mediates signaling and promotes HIV-1 fusion, entry, and infection, being a key factor of viral fitness *in vitro*, cytopathicity, and infection progression *in vivo*. Therefore, we isolated full-length *env* genes from viruses of these patients and from chronically infected control individuals. Functional characterization of the initial events of the viral infection showed that Envs from the LTNP-ECs were ineffective in the binding to CD4 and in the key triggering of actin/tubulin-cytoskeleton modifications compared to Envs from chronic patients. The viral properties of the cluster viruses result in a defective viral fusion, entry, and infection, and these properties were inherited by every virus of the cluster. Therefore, inefficient HIV-1 Env functions and signaling defects may contribute to the low viral replication capacity and transmissibility of the cluster viruses, suggesting a direct role in the LTNP-EC phenotype of these individuals. These results highlight the important role of viral characteristics in the LTNP-EC clinical phenotype. These Env viral properties were common to all the cluster viruses and thus support the heritability of the viral characteristics.

IMPORTANCE HIV-1 long-term nonprogressor elite controller patients, due to their permanent control of viral replication, have been the object of numerous studies to identify the factors responsible for this clinical phenotype. In this work, we analyzed the viral characteristics of the envelopes of viruses from a phylogenetic cluster of LTNP-EC patients. These envelopes showed ineffective binding to CD4 and the subsequent signaling activity to modify actin/tubulin cytoskeletons, which result in low fusion and deficient entry and infection capacities. These Env viral characteristics could explain the nonprogressor clinical phenotype of these patients. In addition, these inefficient *env* viral properties were present in all viruses of the cluster, supporting the heritability of the viral phenotype.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

Received 15 December 2017 Accepted 9 March 2018 Published 10 April 2018

Citation Casado C, Marrero-Hernández S, Márquez-Arce D, Pernas M, Marfil S, Borràs-Grañana F, Olivares I, Cabrera-Rodríguez R, Valera M-S, de Armas-Rillo L, Lemey P, Blanco J, Valenzuela-Fernández A, Lopez-Galindez C. 2018. Viral characteristics associated with the clinical nonprogressor phenotype are inherited by viruses from a cluster of HIV-1 elite controllers. *mBio* 9:e02338-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02338-17>.

Editor Dimitrios Paraskevis, Medical School, University of Athens

Copyright © 2018 Casado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Agustín Valenzuela-Fernández, avalenzu@ull.edu.es, or Cecilio Lopez-Galindez, clopez@isciii.es.
C.C., S.M.-H., D.M.-A., J.B., A.V.-F., and C.L.-G. contributed equally to this article.
J.B., A.V.-F., and C.L.-G. are co-senior authors.

mbio.asm.org 1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguilar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.

mbio

KEYWORDS CD4 binding, HIV-1, heritability, LTNP-EC, actin-tubulin modifications, cell signalling, phylogenetic analysis, viral envelope

Natural HIV-1 infection shows a wide range of disease outcomes that result in the classification of patients according to progression time. A small group of HIV-1-infected individuals, called long-term nonprogressors (LTNPs), and especially a subgroup of LTNP elite controllers (LTNP-ECs), display permanent control of viral replication and lack of clinical progression. This control is the result of a complex interaction of host, immune, and viral factors.

In HIV-1 patient classifications, LTNPs are individuals infected with HIV-1 for more than 10 years, maintaining high CD4⁺ lymphocyte numbers without clinical symptoms, and remaining therapy naive (1). Within the LTNP group and according to HIV-1 plasma viral load, we can distinguish LTNP noncontrollers (LTNP-NCs) with viral loads above 2,000 copies/ml, LTNP viremic controllers (LTNP-VCS) with viral loads between 50 and 2,000 copies/ml, and LTNP-ECs with undetectable viral loads (<50 copies/ml) (2). The latter definition has been used for the selection of the individuals of this study. Patients with very similar characteristics are also called elite suppressors (3) or HIV-1 controllers (HICs) (4). Progressor patients are individuals with a symptomatic infection or with the initiation of antiretroviral therapy (ART) within 10 years after seroconversion and a minimum of 3 determinations above 2,000 copies/ml (2). Different nomenclatures have been used to name HIV-1 patients by distinct groups, and these definitions are reviewed in reference 5.

The LTNP phenotype has been associated with host genetic background, principally HLA-B genotypes—mostly HLA-B57/B58 or -B27 (6) and HLA-C (2). Immunologic studies demonstrated potent and broad cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses in LTNPs (7). In addition, viral factors were also identified in groups of LTNPs, like viruses with important deletions in the *nef* gene in a cohort of Australian nonprogressors (8) or with mutations in different genes (9). In general, viruses with low replication capacity are detected in LTNPs (10–13).

Plasma viral load in infected individuals was found to be a good predictor of progression to AIDS (14), and the set point viral load (SPVL), or the stable quantity of the virus in the patient's blood after primary infection, has been directly correlated with infectiousness and virulence (15). SPVL in HIV-1 patients ranges over several orders of magnitude and is a key determinant of disease progression. A number of recent studies reported the high heritability of the SPVL, implying that viral genetic factors contribute substantially to the overall variation in viral load. From a virological point of view, "heritability" is the fraction of variability in disease outcome explained by pathogen genetics, because these factors are "inherited" by the new host upon infection (16). In transmission pair studies, viral properties and fitness were inherited in the recipients, as shown by the similarity of viral loads in linked individuals (17–20). Viral heritability has also been inferred by phylogenetic approaches (17), but discordant values were obtained in different studies from distinct locations ranging from 6 to 59% (16), raising the question of how effectively HIV-1 phylogenies can be used to measure heritability (21). A modeling approach by Bonhoeffer et al. demonstrated that high heritability is the most parsimonious explanation for the observed variance of SPVL (22). In a standardized study with 2,028 samples from different European countries, viral genetic variation accounts for a third of variability in HIV-1 SPVL in Europe (16). Most of the research on heritability in HIV-1 has either focused on transmission pairs or on phylogenetic signal in large cohorts of patients. Although it could bridge the gap between these two extremes, heritability in HIV-1 transmission clusters has to our knowledge not been demonstrated so far.

It has been reported that HIV-1 envelope glycoprotein (Env) functions, such as tropism or fusogenicity are linked to *in vitro* HIV-1 cytopathicity (23, 24) and viral fitness (25, 26), as well as to clinical progression of HIV-1 infection (27) and simian immunodeficiency virus (SIV) infection *in vivo* (28). Moreover, we and other groups have

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguilar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers

mbio

previously reported that HIV-1 Env-gp120-induced posttransduction modifications and reorganization of tubulin and actin cortical cytoskeleton are key signals and processes to promote efficient early HIV-1 infection (29–34). These Env/CD4-mediated events increase the probability of HIV-1 Env-CD4/coreceptor interactions, potentiating fusion pore formation, and thus HIV-1 entry and infection. Therefore, it is plausible to propose that HIV-1 Env-mediated early functions could be responsible for an inefficient HIV-1 infection and viral progression *in vivo*, being determinant for the LTNP-EC clinical phenotype in some HIV-1⁺ individuals.

In a previous study, we identified within a large group of Spanish HIV-1 LTNP patients a cluster of 5 patients with an LTNP-EC clinical phenotype (see Fig. 1A). These individuals were infected for more than 25 years with very similar viruses, all showing low replication characteristics and 11 unusual amino acid changes in the envelope protein of the viruses and linked by clinical characteristics, risk practices, and epidemiological characteristics, identifying a transmission cluster (35).

For these reasons, in this work, we performed a comprehensive functional characterization of Envs from these LTNP-EC viruses, focusing on the initial events of viral infection: binding of Env to CD4⁺ cells, Env-triggered early signals for actin and α -tubulin cytoskeleton modulation, and the subsequent membrane fusion and early infection in target cells. We observed that the genotypic and phenotypic characteristics of the Env proteins from the HIV-1 viruses of the LTNP-EC cluster were inherited by all the patients' viruses and produced, in individuals with different host genotypes, the same clinical LTNP-EC phenotype.

RESULTS

Low replication and transmission of the viruses from the LTNP cluster. In a previous study, we described a cluster of 6 HIV-1⁺ individuals, 5 of them with known LTNP characteristics, using a Bayesian phylogenetic reconstruction from complete *env* gene sequences; this cluster was supported by a posterior probability of 0.87, and it increased to 0.98 when patient LTNP_RF_15 was not included (35) (Fig. 1A). The mean genetic distance among the cluster viruses was 0.72%, and the mean genetic distance to the cluster's most recent common ancestor (MRCA) was 0.96%.

The *env* gene nucleotide sequences from these patients (35) displayed very short branches in the phylogenetic tree, indicating limited viral replication, in comparison with other LTNP patients from Spain or old viruses from Europe and North America (Fig. 1A). When we calculated the mean divergence of all the *env* gene sequences studied from the subtype B most recent common ancestor (MRCA) of the tree, samples from the cluster individuals, although obtained in 2004 and 2005, showed a divergence of 4.86% substitutions per nucleotide (S/N) (Fig. 1B). In contrast, old chronic progressor HIV-1 individuals, sampled before 1995, displayed a divergence of 13.73% S/N, and Spanish samples, obtained between 1998 and 2005, showed a divergence of 15.16% S/N (Fig. 1B). Genetic distance from each nucleotide sequence was calculated as the MRCA-to-tip distances from a MrBayes phylogenetic tree using TreeStat v.1.2 (35). Because of the low fidelity of the reverse transcriptase, HIV-1 replication is inevitably linked to the generation of variability (36). In phylogenetic reconstructions, the accumulation of variability results in a progressive increase of the genetic divergence from MRCA, visualized by the branch length (37–39). The very short branch length and the limited divergence of the sequences from the cluster viruses (Fig. 1B) led us to conclude that these viruses went through a comparatively very limited number of replication cycles. This result is even more relevant considering that samples were taken at least 15 years after primary infection (Table 1) and pointed to a potential functional defect in the viruses from the LTNP HIV-1 individuals that could impair replication capacity and transmissibility.

Functional analysis of Env from HIV-1 viruses from the LTNP-EC cluster. To investigate the causes of the limited viral replication and the restricted *env* sequence evolution in the cluster HIV-1 viruses, we studied the phenotypic characteristics of viral Env from the patients. The nucleotide sequences of three of the cluster patients

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 3

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.

mbio

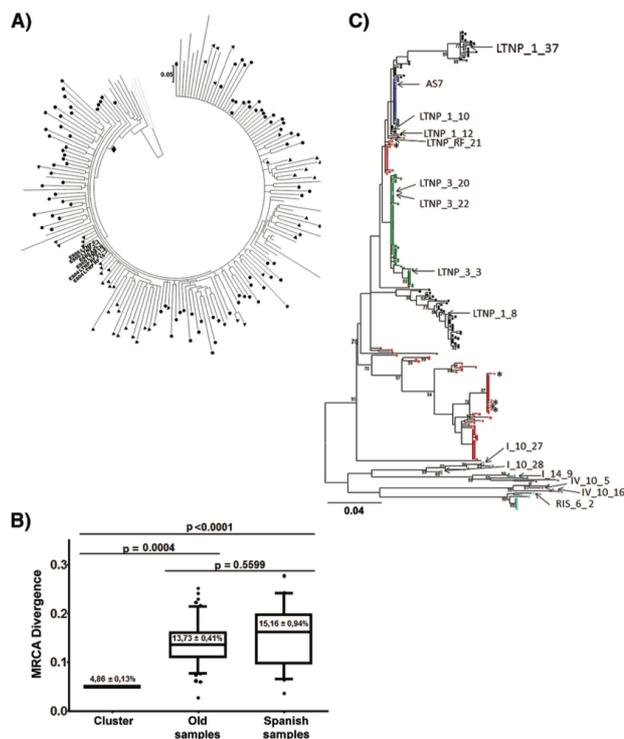


FIG 1 Phylogenetic and genetic distance analyses of the sequences from the cluster viruses to the MRCA. (A) Phylogenetic tree with complete *env* sequences from the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis (MrBayes). The 50% majority rule consensus tree obtained by Bayesian MCMC analysis is shown, and the most recent common ancestor (MRCA), including the vast of majority sequences analyzed, is marked (solid diamond). Branch lengths represent the mean value observed for that branch among the postburning sampled trees. The symbols identify nucleotide sequences analyzed; solid circles correspond to old sequences collected before 1995, and solid triangles correspond to Spanish sequences collected from 1989 to 2005. Only the Spanish cluster sequences collected between 2004 and 2005 are identified by name. Gray lines are subtype D sequences used as an outgroup. (B) Genetic distance of the sequences to the MRCA. MRCA genetic distances of the cluster LTNP-EC viruses studied were compared with the MRCA genetic distances of viruses obtained from HIV-1-infected individuals before 1995 (old samples) or from Spanish HIV-1-infected individuals taken from 1989 to 2005 (35). Genetic distance was calculated as the MRCA-to-tip distances from the MrBayes phylogenetic tree using TreeStat v.1.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/treestat/>). Boxes represent the 25 to 75% of the mean, and the whiskers indicate 5 and 95%. The panel shows *P* values for nonparametric Dunn's test for multiple comparisons. (C) Maximum likelihood phylogenetic trees of patients' viral sequences in the *env* gene. Shown are partial HIV-1 PBMC-derived gp120 *env* sequences of cluster patients LTNP_1 (black circles), LTNP_3 (green circles), LTNP_5 (red circles), LTNP_BF_15 (brown circles), LTNP_BE_21 (pink circles), and AS7 (blue circles) and progressor patients L10 (gray triangles), L14 (teal triangles), IV_10 (purple triangles), and RIS_06 (turquoise triangles). The clones analyzed are indicated by open symbols and arrows. Asterisks indicate nonfunctional clones. Numbers at branch nodes refer to the bootstrap support. (Only values greater than 70% are shown.) Branch lengths are drawn to scale.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 4

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers



TABLE 1 Epidemiological, clinical, and host characteristics of the patients

Patient	Sex	Origin	Hospital	Transmission ^a	Yr first HIV-1*	Sample date	Group	Viral load (copies/ml)	CD4 ⁺ count (T cells/ μ l)	HLA-B genotype
LTNP_1	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1990	2005	LTNP-VCS	125	628	B1501/B2705
LTNP_3	M	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1988	2005	LTNP-ECs	<50	880	B2705/B3801
LTNP_5	M	Madrid	C. S. Sandoval	IDU	1986	2005	LTNP-ECs	<50	559	B2705/B3503
LTNP_RF_15	M	Madrid	12 de Octubre	IDU	1989	2004	LTNP-ECs	<50	460	B44/B57
LTNP_RF_21	M	Madrid	12 de Octubre	IDU	1985	2004	LTNP-ECs	<50	690	B47/B14
AS7	F	NK ^b	El Patriarca	IDU	1989	1989	NK	NK	NK	B3501/B5101
I_10	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU/HT	NK	1993	Progressors	8.9×10^4	251	
IV_10	M	Vigo		IDU	1991	1994	Progressors	1.7×10^6	342	
L_14	F	Madrid	C. S. Sandoval	IDU/HT	1987	1994	Progressors	1.3×10^6	337	
RIS_06	M	Madrid	C. S. Sandoval	MSM	2005	2005	Progressors	7.6×10^4	436	

^aTransmission route: IDU, intravenous drug user; MSM, men who have sex with men; HT, heterosexual.

^bNK, not known.

(LTNP_1, LTNP_3, and LTNP_5) have been extensively investigated in the laboratory during a follow-up of at least 7 years (13, 40). In these studies, we detected a limited evolution of the sequences, but different viral subpopulations were identified in the tree, particularly in patients LTNP_1 and LTNP_5 (Fig. 1C). For the functional analysis of the viral Envs, we selected 4 clones in patient LTNP_1 (Fig. 1C) and 3 clones in patient LTNP_3 (Fig. 1C) corresponding to the different lineages found in these patients. Patient LTNP_5 also showed a tree with distinct lineages but all the recovered clones were nonfunctional (Fig. 1C, asterisks). For patient AS7, the sole patient without clinical data and follow-up, we only obtained a sample in 1989 and given the low diversity found in the quasispecies of this sample, a single clone was selected (Fig. 1C). For patients LTNP_RF_15 and LTNP_RF_21, we only had one clone from each patient.

The clones from the progressor patients were obtained from Spanish HIV-1 patients without follow-up, and we have no information on the heterogeneity of the quasispecies, although the trees showed long tip branches. The clones analyzed from each patient are marked in Fig. 1C with arrows, and when possible, we included at least two clones from each control patient.

To determine whether the Envs, isolated from HIV-1 viral particles of different individuals, are responsible for the poor ability of these viruses to replicate, we first expressed Envs isolated from primary LTNP-EC and chronic progressor viruses in 293T cells, in order to analyze their cell surface expression. Transfected cells stained with monoclonal antibody (MAb) 2G12 showed a median value of the Env expression from the LTNP-EC viruses not statistically different from the chronic progressor viruses and comparable to reference Envs (Fig. 2A). Therefore, the inefficacy of HIV-1 viruses from LTNP-EC individuals to replicate cannot be attributed to a difference in the Env expression level at the cell surface of cells producing virions. To further investigate this, HIV-1 luciferase-reporter pseudoviruses were produced using a pNL4.3-Luc-R-E vector, and each of the different env expression clones: 8 from 3 of the cluster viruses, 6 from 4 chronic progressors, and 2 from reference strains SF_162 (R5-tropic strain) and 89ES_061 (X4-tropic strain). All the env nucleotide sequences from the LTNP-EC cluster HIV-1 viruses showed an R5 tropism (Web P5SM; <https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webp5sm>). This technical approach, using the same viral backbone with different env genes, allowed the generation of viral particles to infect the same permissive cells for the analysis of the functional involvement of each viral Env in infection. Equal amounts of luciferase reporter pseudoviruses were used to infect CEM.NKR-CCR5 cells, providing a quantification of HIV-1 entry in the absence of other viral factors and of any influence of late steps of viral infection (29, 30, 41). We observed that, in comparison with control and chronic progressor-derived viruses, LTNP-EC cluster-derived pseudoviruses poorly infected cells ($P = 0.0002$) (Fig. 2B). Thus, the Envs from these LTNP-EC HIV-1 viruses were unable to promote efficiently the early steps of viral infection.

Having ruled out a defect in Env expression, we further evaluated the biological functions of these cell-surface-expressed Envs in promoting cell-to-cell HIV-1 viral

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 5

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

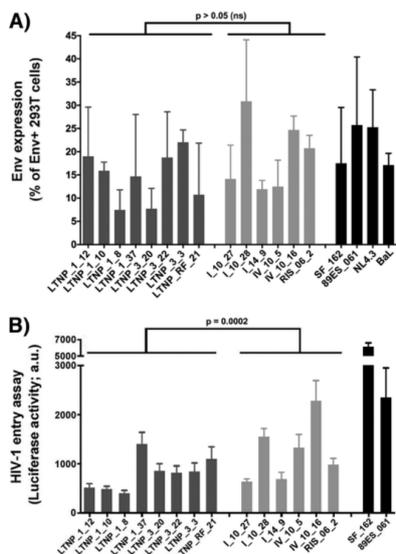
Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.

mbio



Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers

mbio

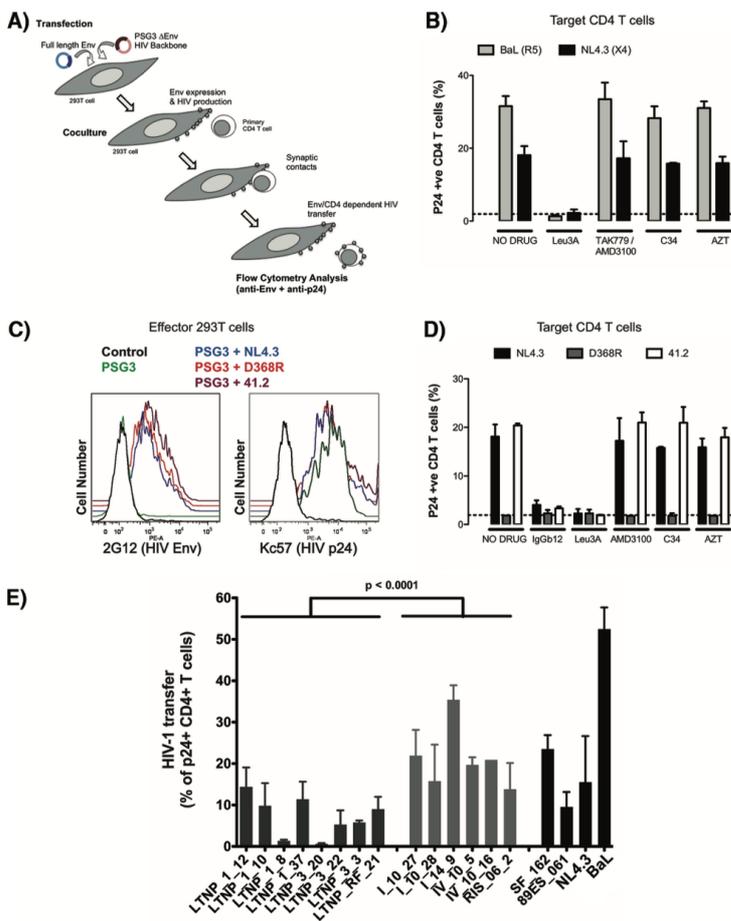


FIG 3 Analysis of HIV-1 Env-mediated cell-to-cell viral transfer. (A) An outline of the experimental model used for the analysis of Env-mediated cell-to-cell fusion and viral transfer is shown. Briefly, 293T cells were cotransfected with env and a Δenv HIV-1 expression plasmid. After 24 h, effector cells producing HIV-1 particles were cocultured with primary CD4+ T cells to force synapsis formation and massive binding of budding particles to target cells. Env expression and

(Continued on next page)
 March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17
 mbio.asm.org 7

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.



anti-CD4 antibody Leu3A) and no effect by coreceptor fusion or postfusion blockade (CCR5 or CXCR4 antagonists TAK779 or AMD3100, gp41 inhibitor C34, or reverse transcription inhibitor zidovudine [AZT]) (Fig. 3B). Further, we used different available NL4.3 mutant derivatives that abrogate either CD4 binding capacity (the D368R mutation in gp120 [44]) or fusion capacity (the 41.2 mutation in gp41 [24]). These mutations do not alter Env expression in transfected cells (Fig. 3C). Consistent with pharmacological data, the D368R mutant completely blocked viral binding to CD4⁺ T cells, while the 41.2 mutant had no significant effect (Fig. 3D).

These data demonstrated that the assay can assess the Env-CD4 interaction, and it was therefore employed to quantify the ability of mediating CD4 binding for reference as well as Envs isolated from the LTNP-ECs and chronic progressors (Fig. 3B and E). The Envs from the HIV-1⁺ LTNP-ECs displayed a significantly lower ability ($P < 0.0001$) to transfer viral particles to primary CD4⁺ T cells than Envs from chronic progressor HIV-1⁺ individuals (Fig. 3E), suggesting that the Envs from LTNP-EC viruses had impaired binding to the cell-surface-expressed CD4 molecule.

In addition, the fusion capacity of the same env clones was analyzed in cocultures between 293T transfected cells and TZM-bl cells. Consistent with pseudovirus infectivity (Fig. 2B), this assay yielded significantly lower fusion values for Envs from LTNP-EC HIV-1 viruses compared to those from chronic progressors' HIV-1 viruses ($P < 0.0001$) (Fig. 4A). Thus, the phenotypic characterization of the Envs from the LTNP-EC cluster confirmed that the low replication capacity detected for the HIV-1 viruses in the cluster was associated with impaired Env function, thereby showing a significant lower fusogenic capacity than viruses in chronic progressors (Fig. 4A). In addition, a significant correlation was observed between the HIV-1 transfer data, mediated by Env/CD4 binding capacity and fusogenicity ($r = 0.635$, $P = 0.0171$, Spearman's test) (Fig. 4B), thus linking the fusion defect to a low CD4 affinity. Furthermore, a fusogenicity index (FI) was calculated for each Env clone. The FI normalizes fusion values to Env expression and showed lower values in Env clones isolated from the LTNP cluster compared to progressors (Fig. 4C). Taken together, these data further confirm the deficient Env fusion capacity observed in the cluster LTNP envelopes.

Signaling activity of Envs from the cluster HIV-1 viruses. We next compared the signaling ability of Envs from LTNP-EC and chronic progressor HIV-1 viruses in permissive CEM.NKR-CCR5 cells, during the early virus-cell contacts in infection, by measuring the stabilization of acetylated α -tubulin. Consistent with the significantly impaired HIV-1 entry and infection promoted by LTNP-ECs' Envs and their low CD4 binding (Fig. 2B and 3E, respectively), the Envs from LTNP-ECs promoted acetylation of α -tubulin to a smaller extent than the Env from the BaL.01 viral strain (Fig. 5A). On the contrary, viruses bearing chronic progressors' Envs triggered acetylation of α -tubulin as efficiently as the BaL.01 Env and with a statistically higher activity than Envs from LTNP-EC HIV-1 viruses (Fig. 5A). Moreover, it has been described that efficient HIV-1 infection is achieved only when Env-triggered signals are strong enough to induce pseudopod formation by promoting actin cytoskeleton reorganization and capping in at least 20 to 30% of the cells (29, 30, 33). In an experimental model analyzed by

FIG 3 Legend (Continued)

HIV-1 binding were analyzed by flow cytometry using anti-Env and anti-p24 antibodies, respectively. (B) HIV-1 transfer to primary CD4⁺ T cells induced by the CCR5-using Env from BaL.01 or the CXCR4-using Env from NL4.3. Cocultures were performed in the presence of the following inhibitors: 1 μ g/ml of the anti-CD4 antibody Leu3A or 10 μ g/ml of the CCR5 antagonist TAK779 or the CXCR4 antagonist AMD3100, the fusion inhibitor peptide C34, and the reverse transcriptase inhibitor AZT. The dotted line corresponds to background levels of signal obtained in cocultures of CD4⁺ T cells and 293T cells transfected with the Δ env plasmid PSG3. Data are means \pm standard deviations (SD) from two different experiments. (C) Expression of HIV-1 Env in cells untransfected (control [black line]), transfected with the Δ env plasmid (PSG3 [green line]), or cotransfected with this plasmid and the indicated env from NL4.3 (blue line), the D368R mutant (red line), or the 41.2 mutant (purple line). (D) HIV-1 transfer (bound virus) to CD4⁺ T cells assessed by flow cytometry after coculture with 293T cells expressing Env from NL4.3 (black bars), the D368R mutant (gray bars), or the 41.2 mutant (open bars) and CD4⁺ T cells. Cocultures were performed in the presence of inhibitors as in panel B; the anti-gp120 antibody that blocks the CD4 binding site IgGb12 was used at 10 μ g/ml. The dotted line corresponds to background levels of signal obtained in cocultures of CD4⁺ T cells and 293T cells transfected with the Δ env plasmid PSG3. Data are means \pm SD from three different experiments. (E) Analysis of the ability to induce cell-to-cell virus transfer of HIV-1 Env proteins obtained from cluster LTNP-ECs (dark gray bars) or progressors (light gray bars) or reference strains (SF162, NL4.3, BaL.01, and 89ES_061 [black bars]). Data are from three independent experiments, comparing mean values between groups. (P values compare medians between groups using a nonparametric Mann-Whitney test.)

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers

mbio

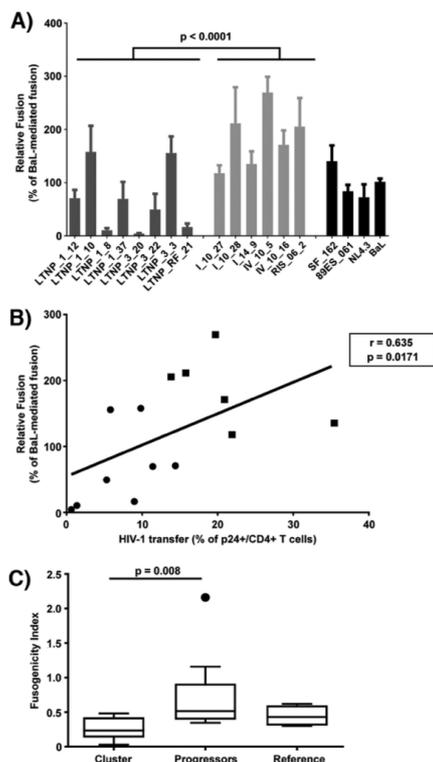


FIG 4 Analysis of HIV-1 Env fusogenic activity. (A) Analysis of the ability to induce cell-to-cell fusion of HIV-1 Env proteins obtained from cluster LTNP-EC (dark gray bars), progressor individuals (light gray bars), or reference HIV-1 viral strains (SF162, NL4.3, BaL01, and B9E5_061 [black bars]). Data are from three independent experiments, comparing mean values between groups (nonparametric Mann-Whitney test). (B) Spearman's nonparametric correlation between HIV-1 transfer activity after cell-to-cell contact (a surrogate marker of binding of the Env protein to the CD4 molecule) and the fusion capacity of the Envs obtained from the LTNP-EC cluster viruses are shown. Mean values of the three independent experiments for each Env clone were used for the correlation analysis. (C) A fusogenicity index (FI) was calculated for each Env clone as the ratio of fusion activity and relative fluorescence intensity. Values for LTNPs, progressors, and reference Env clones are shown: $n = 8, 6,$ and $4,$ respectively. Boxes represent medians and interquartile ranges of values.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 9

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Casado et al.

mbio

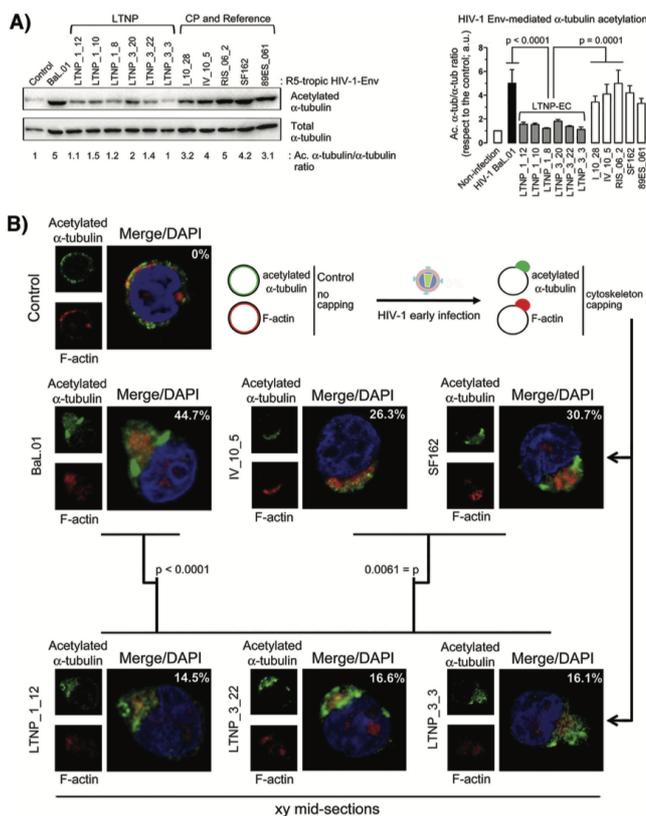


FIG 5 Effect of HIV-1 Env on α -tubulin acetylation and F-actin and acetylated α -tubulin reorganization, capping, and pseudopodium formation. (A, left panel) Quantitative Western blot analysis of LTNP-EC HIV-1 Env-induced α -tubulin acetylation in permissive cells compared with Envs from reference and chronic progressor (CP) patients' viral strains, represented as acetylated α -tubulin in reference to total α -tubulin (Ac. α -tub/ α -tub ratio). A representative experiment of six performed is shown. (Right panel) Histograms show the quantification of HIV-1 Env-mediated α -tubulin acetylation in permissive cells from six independent experiments carried out in triplicate. Data are means \pm standard errors of the means (SEM). Acetylated α -tubulin/ α -tubulin ratios are given in arbitrary light units (a.u.). (B) A series of fluorescent confocal images shows HIV-1 Env-induced redistribution of acetylated α -tubulin and actin cytoskeleton and pseudopodium formation in control, untreated, or HIV-1 Env early infected permissive cells. Merged images are shown with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) labeling of the nucleus. A representative experiment of six performed is shown indicating the percentage of cells affected per 150 cells counted under any experimental condition. P values from Student's t test are indicated. A scheme is presented showing the different cell morphologies and cytoskeleton profiles observed.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 10

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers

mbio

fluorescence confocal microscopy, we observed that reference BaL01 and SF162 Envs, as well as the chronic progressor Env from patient IV_10_5, induced acetylation of α -tubulin and F-actin capping and pseudopod formation in 44.7, 30.7, and 26.3% of cells, respectively (Fig. 5B). In contrast, representative Envs from LTNP-EC patient viruses showed an impaired ability to trigger F-actin reorganization, thereby inducing low pseudopod formation with capped reorganized actin and acetylated α -tubulin cytoskeletons in only 14 to 16% of the cells (Fig. 5B). This difference was statistically significant ($P = 0.0061$).

Analysis of the link between the low CD4 affinity and the poor fusion activity confirms that the Env from viruses of LTNP-EC patients hardly promoted the acetylation of α -tubulin compared to HIV-1 BaL01 Env or R5-tropic Envs from chronic progressor viruses (Fig. 5A). The low stabilization of acetylated α -tubulin and the inability to reorganize F-actin and form pseudopods are consistent with the low CD4 binding, resulting in limited viral fusion and early infection (29, 30, 33, 34, 41). Similarly, R5-tropic Envs from LTNP-EC individuals promoted weak cytoskeleton posttransduction modification and reorganization and subsequent poor pseudopod formation (Fig. 5B). Considering that HIV-1 should overcome the cortical actin barrier during the early infection steps, the accomplishment of this process will predict the susceptibility of CD4⁺ T cells to infection (32). Altogether, the poor signaling activity of these Envs is consistent with their low CD4 binding and the limited Env-mediated membrane fusion and early infection described for the Envs from the LTNP-ECs.

Analysis of the mutations responsible for the viral replicative capacity of a replicating virus from the cluster. To further characterize the impaired functionality of the Env from this LTNP cluster, we studied a functional Env isolated from a virus (AS7) of this cluster. Virus AS7 was derived from a cluster patient showing detectable p24 antigenemia at the sampling time (1989) and for which we do not have the clinical phenotype due to the lack of follow-up. The AS7 env shared 11 unusual mutations with the other env genes from the cluster (35), but it also displayed 3 extra mutations in the V1, C2, and V4 env regions. These mutations differentiated the AS7 env from the cluster env genes, as shown for the LTNP_1_12 clone (Fig. 6A). We generated in the AS7 env backbone three mutant viruses reverting the AS7 residue at positions 140 (V1, AS7_I140T), 279 (C2, AS7_V279A), and 400 (V4, AS7_I400T) to the residues present in the LTNP_1_12 clone (and in the other cluster viruses). The Envs with the reverting I140T and V279A mutations showed an infectious activity below the anti-CD4 threshold and a nearly defective infection (Fig. 6B), whereas the reversing I400T mutation showed a limited but detectable infection activity (Fig. 6B). These results support the inefficient signaling and functionality of the env genes of this cluster and their inefficient infectivity.

DISCUSSION

LTNP-ECs are a minor group of patients who, despite being infected for many years, show natural control of HIV-1 viral replication and lack of clinical progression. Investigation of the host and viral factors and the mechanisms involved in this control is important for understanding HIV-1 pathogenesis. In this work, we analyzed the contribution of the Env complex to control viral replication and we show that viruses recovered from a cluster of LTNP-ECs displayed HIV-1 Envs with low CD4 binding, low signaling, and therefore low fusion and infection activities.

In HIV-1-infected individuals, viral fitness is a major determinant of the clinical outcome (18). Among viral proteins that determine fitness *in vitro* but also *in vivo*, the Env glycoprotein plays a major role (25), particularly in the phenotypic characteristics associated with *in vivo* depletion of CD4⁺ T cells. The Env owes its key role in viral replication to the biological activity during viral entry into target cells, which in turn determines viral tropism and cytopathic effects. The function of HIV-1 Env is a complex, multistage, and highly regulated process with many cellular molecules mobilized by the Env viral binding to CD4, CXCR4, or CCR5 receptors. These interactions result in the formation of a fusion pore through which the viral capsid enters the cell (32). The

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 11

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: Ejn1Cgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Casado et al.

riBio

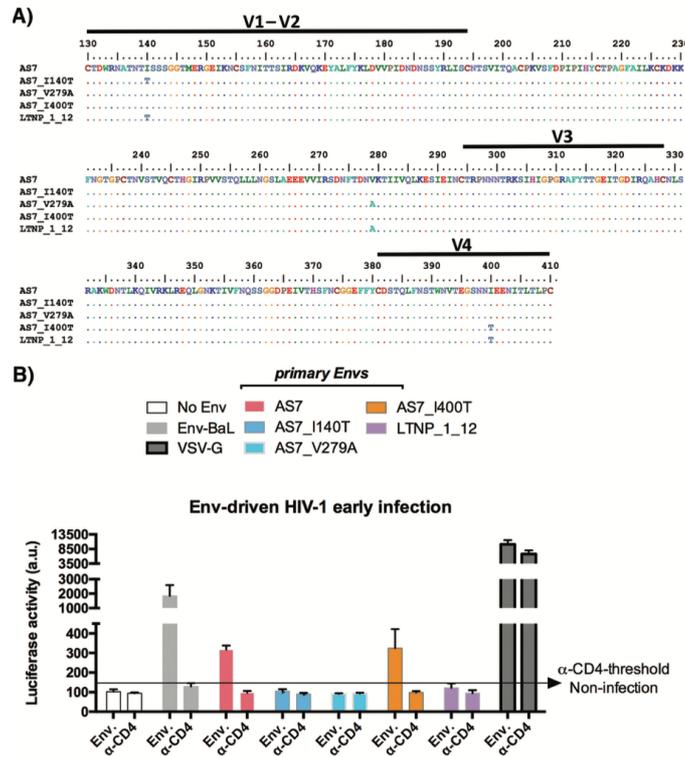


FIG 6 Analysis of the expression and viral entry efficiency of the different HIV-1-Env proteins from LTNP-EC and control patients. (A) Gp120 partial amino acid sequences of AS7 virus and the mutants derived in this AS7 virus backbone (AS7_I140T, AS7_V279A, and AS7_I400T) are shown and compared to the LTNP_1 clone 12 gp120 amino acid sequence from one of the cluster viruses. (B) Luciferase-based assay of viral entry and infection in permissive CEM.NKR-CR5 cells by nonreplicative HIV-1 luciferase reporter pseudoviruses bearing viral AS7 Env and the AS7 mutants shown in panel A and the control BaL01 Env strain (light gray bars). Nonproductive infection values (baseline) are obtained with a neutralizing anti-CD4 MAbs (5 μ g/ml), under the same experimental conditions. The quality of viral production and the specificity of CD4 for neutralizing HIV-1 early infection are indicated by the data obtained by using HIV-1 pseudovirus bearing the VSV-G Env. Data are values from 6 independent experiments carried out in triplicate. a.u., arbitrary light units.

efficient pore fusion formation relies on key signals triggered by Env-CD4 interaction promoting cytoskeleton modifications (29, 30, 32, 33), such as α -tubulin acetylation (33), F-actin severing, and capping reorganization (29, 30). A deficiency in these HIV-1-Env-mediated signals leads to a defect in the early steps of viral infection and replication (29–32, 45).

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 12

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers

mbio

Pseudoviruses bearing Envs from this cluster of LTNP-EC patients were inefficient in performing the initial steps of HIV-1 infection, pointing at a potential mechanism to explain the clinical phenotype. In fact, low viral fusion, infection, and replication activities were not the consequence of a lower cell surface expression of the Envs, the levels of which were similar in both groups (Fig. 2A), but were linked to a lower ability to bind to CD4 in a cell-to-cell HIV-1 transfer assay (Fig. 3E). We observed that the Envs from LTNP-EC viruses showed a low ability to bind to the cell-surface-expressed CD4 in primary cells and that the extent of binding correlated to their fusion capacity ($P = 0.0171$, Spearman's test) (Fig. 4B). Considering the chronology of CD4 binding and membrane fusion during HIV-1 entry, this significant correlation provides a causal link between both observations. Therefore, in this LTNP-EC cluster, the reduced Env-mediated fusion efficiency is related to the low ability to interact with the cell-surface-expressed CD4.

The invasion and infection of CD4⁺ T lymphocytes by HIV-1 is a complex process involving many cellular events triggered after the first Env-CD4 interaction that have been the subject of many studies (29, 30, 33, 41). The accumulated evidence indicates that the actin mobilization that occurs before the formation of the fusion pore plays a central role in this process (29, 30, 32). In fact, the actin cytoskeleton is deeply involved in the capping of cell surface receptors for viral infection, which facilitates the interaction with the Env complex and the subsequent fusion pore formation, entry, and infection. These HIV-1 Env-gp120/CD4-mediated actin and receptor reorganization and capping events have been shown to correlate with the infectivity of the virus (29, 30, 32). Moreover, the Env-mediated membrane fusion activity relies directly on the stabilization of a cortex of acetylated α -tubulin, triggered by the first Env-CD4 interaction (33, 34). These two key Env-CD4 signals for HIV-1 fusion, entry, and infection have been a central issue in the present study, where we observed that primary Envs from viruses of the LTNP-EC cluster individuals present nonefficient Envs for the promotion of both cortical F-actin reorganization and capping, with neither signal stabilizing acetylated α -tubulin. These data correlated well with the fact that these Envs are not able to bind CD4 with high affinity. Altogether these data suggest that the low fusion, infection, and replication activities of viruses from this LTNP-EC cluster are due to the inability of the viral Envs to bind to CD4 and to subsequently signal to appropriately rearrange the cortical cytoskeleton to fuse, enter, and infect target cells.

This study supports the role of viral characteristics in the clinical outcome of LTNP-EC individuals. We observed that the genotypic and phenotypic characteristics of the Env proteins from HIV-1 viruses of the cluster of LTNP-ECs were inherited by all the patients' viruses, which all displayed a low replication capacity and produced, in individuals with different host genotypes (Table 1), the same clinical LTNP-EC phenotype. It is reasonable to assume that because of their poor replicative capacity, these viruses established a low-level primary infection. The low replicative capacity could also affect the transmissibility of these viruses; however, the intravenous route of transmission reported in this cluster could have contributed to overcoming this barrier (Table 1).

The impaired Env functionality favored early immune control of the virus by a strong immunologic response during not only acute but also chronic HIV-1 infection, determining the long-term outcome (18, 20). The Envs from the cluster viruses showed low binding to CD4 and, in parallel, a low signaling activity to modify and reorganize tubulin and actin cytoskeletons, leading to a low fusion activity. These viral characteristics outline for the first time a mechanism that directly involves viral Env-associated functions as being responsible for inefficient performance of the initial steps of the HIV-1 viral cycle, thereby explaining the poor transmissibility and pathogenicity of the viruses from the LTNP-EC cluster under investigation. Our results together with those from a previous work that reported inefficient infection of viruses from LTNP-ECs (11) could indicate that the ability of HIV-1 to establish efficient infection determines the *in vivo* progression of the infection, and as we specifically described here, inefficient Env-mediated functions appear to be responsible for the LTNP-EC phenotype in this cluster of HIV-1⁺ individuals.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 13

176

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.



Until now, the heritability of HIV-1 virulence has been deduced from transmission pairs or from phylogenetic inferences in large cohorts of viruses in different countries and risk group patients, with widely varying results ranging from 7 to 53% of inheritance (16). In this work, we show that the characteristics of the cluster viral Envs have been inherited by all the viruses from a phylogenetic cluster, even if these patients showed different host markers, as shown by the HLAs (Table 1). We also demonstrated that the viral characteristics influence the clinical phenotype of the infected patients. The heritability of the inefficient functionality of the viral *env* was observed for the first time in viruses from a cluster of patients with the same clinical characteristics and resulted in the same specific nonevolving clinical phenotype. The virus from patient AS7, whose clinical outcome is unknown, shared 11 mutations with the other cluster viruses (35), but it presented three extra mutations that we showed were responsible for the replication capacity of this virus (Fig. 6A and B). These inefficient viral *env* genes of the cluster viruses could be very interesting reagents with which to study new approaches in vaccination programs.

In summary, we have demonstrated for the first time that the low CD4 binding and signaling characteristics of HIV-1 Envs explain the low replication capacity and transmissibility of these viruses. These viral characteristics, particularly in the *env* genes, could be the basis for the lack of clinical progression and the LTNP-EC clinical phenotype in the cluster of HIV-1⁺ individuals studied in this work. These results demonstrate not only the important role of HIV-1 viral properties in the clinical characteristics of the patients, but also, because they were inherited by all viruses in the LTNP-EC cluster, the heritability of viral properties.

MATERIALS AND METHODS

Samples studied, env nucleotide sequencing, and phylogenetic analysis. Briefly, 184 *env* nucleotide sequences were analyzed, of which 114 were from samples taken before 1995 from Spanish and North American individuals. The remaining sample sequences ($n = 70$) were obtained from Spanish LTNPs and other viremic patients infected after 2000 (35). Within these samples, we identified a very tight and close cluster of viruses, which was not the result of contamination because the nucleotide sequences were obtained with extreme physical separation measures, in different samples of the patients, and even in different laboratories (35). The analysis and phylogenetic reconstruction of the tree where the viral cluster was identified were previously described (35). Five of the cluster subjects were identified as LTNP-ECs; they were intravenous drug user (IDU) in the early 1980s, and all lived in Madrid and had a first HIV-1⁺ serology result between 1985 and 1990. The follow-up of patients LTNP_RF_15 and LTNP_RF_21 was not performed in our laboratory, and the only clone studied from patient LTNP_RF_21 was kindly provided by R. Delgado (Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain). Epidemiological and clinical characteristics of patient's samples are shown in Table 1.

Ethics statement. Samples were obtained from participants in previous studies who gave informed consent for genetic analysis studies, and they were registered as a sample collection in the Spanish National Registry of Biobanks for Biomedical Research under no. C.0004030. Consents were approved by the Ethical and Investigation Committees of the Centro Sanitario Sandoval (Madrid) and Hospital 12 de Octubre (Madrid), and the samples were encoded and deidentified in these centers. All clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The studies were approved by the Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal of the Instituto de Salud Carlos III under no. CEI PI 05_2010-v3 and CEI PI 09-2013.

Generation of env gene expression plasmids. Several expression plasmids were generated from *env* genes of 4 cluster individuals (LTNP_1, LTNP_3, LTNP_RF_21, and AS7), 4 HIV-1 chronic progressors (IV_10, IV_10_L14, and RIS_06), and 3 laboratory-adapted viruses (SF162, NL4.3, and 89ES_061). The R5-tropic Bal.01-*env* (catalog no. 11445) glycoprotein plasmid was from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. The *env* genes were amplified by nested PCR from proviral DNA (35). The products were cloned into the pcDNA3.1/D/V5-His Topo expression vector (Invitrogen). In total, 9 clones derived from the 4 cluster patients (LTNP_1 clones 8, 10, 12, and 37; LTNP_3 clones 20, 22 and 3; LTNP_RF clone 21; and AS7), 6 clones from chronic progressors (IV_10 clones 27 and 28, IV_10 clones 5 and 16, RIS_06 clone 2, and patient L_14 clone 9), and 4 clones from reference samples (SF162, 89ES_061, NL4.3, and Bal.01) were constructed. pcDNA3 plasmids coding for NL4.3-derived mutants D368R and 41.2, which abrogate CD4 binding and gp41-mediated membrane fusion, respectively, were generated by site-directed mutagenesis or by subcloning from original plasmids, as previously described (24). Expression plasmids were transformed in DH5 α cells, and clones were sequenced to check the correct insertion of the *env* gene.

Cells. The human CEM.NKR-CCR5 permissive cell line (catalog no. 4376), the HEK-293T line (catalog no. 103), and the TZM-bl line (catalog no. 8129) were from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Cells were cultured and used as previously described (29, 30, 33, 41).

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 14

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTNP Elite Controllers



Functional analysis of cloned Envs. The Env expression plasmids were used to transfect 293T cells with the CalPhos mammalian transfection kit (Clontech, Palo Alto, CA) in combination with either a Tat expression plasmid, pTat, for Env expression and fusion assays or with the env-defective HIV-1 backbone pSG3 plasmid for viral transfer assays (10). Env expression, viral transfer, and fusion capacities were assessed 24 h after cotransfection by harvesting transfected cells with Versene and washing cell suspensions twice in phosphate-buffered saline (PBS).

Analysis of cell-surface Env expression. 293T cells were cotransfected with the env expression plasmids and the tat expression plasmid; 10⁶ cells were incubated with the anti-gp120 antibody 2G12 (4 µg/ml; Polymun, Vienna, Austria) for 40 min at 37°C, washed in PBS, and further incubated with phycoerythrin (PE)-labeled goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) at room temperature for 15 min. Cells were washed with PBS and acquired in a fluorescence-activated cell sorter (FACS) LSRII flow cytometer. Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc., San Carlos, CA). The percentage of Env-expressing cells was used to assess Env expression (10).

Fusion activity. To test the fusion capacity of the Env proteins, 293T cells were cotransfected with the env expression plasmids and the control tat plasmid. A total of 10⁶ cells were mixed at a 1:1 ratio in 96-well plates with CD4⁺ CXCR4⁺ CCR5⁺ TZM-bl cells for 6 h. 293T cells transfected only with tat plasmid were used as control. Luciferase activity was measured in a Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland) using the Britte-Lite luciferase luminescence assay (PerkinElmer, Akron, OH). The percentage of Env-expressing cells and the mean fluorescence intensity (MFI) of these cells were used to calculate relative fluorescence intensity (RFI) as a measure of the number of cell-surface Env molecules as described previously (46); RFI = % of Env⁺ cells × MFI of Env⁺ cells. The ratio of total fusion to RFI was considered the fusogenicity index (FI), which estimates the fusogenic capacity of an individual Env irrespective of the level of expression (10).

Viral transfer activity. To test viral transfer activity, which exclusively depends on the binding of gp120 to the CD4 molecule, env expression plasmids were cotransfected with the defective pSG3 plasmid in 293T cells. A total of 10⁶ cells were mixed at a 1:1 ratio in 96-well plates with primary CD4⁺ T cells freshly isolated from donors by negative selection (CD4⁺ T cell isolation kit II, human; Miltenyi Biotec, Inc., Bergisch Gladbach, Germany). Viral transfer was assessed after 2 h of incubation, staining cells with the anti-HIV-1 p24 antibody Kc57 (Coulter clone; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) (42). Cells were acquired in a FACS LSRII flow cytometer, and the content of p24 in gated CD4⁺ T cells and gated 293T cells was analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc.) and expressed as the percentage of p24-positive cells. The percentage of p24⁺ 293T cells was used as a control of transfection efficiency, and the percentages were similar among experiments. The frequency of p24⁺ CD4⁺ T cells was a direct measure of the amount of the viruses bound to and taken up by these cells.

Production of viral particles with luciferase reporter pseudoviruses. Replication-deficient luciferase HIV-1 viral particles (luciferase reporter pseudoviruses) were obtained as described previously (29, 41, 47), using the luciferase-expressing reporter virus HIV1ΔnefΔenv/luc⁺ (pNL4-3Luc-R-E provirus bearing the luciferase gene inserted into the nef open reading frame [ORF] and which does not express env; catalog no. 6070013, NIH AIDS Reagent Program) and the described env expression plasmids from the different HIV-1 individuals or the reference env plasmids studied. As a control for non-CD4 entry and infection and viral production, when indicated, cotransduction of the pNL4-3Luc-R-E provirus (20 µg) vector with the pHEF-VSV-G vector (10 µg; NIH AIDS Reagent Program) was used to generate nonreplicative viral particles that fuse with cells in a vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G)-dependent manner (41). Viral stocks were normalized by p24-Gag content measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA [Innotest HIV antigen MAb, reference no. 80563; Fujirebio Europe, Göteborg, Sweden]).

Luciferase viral entry and infection assay. CEM.NKR.CCR5 cells (9 × 10⁵ cells in 24-well plates with 20 µg/ml Polybrene) were infected with 500 ng of p24 of luciferase reporter pseudoviruses in 1 ml total volume with RPMI 1640 for 2 h (by centrifugation at 1,200 × g at 25°C) and subsequent incubation for 4 h at 37°C, as previously described (29, 41, 47). Unbound virus was then removed by washing the infected cells. After 48 h of infection, luciferase activity was measured using a luciferase assay kit (Biotium, Hayward, CA) with a microplate reader (Victor XS; PerkinElmer, Waltham, MA). When indicated, permissive cells were pretreated with an anti-CD4 neutralizing MAb (5 µg/ml; EBIscience, San Diego, CA).

In vitro mutagenesis. Mutant A57 clones (A57_140T, A57_V279A, and A57_1400T) were obtained by site-directed mutagenesis using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) by following the manufacturer's instructions. Mutations were verified by DNA sequencing of the ENV-coding region.

Signaling activity assays. (i) Western blot analysis of HIV-1 Env-mediated α-tubulin acetylation was studied in CEM.NKR.CCR5 cells (1 × 10⁶ cells) incubated with 500 ng of p24 of luciferase reporter pseudoviruses for 1 h at 37°C (33). Membranes were probed with the anti-α-tubulin B-5-1-2 monoclonal antibody (MAb) and the anti-acetylated α-tubulin 6-11B-1 MAb (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Glostrup, Denmark). The increase in α-tubulin acetylation was quantified and expressed as the ratio of the intensities of the acetylated α-tubulin to the total α-tubulin bands, as described previously (33, 48). (ii) Immunofluorescence of HIV-1 Env-mediated acetylated α-tubulin and the F-actin capping assay was analyzed in CEM.NKR.CCR5 cells (1 × 10⁶ cells/point) incubated with HIV-1 luciferase reporter pseudoviruses (29, 30, 33), as described for Western blot analysis. Coverslips were mounted in Mowiol antifade (Dako) and imaged in xy midsections in a Fluoview FV1000 confocal microscope through a 1.35 NA objective (60×) (Olympus, Center Valley, PA) for high-resolution imaging of fixed treated cells. The final images and molecule codistributions were analyzed and quantified with MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA).

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 15

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.



Statistical analysis. Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 6.07 (GraphPad Software, Inc.). Significance when comparing 2 groups was determined with a 2-tailed nonparametric Mann-Whitney U test or by nonparametric Dunn's test for multiple comparisons. Student's t test was used for the comparison of the signaling activity. A nonparametric Spearman's test was used to calculate correlations.

Data availability. Data presented have been generated by the three laboratories. Any researcher will be able to access primary data upon request to jblanco@irsicaixa.es, avalenzu@ull.edu.es, or clopez@isciii.es.

ACKNOWLEDGMENTS

A.V.-F.'s lab is supported by the European regional development fund (ERDF), SAF2015-64118-R (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, Spain) Fundación CajaCanarias BIO29, UNLL10-3E-783 (ERDF and Fundación CajaCanarias), and by the Spanish AIDS Research Network RIS-RETIC grants RD16/0025/0011 and RD12/0017/0034 and cofunded by ISCIII and ERDF (RIS-RETIC) grants. R.C.-R., M.-S.V., L.A.-R., S.M.-H., and D.M.-A. are funded by RD16/0025/0011, RD12/0017/0034 (RIS-RETIC), SAF2011-24671-FPI, TESIS2015-010038- and TESIS2017010116-Programa Predoctoral de Formación del Personal Investigador, Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información de la Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento y por el Fondo Social Europeo (FSE) Programa Operativo Integrado de Canarias 2014-2020, Eje 3 Tema Prioritario 74 (85%), and European Social Fund and Fundación CajaCanarias BIO29-fellowships. Work in J.B.'s lab is supported by grants PI14/01307 and PI17/01518 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, Instituto de Salud Carlos III, ISCIII) and RIS-RETIC grants RD12/0017/0002 and RD16/0025/0041, cofunded by ISCIII and FEDER (EU). J.B. is a researcher from Fundació Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol supported by the Health Department of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya). IrsiCaixa and IGTP are part of CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. Work in C.L.-G.'s lab was supported by grants SAF (2010-17226) and (2016-77894-R) from MINECO (Spain) and FIS (PI 13/02269, ISCIII) and in part by the RIS-RETIC grants RD06/006/0036 and RD12/0017/0028 funded by the ISC III-FEDER. M.P. has support from RIS-RETIC contract RD12/0017/0036. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Work in P.L.'s lab is supported by Bijzonder Onderzoeksfonds KU Leuven (BOF) no. OT/14/115 and the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen (FWO) (G066215N).

We thank Esteban Domingo for the critical reading of the manuscript, the clinical follow-up of patients carried out by Carmen Rodríguez, Mar Vera, and Jorge del Romero (Centro Sanitario Sandoval), as well as Rafael Delgado (Hospital 12 de Octubre), and the technical work of Rosa Fuentes in CNM.

The authors have no competing interests to declare related to this work.

C.C.H., J.B., A.V.-F., and C.L.-G. designed, supervised, and analyzed the experiments. C.C.H., S.M.-H., D.M.-A., M.P., S.M., F.B.-G., I.O., R.C.-R., M.-S.V., and L.A.-R. performed experiments and analyzed data. C.C.H., J.B., A.V.F., and C.L.G. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8:1123-1128. <https://doi.org/10.1097/00002030-199408000-00014>.
2. Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, García S, Rodríguez C, Del Romero J, Teletni A, López-Galíndez C. 2010. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 5:e11079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011079>.
3. Blankson JN. 2010. Control of HIV-1 replication in elite suppressors. *Discov Med* 9:261-266.
4. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, Rouzioux C, Venet A, Delfraissy JF, SEROCO-HEMOCO Study Group. 2005. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 41:1053-1056. <https://doi.org/10.1086/433188>.
5. Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V, Fidler S, Gkrania-Klotsas E, Post FA, Kellam P, Porter K, Sandhu MS. 2014. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS* 28:149-162. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000049>.
6. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M. 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2709-2714. <https://doi.org/10.1073/pnas.050567397>.
7. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urutua A, Boufassa F, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G, Venet A, Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 16

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Inefficient Viral Envelopes in LTPN Elite Controllers



infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6776–6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>.

8. Rhodes DJ, Ashton L, Solomon A, Carr A, Cooper D, Kaldor J, Deacon N. 2000. Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. *J Virol* 74:10581–10588. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10581-10588.2000>.
9. Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Mallim MH, O'Brien SJ, Walker BD, Sullivan JL, Desrosiers RC. 2000. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 74:4361–4376. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.9.4361-4376.2000>.
10. Curriu M, Fausther-Bovendo H, Pernas M, Massanella M, Carrillo J, Cabrera C, López-Galíndez C, Clotet B, Debré P, Viellard V, Blanco J. 2012. Viremic HIV infected individuals with high CD4 T cells and functional envelope proteins show anti-gp41 antibodies with unique specificity and function. *PLoS One* 7:e30330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030330>.
11. Lassen KG, Lobritz MA, Bailey JR, Johnston S, Nguyen S, Lee B, Chou T, Siliciano RF, Markowitz M, Arts EJ. 2009. Elite suppressor-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics. *PLoS Pathog* 5:e1000377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000377>.
12. Milura T, Brumme ZL, Brockman MA, Rosato P, Seta J, Brumme CJ, Pereyra F, Kaufmann DE, Troche A, Block BL, Daar ES, Connick E, Jessen H, Kelleher AD, Rosenberg E, Markowitz M, Schaefer K, Valida F, Iwamoto A, Little S, Walker BD. 2010. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* 84:7581–7591. <https://doi.org/10.1128/JVI.00286-10>.
13. Sándonis V, Casado C, Alvaro T, Pernas M, Olivares I, García S, Rodríguez C, del Romero J, López-Galíndez C. 2009. A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTPNs. *Virology* 391:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.022>.
14. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272:1167–1170. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1167>.
15. Fraser C, Lythgoe K, Leventhal GE, Shirreff G, Hollingsworth TD, Alizon S, Bonhoeffer S. 2014. Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science* 343:1243727. <https://doi.org/10.1126/science.1243727>.
16. Blanquart F, Wymant C, Cornelissen M, Gall A, Bakker M, Bezemer D, Hall M, Hillebrecht M, Ong SH, Albert J, Bannert N, Fellay J, Franssen K, Gourelay AJ, Grabowski MK, Gussenheimer-Bartmeyer B, Günthard HF, Kivela P, Kouyos R, Laeyendecker O, Litsola K, Meyer L, Porter K, Ristola M, van Sighem A, Vanham G, Berkhout B, Kellam P, Reiss P, Fraser C, BEEHIVE Collaboration. 2017. Viral genetic variation accounts for a third of variability in HIV-1 set-point viral load in Europe. *PLoS Biol* 15:e2001855. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001855>.
17. Alizon S, von Wyl V, Stadler T, Kouyos RD, Yerly S, Hirschel B, Böni J, Shah C, Klimkait T, Furrer H, Rauch A, Vernazza PL, Bernasconi E, Betteguy M, Bürgisser P, Telenti A, Günthard HF, Bonhoeffer S, Swiss HIV Cohort Study. 2010. Phylogenetic approach reveals that virus genotype largely determines HIV set-point viral load. *PLoS Pathog* 6:e1001123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001123>.
18. Claborn DT, Prince JL, Scully E, Mächaria G, Micci L, Lawson B, Kopycinski J, Deymier ML, Vanderford TH, Nganou-Makamdop K, Ende Z, Brooks K, Tang J, Yu T, Lakhi S, Kilembe W, Silvestri G, Douek D, Goepfert PA, Price MA, Allen SA, Palardini M, Altfeld M, Gilmour J, Hunter E. 2015. Replicative fitness of transmitted HIV-1 drives acute immune activation, proviral load in memory CD4⁺ T cells, and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1480–E1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421607112>.
19. Hollingsworth TD, Laeyendecker O, Shirreff G, Donnelly CA, Senwadda D, Wawer MJ, Kiwanuka N, Nalugoda F, Collinson-Streng A, Ssemijja V, Hanage WP, Quinn TC, Gray RH, Fraser C. 2010. HIV-1 transmitting couples have similar viral load set-points in Rakai, Uganda. *PLoS Pathog* 6:e1000876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000876>.
20. Yue L, Pfafferoth KJ, Baalwa J, Conrod K, Dong CC, Chui C, Rong R, Claborn DT, Prince JL, Tang J, Ribeiro RM, Cormier E, Hahn BH, Perelson AS, Shaw GM, Karita E, Gilmour J, Goepfert P, Derdeyn CA, Allen SA, Borrow P, Hunter E. 2015. Transmitted virus fitness and host T cell responses collectively define divergent infection outcomes in two HIV-1 recipients. *PLoS Pathog* 11:e1004565. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004565>.
21. Shirreff G, Alizon S, Cori A, Günthard HF, Laeyendecker O, van Sighem A, Bezemer D, Fraser C. 2013. How effectively can HIV phylogenies be used to measure heritability? *Evol Med Public Health* 2013:209–224. <https://doi.org/10.1093/emph/eot019>.
22. Bonhoeffer S, Fraser C, Leventhal GE. 2015. High heritability is compatible with the broad distribution of set point viral load in HIV carriers. *PLoS Pathog* 11:e1004634. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004634>.
23. Blanco J, Jacotot E, Cabrera C, Cardona A, Clotet B, De Clercq E, Esté JA. 1999. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* 13:909–917. <https://doi.org/10.1097/00002030-199905280-00006>.
24. Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, Curriu M, Mamoun R, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. 2008. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 4:996–1008. <https://doi.org/10.4161/aut.6880>.
25. Rangel HR, Weber J, Chakraborty B, Gutierrez A, Marotta ML, Mirza M, Kiser P, Martinez MA, Este JA, Quiñones-Mateu ME. 2003. Role of the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene in viral fitness. *J Virol* 77:9069–9073. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.9069-9073.2003>.
26. Marozsan AJ, Moore DM, Lobritz MA, Fraundorf E, Abrahá A, Reeves JD, Arts EJ. 2005. Differences in the fitness of two diverse wild-type human immunodeficiency virus type 1 isolates are related to the efficiency of cell binding and entry. *J Virol* 79:7121–7134. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7121-7134.2005>.
27. Tersmette M, Lange JMA, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, Miedema F. 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 6:983–985.
28. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, Fanton JW, Racz P, Tenner-Racz K, Axthelm MK, Letvin NL, Sodroski J. 2001. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD4⁺ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* 75:5646–5655. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5646-5655.2001>.
29. Barrero-Villar M, Cabrero JR, Gordón-Alonso M, Barroso-González J, Alvarez-Losada S, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Madrid F, Valenzuela-Fernández A. 2009. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci* 122:103–113. <https://doi.org/10.1242/jcs.035873>.
30. García-Expósito L, Ziglio S, Barroso-González J, de Armas-Rillo L, Valera MS, Zupeto D, Machado JD, Valenzuela-Fernández A. 2013. Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection. *Retrovirology* 10:39. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-39>.
31. Liu Y, Balkins NW, Shaw S. 2009. HIV infection of T cells: actin-in and actin-out. *Sci Signal* 2:pe23. <https://doi.org/10.1126/scisignal.266pe23>.
32. Santos G, Valenzuela-Fernández A, Torres NV. 2014. Quantitative analysis of the processes and signaling events involved in early HIV-1 infection of T cells. *PLoS One* 9:e103845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103845>.
33. Valenzuela-Fernández A, Alvarez S, Gordón-Alonso M, Barrero M, Urs A, Cabrero JR, Fernández G, Naranjo-Suárez S, Yáñez-Mo M, Serrador JM, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Madrid F. 2005. Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell* 16:5445–5454. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0354>.
34. Valenzuela-Fernández A, Cabrero JR, Serrador JM, Sánchez-Madrid F. 2008. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* 18:291–297. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.04.003>.
35. Casado C, Pernas M, Sándonis V, Alvaro-Cifuentes T, Olivares I, Fuentes R, Martínez-Prats L, Grau E, Ruiz L, Delgado R, Rodríguez C, del Romero J, López-Galíndez C. 2013. Identification of a cluster of HIV-1 controllers infected with low replicating viruses. *PLoS One* 8:e77663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077663>.
36. Coffin JM. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483–489. <https://doi.org/10.1126/science.7824947>.
37. Immonen TT, Leitner T. 2014. Reduced evolutionary rates in HIV-1 reveal extensive latency periods among replicating lineages. *Retrovirology* 11:81. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0081-0>.
38. Leitner T, Albert J. 1999. The molecular clock of HIV-1 unveiled through

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 17

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050 Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 22/03/2021 14:17:05
Agustín Valenzuela Fernández UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	22/03/2021 16:24:51
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	21/04/2021 15:56:46

Anexo de publicaciones

Casado et al.

mbio

- analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10752–10757. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10752>.
39. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JL. 1999. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 73: 10489–10502.
40. Bello G, Casado C, García S, Rodríguez C, Del Romero J, Carvajal-Rodríguez A, Posada D, López-Galíndez C. 2007. Lack of temporal structure in the short-term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients. *Virology* 362:294–303. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.039>.
41. Barrero-Villar M, Barroso-González J, Cabrero JR, Gordón-Alonso M, Alvarez-Losada S, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Madrid F, Valenzuela-Fernández A. 2008. PI4P5-kinase α is required for efficient HIV-1 entry and infection of T cells. *J Immunol* 181:6882–6888. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6882>.
42. Blanco J, Bosch B, Fernández-Figueras MT, Barretina J, Clotet B, Esté JA. 2004. High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *J Biol Chem* 279:51305–51314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408547200>.
43. Puigdomènech I, Massanella M, Cabrera C, Clotet B, Blanco J. 2009. On the steps of cell-to-cell HIV transmission between CD4 T cells. *Retrovirology* 6:89. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-89>.
44. LaBranche CC, Hoffman TL, Romano J, Haggarty BS, Edwards TG, Matthews TJ, Doms RW, Hoxie JA. 1999. Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J Virol* 73:10310–10319.
45. Liu Y, Woodward A, Zhu H, Andrus T, McNevin J, Lee J, Mullins JI, Corey L, McElrath MJ, Zhu T. 2009. Preinfection human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocytes failed to prevent HIV type 1 infection from strains genetically unrelated to viruses in long-term exposed partners. *J Virol* 83:10821–10829. <https://doi.org/10.1128/JVI.00839-09>.
46. Sterjovski J, Churchill MJ, Ellett A, Gray LR, Roche MJ, Dunfee RL, Purcell DF, Saksena N, Wang B, Sonza S, Wesselingh SL, Karlsson I, Fenyo EM, Gabuzda D, Cunningham AL, Gorry PR. 2007. Asn 362 in gp120 contributes to enhanced fusogenicity by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with AIDS. *Retrovirology* 4:89. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-89>.
47. García-Expósito L, Barroso-González J, Puigdomènech I, Machado JD, Blanco J, Valenzuela-Fernández A. 2011. HIV-1 requires Arf6-mediated membrane dynamics to efficiently enter and infect T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 22:1148–1166. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0722>.
48. Valera MS, de Armas-Rillo L, Barroso-González J, Ziglio S, Batisse J, Dubois N, Marrero-Hernández S, Borel S, García-Expósito L, Biard-Piechaczyk M, Paillart JC, Valenzuela-Fernández A. 2015. The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology* 12:53. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0181-5>.

March/April 2018 Volume 9 Issue 2 e02338-17

mbio.asm.org 18

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3296050

Código de verificación: EjnlCgrf

Firmado por: Daniel Márquez Arce
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 22/03/2021 14:17:05

Agustín Valenzuela Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

22/03/2021 16:24:51

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

21/04/2021 15:56:46