

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Medicina

Curso académico 2022/2023

DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA
PROTEÍNA ACCESORIA VPR DEL VIRUS DE
LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

AUTORA:

Elizabeth Burch Nchama

TUTORES:

Jonay García Luis

Agustín Valenzuela Fernández

Unidad de Farmacología

Departamento de Medicina Física y Farmacología

A Jonay y Agustín, por enseñarme mucho más de lo que pueden abarcar estas páginas.

A Valeria, por ser la mejor compañera de laboratorio.

A Álvar, por escuchar mis frustraciones y compartir mis alegrías.

Resumen

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cuya causa es la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), continúa siendo actualmente una pandemia desde la definición de los primeros casos en 1981. El VIH, perteneciente a la familia *Retroviridae*, está constituido por enzimas (retrotranscriptasa, integrasa y proteasa), proteínas estructurales de la envoltura, la matriz y la cápside, y por proteínas accesorias, entre las que se encuentra la proteína viral R (Vpr), objeto de esta investigación. Se han descrito diversas variantes y funciones de Vpr que influyen en la patogenia del virus. El estudio de las dianas moleculares de esta proteína y sus efectos en las células eucariotas, es esencial para un mejor conocimiento de la infección por el VIH y el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Para ello, se ha desarrollado un modelo celular en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), utilizando como estrategia de clonaje de Vpr el método *Modular Cloning* (MoClo) de *Golden Gate*, basado en la creación de plásmidos recombinantes con enzimas de restricción tipo IIs. Tras la optimización de método MoClo y la transformación de *S. cerevisiae* con los plásmidos sintetizados, se han realizado experimentos de inhibición del crecimiento celular y localización de Vpr mediante microscopía de epifluorescencia. A partir de los resultados observados y lo referido en diversas fuentes bibliográficas, puede inferirse que las diferentes variantes de Vpr presentan diferente capacidad de inhibición del ciclo celular en eucariontes.

Palabras clave: Vpr, *Modular Cloning*, *Saccharomyces cerevisiae*, ciclo celular.

Abstract

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is caused by infection with the human immunodeficiency virus (HIV). It remains a pandemic nowadays since the first cases were identified in 1981. HIV belongs to the *Retroviridae* family and consists of enzymes (retrotranscriptase, integrase and protease), structural proteins of the envelope, matrix and capsid, and accessory proteins, including the viral protein R (Vpr), the subject of this research. Several variants and functions of Vpr that influence virus pathogenesis have been described. The study of the molecular targets of this protein and its effects on

eukaryotic cells could be decisive for a better understanding of HIV infection and the discovery of new therapeutic targets. To this end, a cellular model has been developed in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), using Golden Gate's Modular Cloning (MoClo) method, based on the creation of recombinant plasmids with type II's restriction enzymes, as a cloning strategy for Vpr. After optimisation of the MoClo method and transformation of *S. cerevisiae* with the synthesised plasmids, cell growth inhibition experiment was performed as well as Vpr localisation using epifluorescence microscopy. From the results observed and the references in various literature sources, it can be inferred that the different variants of Vpr have different cell cycle inhibition capacity in eukaryotes.

Key words: Vpr, Modular Cloning, *Saccharomyces cerevisiae*, cell cycle.

Índice

1. Introducción.....	8
1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana.....	8
1.1.1 Historia y epidemiología.....	8
1.1.2 Estructura y ciclo vital.....	9
1.1.3 Proteínas accesorias: la proteína viral R.....	12
1.1.4 Macrófagos y Vpr: su influencia en la patogénesis y evolución de la enfermedad.....	15
1.2 La tecnología del ADN recombinante.....	17
1.3 El método MoClo de <i>Golden Gate Assembly</i> como estrategia de clonaje.....	19
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : un organismo modelo para la virología.....	20
2. Hipótesis y objetivos.....	22
2.1 Hipótesis.....	22
2.2 Objetivos.....	22
3. Materiales y métodos.....	22
3.1 Células.....	22
3.2 Plásmidos.....	23
3.3 Gen de Vpr.....	25
3.4 Medios de cultivo y antibióticos.....	27
3.5 Reacción en cadena de la polimerasa y <i>primers</i>	29
3.6 Enzimas de restricción.....	30
3.6.1 Digestión con enzimas de restricción tipo II.....	30
3.7 Domesticación de la parte 3.....	31
3.8 Ensamblaje del plásmido recombinante multiparte.....	31
3.9 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	32
3.9.1 Preparación del gel de agarosa.....	32
3.9.2 Preparación de las muestras de ADN.....	32
3.10 Transformación de <i>E. coli</i>	32
3.11 Purificación de ADN.....	32
3.11.1 Protocolo <i>Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit</i>	33
3.11.2 Protocolo QIAprep® Spin Miniprep Kit de Qiagen.....	33
3.12 Espectrofotometría.....	34

3.13 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.14 Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	35
3.15 Inducción de la expresión de Vpr (HxB2)-Venus y su detección por microscopía de epifluorescencia	35
4. Resultados.....	36
4.1 Optimización de MoClo para la creación de plásmidos recombinantes de expresión en <i>S. cerevisiae</i>	36
4.1.1 Optimización de la domesticación de la parte 3.....	38
4.1.2 Verificación del plásmido domesticado	39
4.2 Ensamblaje del plásmido recombinante completo y funcional	40
4.2.1 Verificación del plásmido multiparte completo y funcional.....	41
4.3 Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>S.cerevisiae</i>	42
4.4 Determinación de la sublocalización celular de Vpr HxB2.....	44
5. Discusión	45
6. Conclusiones.....	46
7. Perspectivas	47
8. ¿Qué he aprendido durante el TFG?.....	47
9. Bibliografía.....	48
Anexo	51

1. Introducción

1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana

1.1.1 Historia y epidemiología

Los primeros casos clínicos de la enfermedad que desde 1982 se conocería como síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fueron publicados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) el 5 de junio de 1981, tras haberse observado cuadros de neumonías por *Pneumocystis jirovecii* concurrentes con infecciones por citomegalovirus humano (virus herpes simplex o herpes humano 5 (VHH-5)) e infecciones de mucosas por *Candida albicans* en cinco varones homosexuales jóvenes y aparentemente sanos previamente, que no mejoraban a pesar de tratamiento adecuado, falleciendo a los pocos meses (1). Esta publicación revelaba los primeros pacientes documentados de la pandemia de SIDA que continúa actualmente.

El agente causal de estos cuadros clínicos fue desvelado en 1983, cuando Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier del Instituto Pasteur de París anunciaron el descubrimiento del virus asociado a linfadenopatías, posteriormente llamado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que ambos recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2008 (2).

La infección por el VIH originalmente se trata de una zoonosis. Probablemente, alrededor del año 1900 se dio la transmisión desde un chimpancé a un humano en el sudeste de Camerún. Hacia el 1920, una persona infectada viajó, siguiendo el recorrido del río Sangha, desde Camerún a la actual ciudad de Kinshasa, a partir de la cual pudo extenderse hacia África Central a través de la red de ferrocarril (3).

Desde el inicio de la epidemia, alrededor de 79,3 millones de personas han contraído la infección y 36,3 millones han fallecido a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. En 2021, 38,4 millones de personas vivían con el VIH en todo el mundo; 1,5 millones contrajeron la infección, más de 1 millón más que los objetivos mundiales, y 650.000 fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. El número de personas que reciben tratamiento contra el VIH creció más lentamente en el 2021 que en más de una década (4)

En España, hasta junio de 2022 se recibió un total de 2.786 notificaciones de nuevos diagnósticos de infección por VIH en el año 2021, de los cuales 205 se dieron en Canarias.

El 85,5% de los nuevos diagnósticos disponía de información sobre la primera determinación de linfocitos CD4+. Entre ellos, 30,1% se encontraba en una situación de enfermedad avanzada (< 200 linfocitos CD4+/mm³), y el 49,8%, con < 350 CD4+/mm³, son considerados diagnósticos tardíos (5).

1.1.2 Estructura y ciclo vital

El VIH es un lentivirus de ARN monocatenario de sentido positivo, que pertenece a la familia *Retroviridae*. Cada virión contiene dos copias del genoma de 10 kilobases (homólogas, pero no idénticas) y cada copia contiene nueve genes flanqueados por secuencias de repetición larga (LTR), que permiten la integración del ADN vírico en el cromosoma de la célula huésped y proporcionan sitios de unión para el inicio de la transcripción (6). Los genes codifican para las proteínas p17, p7, p6 y p24, relacionadas con la matriz, la cápside y la nucleocápside (contenidas en el gen *gag*), las enzimas transcriptasa inversa, proteasa e integrasa (contenidas en el gen *pol*), las proteínas de la envoltura gp120 y gp41 (contenidas en el gen *env*) y seis proteínas reguladoras y accesorias, entre las que se encuentra la proteína Vpr (figura 1).

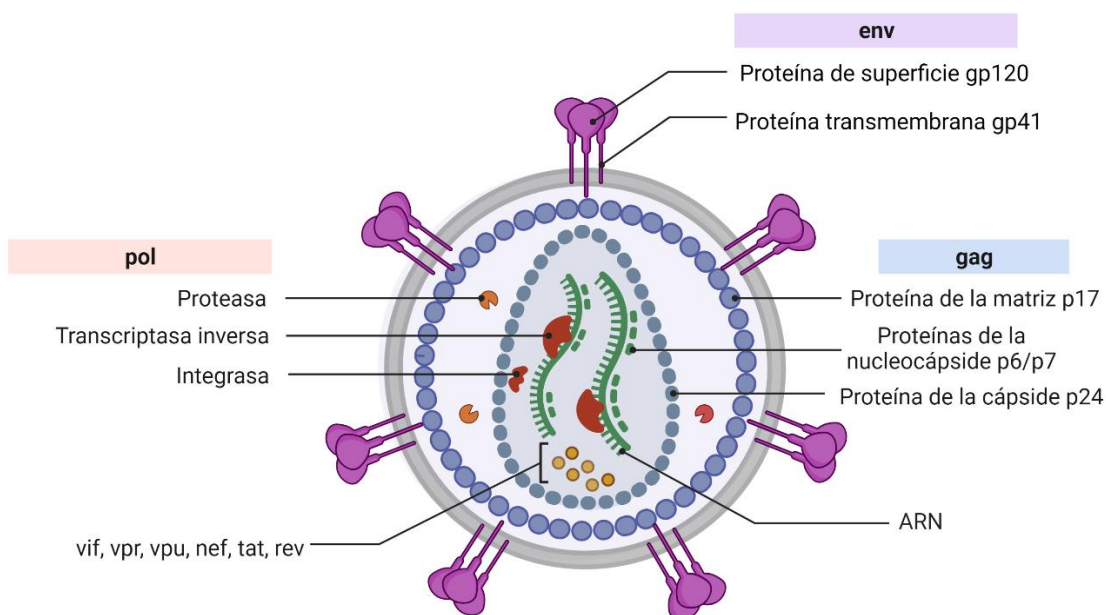


Figura 1. Estructura del VIH. Imagen creada con BioRender. Referencia: ZG258KFBRK.

Existen dos tipos de VIH, el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2). El VIH-1 tiene una distribución más amplia, presenta una mayor patogenicidad y es la más estudiada. Por ello, los datos proporcionados en este trabajo son mayoritariamente sobre el VIH-1.

El principal receptor del VIH-1 es el CD4, el cual se expresa principalmente en la superficie de linfocitos T CD4+, macrófagos, monocitos y células dendríticas. La

infección de estas células requiere la fijación inicial de la glucoproteína de la envoltura gp120 al receptor CD4, lo que desencadena un cambio conformacional en gp120 que permite la unión adicional a uno de los receptores para quimiocinas que actúan como correceptores: CCR5 o CXCR4, según el tropismo viral. La unión de gp120 al correceptor expone el dominio de fusión de la proteína transmembrana gp41, lo que permite la fusión de las membranas viral y celular, y la posterior entrada del virus a la célula diana (1).

Las diferencias en la secuencia del gen *env* determinan si el virus puede utilizar los receptores CCR5 o CXCR4 (o ambos) como correceptores. Las variantes del VIH que utilizan CCR5 o CXCR4 se denominan virus R5 o X4, respectivamente. Los sujetos homocigóticos respecto a una supresión de 32 pares de bases en el alelo CCR5 (CCR5 Δ 32) son muy resistentes a la infección por el virus R5, pero siguen siendo proclives a la infección por virus X4.

Una vez que el virus se ha fusionado con la célula huésped, su ARN se retrotranscribe a ADN por acción de la retrotranscriptasa viral en el interior de la cápside, y se forma un complejo de preintegración (PIC) constituido por el ADN viral, la proteína de la matriz (p17), la transcriptasa inversa y la proteína accesoria Vpr. El PIC se transporta al núcleo de la célula huésped, donde el ADN viral se integra en el genoma. El ADN viral se transcribe a ARN mensajero mediante la maquinaria celular y se exporta de nuevo al citoplasma, donde se traduce a proteínas virales. El ensamblaje de los nuevos viriones se da en la membrana plasmática celular mediante la acción de la poliproteína Gag, la cual participa en interacciones proteicas para formar partículas esféricas y organiza las proteínas de la envoltura y el ARN viral en el interior del virión. Sin embargo, la liberación del virión de la membrana plasmática por gemación, se realiza mediante mecanismos de complejos endosomales de la célula huésped (ESCRT; *endosomal sorting complexes required for transport*). El nuevo virión liberado es inmaduro y no presenta capacidad infectiva. La maduración del virión se produce a partir de la activación de la proteasa viral, que escinde a la poliproteína Gag en sus diferentes dominios (entre los que se encuentra p17, p24, p6 y p7), lo que desencadena una serie de cambios que preparan al virión para infectar otra célula (7) (figura 2).

La terapia antirretroviral (TAR) actual es muy efectiva suprimiendo la replicación viral y disminuyendo el riesgo de desarrollo de SIDA. La TAR además es crucial en la prevención de la transmisión vertical o mediante la leche materna, disminuyendo la probabilidad de infección del feto o recién nacido hasta menos del 5%; las cifras de

transmisión vertical y mediante leche materna son un 15-25% y un 35-40% respectivamente, si la madre no se encuentra en tratamiento (8).

En la actualidad, existen cinco variedades de TAR con diferentes mecanismos de acción: **inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa** (análogos de nucleósidos que se incorporan de forma preferente a la molécula de ADN viral, bloqueando su síntesis), **inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa** (estos fármacos se adhieren a la enzima cerca de su sitio activo inhibiendo su actividad), **inhibidores de la integrasa** (impiden la integración del genoma viral en la célula hospedadora), **inhibidores de la proteasa** (inhiben a la proteasa, encargada de la escisión de cadenas polipeptídicas para dar lugar a proteínas maduras) y finalmente, **inhibidores de entrada** (inhiben la entrada del virión a la célula uniéndose a CCR5, por lo que previenen la infección por virus R5) (9). La TAR es un tratamiento que previene la infección de nuevas células, pero no la elimina en células con el genoma del VIH-1 integrado. Por lo tanto, no es un tratamiento curativo y si se interrumpe, se restaura la replicación viral y pueden alcanzarse altos niveles de carga viral en sangre procedente de los reservorios virales, como las células CD4⁺ de memoria, los monocitos o los macrófagos (10). Por ello, es importante seguir estudiando el ciclo de replicación viral del VIH-1 y los factores del huésped implicados con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas.

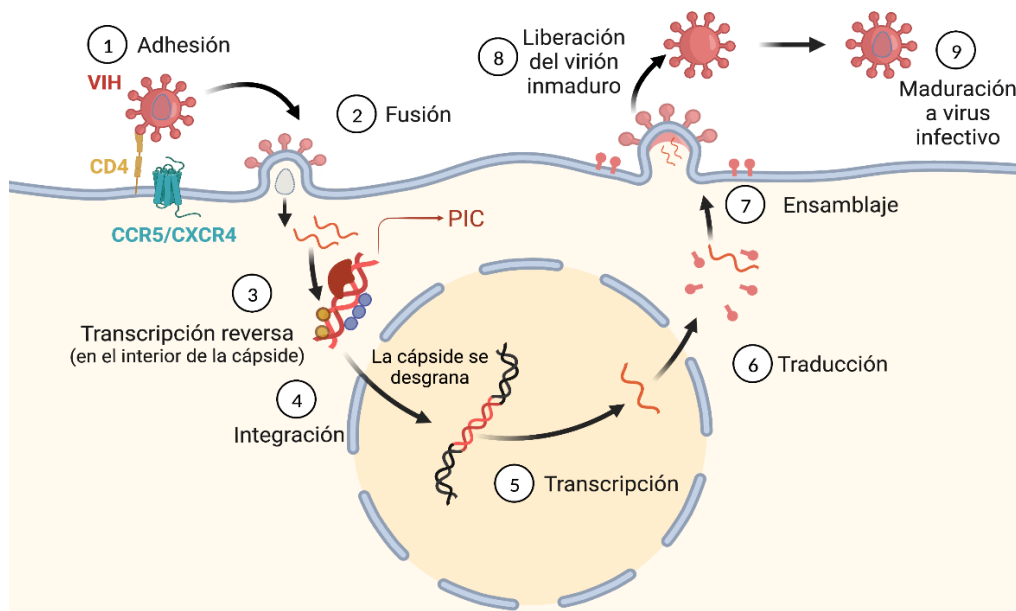


Figura 2. Ciclo vital del VIH. La gp120 se une al receptor CD4 y, tras un cambio conformacional, a los correceptores CCR5 o CXCR4, lo que expone el dominio de fusión de la gp41 y permite la fusión de la envoltura con la membrana celular. Se libera al citoplasma la cápside y comienza la transcripción reversa en su interior. En el núcleo, la cápside se desgrana y se integra el ADN viral en el ADN del huésped. Tras la transcripción y la traducción, se ensamblan los componentes virales en la membrana plasmática y se libera un virión inmaduro, que madura posteriormente formando la cápside y adquiriendo capacidad infecciosa. Imagen creada bajo licencia con BioRender.com. Referencia: ZC25E5RZ11

1.1.3 Proteínas accesorias: la proteína viral R

El VIH-1 codifica para las proteínas accesorias Tat (transactivador de la transcripción), Rev (regulador de la expresión de proteínas del virión), Nef (factor regulador negativo), Vif (proteína de la infectividad del virión), Vpu (proteína viral U) y, en la que nos centraremos a lo largo del presente trabajo, la proteína viral R o Vpr. Estas proteínas se definieron como accesorias porque *in vitro* no parecían necesarias para la replicación viral. Actualmente, se sabe que su función es aumentar la infectividad del virus, además de jugar un importante papel en la interacción entre el virus y la célula huésped (11). Por ello, el estudio de los mecanismos de acción de las proteínas accesorias podría ser útil para identificar nuevas dianas terapéuticas para el control de la infección.

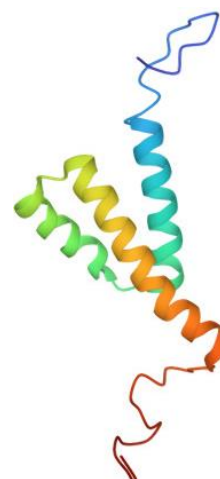


Figura 3.
Estructura proteica de Vpr. Imagen extraída de Protein Data Bank.
Referencia: 1M8L

Vpr está constituida por 96 aminoácidos (en el caso de la variante del genoma NL4-3). La variante truncada procedente del genoma HxB2, presenta 78 aminoácidos. Su estructura terciaria la forman tres cadenas α -hélice rodeadas por dominios flexibles en N- y C- terminal y plegadas alrededor de un núcleo hidrofóbico (figura 3). Se trata de una proteína altamente conservada en los lentivirus de los primates: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV), dato que ya sugiere que ejerce un rol importante en el ciclo viral.

En efecto, son poco frecuentes los casos de infecciones con virus que presentan Vpr mutada. Se observó el caso de una madre y su hijo infectados por el VIH-1 que vivieron sin síntomas y manteniendo niveles normales de linfocitos CD4+ durante más de 13 años. El análisis del genoma viral indicó la presencia de inserciones, deleciones y polimorfismos en la región C-terminal de la proteína Vpr, entre los residuos 83 y 89, implicados en el arresto del ciclo celular en la fase G2. Por lo tanto, las mutaciones en C-terminal de Vpr parecen producir infecciones crónicas no progresivas con largas supervivencias (12).

Por otro lado, se estudió el caso de la infección accidental en 1985 de un trabajador de laboratorio con una reserva viral heterogénea, entre las que se encuentra la variante HxB2, la cual presenta en su genoma mutaciones que provocan la terminación precoz del marco de lectura de tres proteínas accesorias: Vpr, Vpu y Nef. Es decir, se producen proteínas

truncadas durante la traducción al encontrarse un codón de parada precoz en el ARN mensajero. Se demostró que la variante HxB2 tiene capacidad replicativa en células mononucleares de sangre periférica (linfocitos y monocitos) *in vitro*, pero no *in vivo*. (13). Entre 1988 y 1992 se aislaron viriones del trabajador de laboratorio y se secuenciaron genomas virales con las mutaciones en Vpr, Vpu y Nef revertidas y un tropismo adquirido por los macrófagos, lo que permitía su infección. Esta secuencia fue denominada LW/C (14). El trabajador de laboratorio desarrolló el SIDA tras 8 años desde la infección (15).

Varios estudios han demostrado la presencia de la proteína en las partículas virales de VIH-1, pudiendo alcanzar la cantidad de más de 700 moléculas por virión, lo que es indicativo de que Vpr participa en la fase temprana de la infección (16,17).

La localización de la proteína en la célula infectada es variable, pudiendo encontrarse en el núcleo, en las mitocondrias y en el citoplasma. También puede encontrarse de forma soluble en el torrente sanguíneo y actuar como virotoxina, siendo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica e inducir la apoptosis de neuronas (18). Por lo tanto, las diferentes localizaciones pueden ser determinantes para las diferentes funciones de Vpr.

Se han descrito varias funciones que ejerce Vpr en la patogénesis del VIH-1:

En las células en división, **Vpr detiene el ciclo celular en la transición de fase G2 a fase M (G2/ M)**. La detención del ciclo celular impide la expansión clonal de los linfocitos T activados, por lo que Vpr participa en la disfunción del sistema inmune característica del SIDA. Por otro lado, se ha observado mayor producción de proteínas virales en las células T infectadas detenidas en fase G2/ M, con respecto a células en fase G1, lo que sugiere que Vpr actúa como activador de la transcripción en la fase G2/M; esto también puede deberse a que la región LTR del virus es más activo en esta fase del ciclo celular, por lo que aumenta la producción de viriones (19). La teoría más aceptada que explica el mecanismo por el que Vpr produce este arresto del ciclo celular implica a la proteína del huésped cdc2 y a sus proteínas reguladoras. Cdc2 (también llamada Cdk1) es una quinasa dependiente de ciclina que participa en el punto de control o *checkpoint* que condiciona el paso de la fase G2 a la fase M, verificando que la replicación genética ha sido precisa antes de dar paso a la división celular. A su vez, la actividad de cdc2 es controlada por la fosfatasa cdc25 y la quinasa Wee1, con las que también interacciona Vpr. Cuando cdc2 es fosforilada por Wee1 es desactivada; por el contrario, cuando es desfosforilada por cdc25 se activa. Se ha demostrado que Vpr aumenta la actividad de

Wee1 e inhibe a la fosfatasa cdc25, provocando una hiperfosforilación de cdc2 y, por lo tanto, su inactivación y arresto del ciclo celular en fase G2/ M (20) (figura 4).

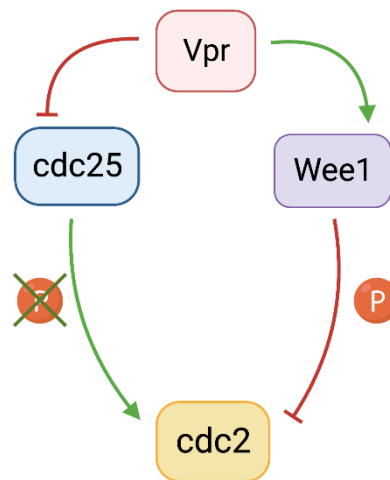


Figura 4. Vpr aumenta la actividad de la quinasa Wee1, la cual desactiva a la quinasa dependiente de ciclina cdc2; por otro lado, Vpr inhibe a la fosfatasa cdc25, que activa a cdc2. De esta manera, se inhibe la actividad de cdc2 y el ciclo celular se detiene en fase G2. Imagen creada bajo licencia con BioRender.com. Referencia: GV25E5RVC8.

Vpr es capaz de degradar proteínas mediante su unión a DCAF1. Estudios *in vitro* describieron una proteína del huésped que inmunoprecipitaba junto a Vpr, la proteína de unión a Vpr o VprBP, aunque se desconocía la razón de esa interacción. Posteriormente, esta proteína fue denominada DCAF1 y se relacionó con numerosas funciones de Vpr. DCAF1 forma parte del complejo ligasa DCAF1-DDB-Cullin4 E3, el cual participa en procesos de ubiquitinación de proteínas para causar su degradación o regular su actividad. Vpr se une a DCAF1 y a la proteína diana para provocar su ubiquitinación por parte del complejo ligasa (21). Un ejemplo es la degradación de TET2 mediada por Vpr (22). TET2 forma parte de la familia proteica TET, la cual regula la metilación en 5' de los residuos de citosina del ADN. En condiciones normales, DCAF1 monoubiquitina a TET2, lo que aumenta su afinidad con la cromatina. Sin embargo, en la infección por VIH-1, Vpr produce la poliubiquitinación y consecuente degradación de TET2. Como TET2 inhibe la transcripción de la interleuquina (IL) 6 (IL-6), su degradación aumenta la expresión de IL-6, una citoquina inflamatoria (23).

El VIH induce una débil respuesta de interferones, y, aunque los mecanismos no están bien esclarecidos, se ha observado que Vpr reduce la transcripción de interferón α (INF α) e interferón β (INF β), ambos interferones de clase I. Además, Vpr también impide la

inducción de $\text{INF}\beta$, mediante la degradación por ubiquitinación mediada por Vpr, del factor regulador 3 de interferón (IRF3).

Como se ha mencionado anteriormente, Vpr participa en el transporte del PIC hacia el núcleo de la célula huésped, donde entra al espacio nuclear a través de los poros nucleares. Esto es crucial para la replicación viral del VIH en células que no se encuentran en división, como los macrófagos. Sin embargo, otros retrovirus como el oncoretrovirus linfotrópico de células T humanas (HTLV) integran su genoma cuando la célula se encuentra en mitosis aprovechando que la cromatina se encuentra accesible durante el desmantelamiento de la membrana nuclear en la división celular (24). De hecho, es importante señalar que esta distintiva capacidad de infectar macrófagos es determinante en la patogénesis del VIH y en la evolución de la enfermedad.

1.1.4 Macrófagos y Vpr: su influencia en la patogénesis y evolución de la enfermedad

Los macrófagos juegan un papel crucial en el progreso de la infección por VIH. En las personas con SIDA, en las que la población de células T CD4^+ ha decaído, los macrófagos son una fuente de viremia y replicación viral. La relación de la proteína Vpr con los macrófagos y su contribución en la patogénesis del VIH, radica en varios aspectos relacionados con la sinapsis virológica.

Los macrófagos se originan mediante dos procesos. Por un lado, provienen de la diferenciación de un monocito circulante derivado, a su vez, de la diferenciación de una célula madre hematopoyética en la médula ósea. Por otro lado, derivan de la diferenciación de células madre mieloides procedentes del saco vitelino en las primeras semanas de embriogénesis, dando lugar a los llamados macrófagos residentes en tejidos o histiocitos (25).

Los macrófagos son células efectoras de la inmunidad innata, primera línea de defensa frente a patógenos, debido a su capacidad de fagocitosis y su actividad como célula presentadora de antígenos (APC). El proceso de fagocitosis está mediado por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) y por la opsonización mediada por proteínas del complemento, inmunoglobulinas y RRP solubles, como la proteína C reactiva. Tras la fagocitosis, los macrófagos procesan los antígenos proteicos y los presentan a los linfocitos T a través de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) (el

complejo mayor de histocompatibilidad [MHC] en los seres humanos) tanto de tipo I como de tipo II, presentes en su membrana celular. La presentación de antígenos a los linfocitos T induce su activación (26).

Sin embargo, su capacidad de fagocitosis los convierte, a su vez, en dianas vulnerables de patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, virus Dengue y VIH (23).

También tienen un papel como reguladores de la inflamación a través de la secreción de citoquinas. La IL-12 es secretada por los macrófagos activados (conocidos como M1) y potencia la acción de las células T CD4+. En cambio, la IL-10 secretada por los macrófagos con actividad antiinflamatoria (denominados M2), suprime la activación de las células T (27).

La infección por el VIH-1 modifica de diferentes maneras la funcionalidad de los macrófagos, lo que tiene una gran importancia en la patogénesis. En primer lugar, se produce una inhibición de la capacidad de fagocitosis en los macrófagos infectados, aumentando la susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas. En un estudio se observó la menor capacidad de opsonización y fagocitosis de *Candida albicans* en macrófagos infectados *in vitro* con el VIH-1, con respecto a macrófagos no infectados del mismo donante; además, el número de levaduras por célula era sustancialmente mayor en macrófagos no infectados (28). En segundo lugar, se da un aumento de las poblaciones de macrófagos M1, lo que promueve un estado proinflamatorio en el organismo, causando arterioesclerosis y alteraciones neurocognitivas y hepáticas. En último lugar, es importante destacar la capacidad de diseminación del virus a través del contacto célula-célula, proceso denominado **sinapsis virológica**. La sinapsis virológica se produce tras la interacción de la gp-120, los receptores CD4 y los correceptores (CCR5 o CXCR5) que se expresan en la membrana celular tanto de la célula infectada como de la célula vecina no infectada, facilitando la transmisión de partículas virales a través del complejo molecular formado. Los macrófagos son capaces de mediar la sinapsis virológica e infectar células T CD4+ de forma eficiente. Se ha observado que un macrófago puede infectar al menos a un linfocito cada 6 horas (29).

Durante la infección por VIH de los macrófagos Vpr juega un papel central. Diversos estudios han demostrado que **Vpr potencia la expresión del gen *env* en macrófagos que derivan de monocitos**. Recientemente, se ha demostrado que las glucoproteínas gp120 y

gp41 son degradadas, en ausencia de Vpr, por un factor desconocido presente en macrófagos, lo que sugiere que Vpr contrarresta la acción de ese factor de la célula huésped. De esta manera, pueden expresarse suficientes proteínas de la envoltura que, posteriormente, participarán en los procesos de sinapsis virológica (30).

Por otro lado, **Vpr disminuye la expresión del receptor de manosa en las membranas celulares de los macrófagos** mediante la reducción de su ARN mensajero (*MRC1*). La importancia de este proceso radica en el papel del receptor de manosa como factor de restricción de las proteínas de la envoltura a través del reconocimiento de sus residuos de manosa, lo que impide la transmisión del virus mediante el contacto célula-célula (31).

1.2 La tecnología del ADN recombinante

La tecnología del ADN recombinante está constituida por un conjunto de técnicas que permiten aislar una secuencia diana de ADN del resto del genoma, y clonarla o expresarla en otra célula huésped mediante la creación de una nueva molécula de ADN.

Una molécula de ADN recombinante es cualquier molécula de ADN elaborada por medios artificiales a partir de dos fragmentos que habitualmente no se encuentran juntos. Una porción del ADN corresponde al ADN diana que debe clonarse, y el resto es el vector que contiene los elementos necesarios para iniciar la replicación en la célula huésped (32).

Tanto el aislamiento de la ADN ligasa en 1967, como el descubrimiento de la primera enzima de restricción en 1970, sentaron las bases para el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante. Las enzimas o endonucleasas de restricción escinden el ADN a partir del reconocimiento de secuencias específicas, y la ADN ligasa es capaz de unir fragmentos de ADN mediante la formación de enlaces covalentes. En otras palabras, las enzimas de restricción y la ligasa son las “tijeras” y el “pegamento” utilizadas durante la manipulación del ADN recombinante.

En 1973, se consiguió finalmente expresar y clonar un fragmento de ADN en *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizando como vector un plásmido bacteriano. Los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario que se transmiten verticalmente de la célula progenitora a la célula hija y pueden replicarse varias veces durante cada ciclo celular (a diferencia del cromosoma bacteriano). Por ello, son vectores ideales para la amplificación del ADN diana. Además, los plásmidos contienen genes de resistencia frente a

antibióticos; esto permite seleccionar las células que contienen el plásmido en un medio de cultivo con dicho antibiótico.

En definitiva, la creación de una molécula de ADN recombinante se realiza a partir de cuatro pasos esenciales: 1) Obtención del fragmento de ADN diana. 2) Unión del fragmento a una molécula que actúa como vector (plásmido bacteriano) 3) Introducción del ADN recombinante en una célula hospedadora para su clonaje 4) Expresión del ADN diana en la célula hospedadora o purificación del ADN clonado (33) (figura 5).

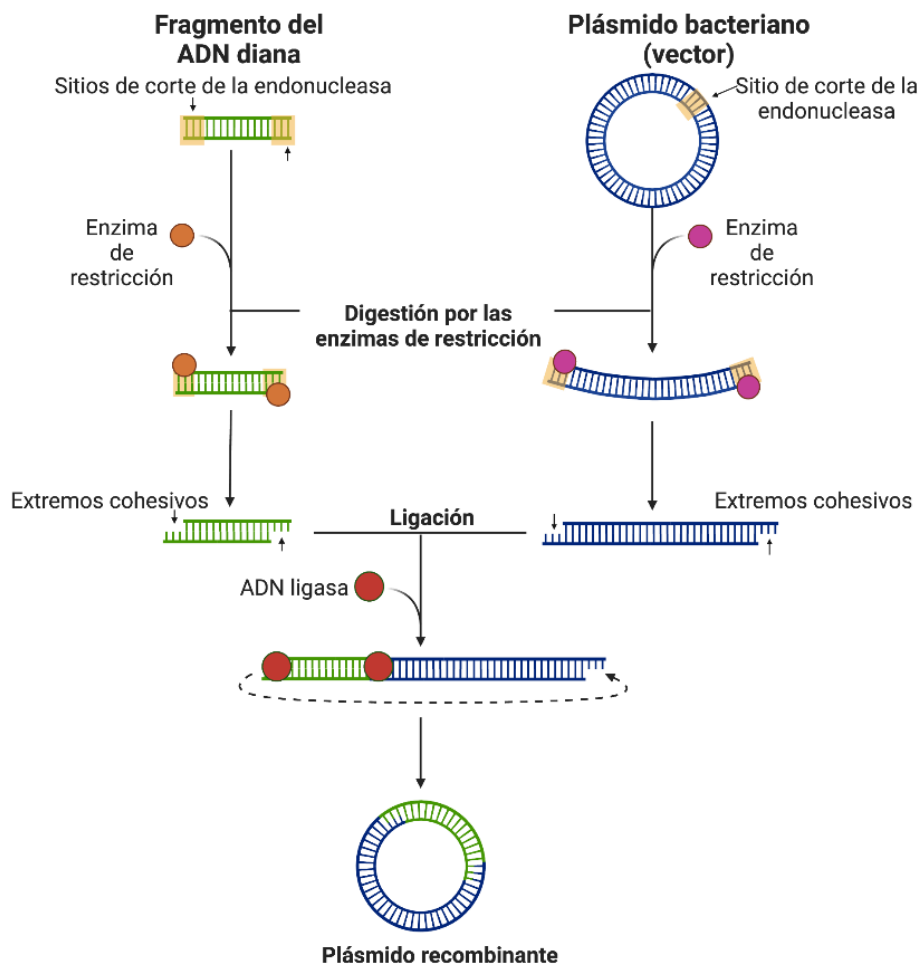


Figura 5. Principios de la tecnología del ADN recombinante. La digestión enzimática mediante endonucleasas de restricción, tanto de la secuencia diana como del vector, genera extremos cohesivos complementarios que son enlazados mediante la acción de la ADN ligasa, creando un plásmido recombinante que posteriormente puede expresarse en una célula huésped. Imagen creada bajo licencia con BioRender.com. Referencia: KJ25E5RX5E.

1.3 El método MoClo de *Golden Gate Assembly* como estrategia de clonaje

Golden Gate Assembly es un método creado en 2008 para elaborar ensamblajes de ADN recombinante circular o plásmidos basado en el uso **enzimas de restricción tipo IIs**, las cuales, a diferencia de las enzimas de restricción clásicas, escinden el ADN en una secuencia adyacente a su sitio de reconocimiento. Esto permite crear un plásmido formado por diferentes fragmentos en una única reacción que combina la restricción del ADN en fragmentos mediante enzimas de restricción de tipo IIs y su ensamblaje mediante la ADN ligasa (34).

La gran ventaja del uso de enzimas de restricción tipo IIs es que permite el clonaje de ADN sin la introducción de secuencias “cicatriz”, generadas cuando coinciden el sitio de reconocimiento y el sitio de corte (como es el caso de las enzimas clásicas de restricción tipo II). Además, la variación del sitio de corte genera extremos cohesivos con diferentes secuencias, lo que posibilita ensamblar fragmentos en un orden predecible.

El método MoClo (*Modular Cloning*), derivado de *Golden Gate Assembly*, es una estrategia de clonaje estandarizado que, además de utilizar enzimas de restricción tipo IIs, clasifica los fragmentos de ADN a ensamblar en “partes” según su función y localización en la molécula de ADN recombinante ensamblada y con el objetivo de generar una unidad transcripcional funcional. Una “parte” se define como una secuencia básica de ADN al que se le puede asignar una función. Por ejemplo, una secuencia codificante, un terminador transcripcional o una región de origen de la replicación. Cada tipo de parte presenta las mismas secuencias flanqueantes complementarias a las partes adyacentes; por ejemplo: todas las “partes 3” tendrán siempre la misma secuencia en sus extremos cohesivos y estos serán complementarios en su región 5’ a la región 3’ de la “parte 2” y en su región 3’ a la región 5’ de la parte 4. Esto permite el intercambio de partes entre sí (siempre que sean del mismo tipo) y su ensamblaje en el orden correcto (figura 6). Otra de las principales ventajas del MoClo radica en que, una vez ensambladas las partes, pueden ser utilizadas directamente para la clonación en diferentes organismos sin necesidad de verificar el correcto ensamblaje mediante secuenciación (35). En el anexo se adjunta la lista de todas las partes disponibles en el *kit* comercial del sistema MoClo. Pueden crearse partes con otras secuencias no disponibles en el *kit* siempre que se le añadan los extremos cohesivos complementarios adecuados; por ejemplo, mediante la

amplificación de la secuencia utilizando *primers* que contengan en sus extremos los nucleótidos adecuados correspondientes a la parte que se busca crear.

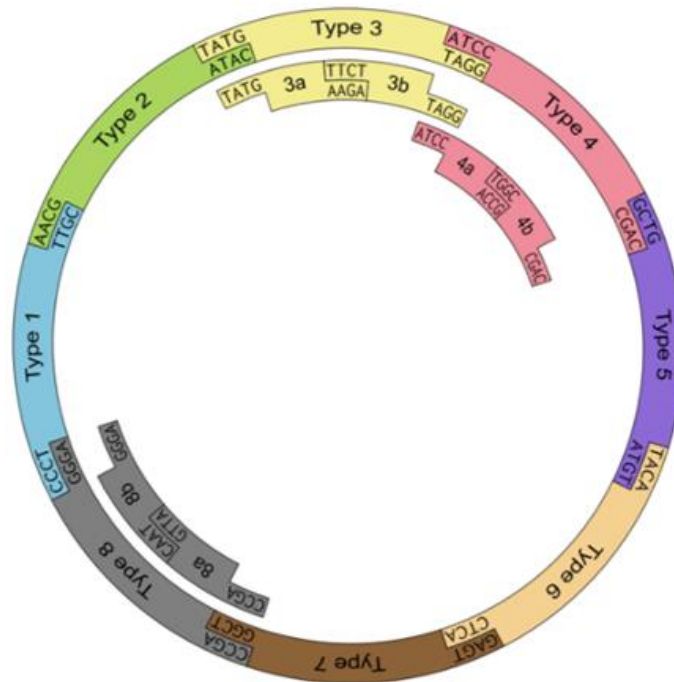


Figura 6. Las diferentes partes se clasifican en ocho tipos según su función y se ensamblan en un orden predecible debido a sus extremos cohesivos complementarios según el tipo de parte, formando un plásmido con una unidad transcripcional funcional. Las partes 3, 4 y 8 pueden escindirse en subpartes (3a, 3b, 4a, 4b, 8a y 8b).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*: un organismo modelo para la virología

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), también conocida como levadura de gemación, es una levadura ascomiceta muy utilizada como modelo en ingeniería genética, ya que es sencilla de cultivar y de manipular genéticamente. De hecho, su genoma fue secuenciado en 1996, convirtiéndose en el primer organismo eucariota cuyo genoma fue conocido de forma completa.

Debido a la homología con el genoma humano y la conservación de rutas bioquímicas fundamentales en organismos eucariotas superiores, *S. cerevisiae* ha sido una pieza clave en el estudio de procesos moleculares como la transcripción del ADN a ARN mensajero, la reparación del ADN, la degradación de ARN mensajero, la apoptosis y el ciclo celular, entre otros (36). Por lo tanto, la levadura de gemación ha sido uno de los modelos de estudio preferido por investigadores galardonados con el premio Nobel, el máximo reconocimiento en investigación (tabla 1) (37).

Tabla 1. Listado de premios Nobel en los que se ha usado *S. cerevisiae* como organismo modelo. En negrita se señalan aquellos investigadores que han trabajado con *S. cerevisiae* cuando ha habido varios galardonados.

Año	Premio Nobel	Descubrimiento	Investigadores
1958	Fisiología y Medicina	Un gen codifica para una proteína	George Beadle y Edward Tatum
1970	Fisiología y Medicina	Transmisores humorales en terminaciones nerviosas sus mecanismos de almacenamiento, liberación e inactivación	Julius Axelrod , Ulf von Euler, and Bernard Katz
1983	Fisiología y Medicina	Elementos genéticos móviles	Barbara McClintock
2001	Fisiología y Medicina	Reguladores claves del ciclo celular	Leland H. Hartwell , Timothy Hunt, and Sir Paul Nurse
2004	Química	Ubiquitinización como mecanismo de degradación de proteínas	Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, and Jack W. Szostak
2009	Fisiología y Medicina	Protección de los telómeros de los cromosomas y la enzima telomerasa	Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, and Jack W. Szostak
2016	Fisiología y Medicina	Mecanismos de autofagia	Yoshinori Ohsumi

S. cerevisiae también ha sido utilizada para el estudio de la biología viral y su efecto en las células eucariotas. Un ejemplo de ello es la expresión individual de proteínas virales en la levadura, dilucidando así sus funciones. En efecto, los primeros estudios sobre la funcionalidad de Vpr fueron realizados en *S. cerevisiae*, observando esa inhibición característica del ciclo celular en fase G2/M. Posteriormente, se corroboraron las observaciones en líneas celulares humanas (38).

Sin embargo, todavía se desconocen con exactitud las dianas moleculares con las que interacciona Vpr (en las diferentes versiones que aparecen de manera natural en el VIH). Por ello, en el presente trabajo se pretende crear un modelo celular que permita el estudio de las dianas moleculares de Vpr, y en particular, una forma corta de Vpr (1-78) que contiene un codón de parada precoz, aislada del clon viral HxBc2 de referencia de un paciente infectado por VIH. Esta secuencia de Vpr HxBc2 es similar a otros clones virales homólogos como BH10 y HxB2. Los estudios funcionales de formas truncadas de Vpr han determinado que es hipofuncional con respecto a la forma más larga de Vpr (1-96) aislada en clones virales de VIH de tipo LAI (denominada BRU, en un principio) o ELI (39–41). La caracterización funcional de esta forma truncada de Vpr es escasa y no se ha estudiado en profundidad. En consecuencia, para analizar el efecto que Vpr (1-78) pudiera

o no ejercer sobre el ciclo celular, se optimizará el método de clonaje MoClo para la expresión de la secuencia de Vpr del genoma HxB2 en *S. cerevisiae*.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

- El método de clonaje basado en el uso de enzimas de restricción tipo IIs es un método rápido y eficaz para la creación de formas recombinantes de Vpr para su estudio en *S. cerevisiae*.
- La región C-terminal de Vpr es importante para inhibir el crecimiento celular. La variante truncada de Vpr HxB2, que posee un codón de parada temprano, tiene afectada su capacidad de inhibición del crecimiento.

2.2 Objetivos

- Optimizar el método MoClo para el clonaje de la proteína Vpr.
- Desarrollar un modelo celular usando *S. cerevisiae*, que permita estudiar dianas moleculares de Vpr (u otras proteínas de interés) de manera rápida y eficaz.
- Observar la capacidad inhibitoria de Vpr del clon viral HxB2 sobre el ciclo celular de *S. cerevisiae* y determinar su localización celular.

3. Materiales y métodos

3.1 Células

- Bacterias:

Para la amplificación y purificación de los plásmidos se utilizó la cepa Stbl3™ de *E. coli* cuyo genotipo es F-mcrB mrrhsdS20 (r_B⁻, m_B) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ-leumtl-1.

- Levaduras:

Para la expresión de la proteína Vpr de estudio, mediante el ensamblaje completo de todas las partes en un único plásmido, se utilizaron siete cepas diferentes de *S. cerevisiae*, las cuales se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio.

Nombre	Origen	Genotipo
YPH499	Laboratorio de Luis Aragón	<i>MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
W303	Laboratorio de Luis Aragón	<i>MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}</i>
JG722	Este trabajo	{YPH499} Plásmido centromérico Gal-Vpr:URA
JG723	Este trabajo	{YPH499} Plásmido centromérico Gal-Vpr:URA
JG724	Este trabajo	{YPH499} Plásmido centromérico Gal-Vpr:URA
JG725	Este trabajo	{YPH499} Plásmido centromérico Gal-Vpr:URA
JG726	Este trabajo	{YPH499} Plásmido centromérico Gal-Vpr Venus:URA

3.2 Plásmidos

Se manejaron un total de veinte plásmidos, diez provenientes del *kit* comercial del método MoClo (tabla 3) y diez de nueva creación (tabla 4). Además, se utilizó para los experimentos de inhibición del crecimiento como plásmido vacío y control positivo, el plásmido pR316, que solo contiene el gen URA3, el cual participa en la ruta metabólica de la síntesis de uracilo.

Tabla 3. Listado de plásmidos del *kit* de MoClo utilizados en este estudio.

Plásmidos del <i>kit</i> comercial de MoClo	Nombre de la parte que contienen	Tipo de parte	Descripción
pYTK003	ConL1	1	Conector de ensamblaje con una secuencia de reconocimiento para BsmBI.
pYTK030	pGAL1	2	Promotor de la transcripción inducido por galactosa.
pYTK053	tADH1	4	Terminador de la transcripción.
pYTK058	Venus	4a	Proteína fluorescente para marcar a la proteína diana.
pYTK063	tADH1	4b	Terminador de la transcripción.
pYTK067	ConR1	5	Conector de ensamblaje que contiene una secuencia de reconocimiento para BsmBI.
pYTK074	URA3	6	Gen que codifica para uracilo. Se utiliza como presión selectiva de cultivos de levaduras en un medio sin uracilo, ya que permite seleccionar las

			colonias con capacidad de síntesis de este aminoácido.
pYTK081	CEN6/ARS4	7	Secuencia centromérica (CEN6) y origen de replicación (ARS4) en <i>S. cerevisiae</i> .
pYTK083	AmpR- ColE1	8	Origen de replicación en bacterias y gen de resistencia a la ampicilina. El resto del plásmido contiene el gen de proteína roja fluorescente (RFP), lo que sirve como marcador que indica un correcto ensamblaje.
pYTK001	<i>Entry vector</i>	-	Vector para la secuencia codificante de la proteína Vpr; contiene secuencias de reconocimiento para BsmBI, un gen de proteína verde fluorescente (GFP), una secuencia de inicio de la replicación en <i>E. coli</i> (ColE1) y un gen de resistencia a cloranfenicol (CamR).

Tabla 4. Listado de plásmidos creados.

Código según base de datos creada en este trabajo	Tipo de plásmido	Partes
EVJ46	Secuencia codificante domesticada de Vpr (1-78) procedente del genoma HxB2 con el codón de parada precoz.	Vector entrante con la secuencia codificante de la versión natural truncada de la proteína Vpr del aminoácido 1 al 78
EVJ47	Secuencia codificante domesticada de Vpr (1-78) procedente del genoma HxB2 sin el codón de parada precoz.	Vector entrante con la secuencia codificante de la versión natural truncada (sin el codón de parada precoz y los nucleótidos posteriores) de la proteína Vpr del aminoácido 1 al 78. Esta secuencia tiene puede utilizarse para marcar Vpr con una proteína fluorescente.

EVJ48	Secuencia codificante domesticada de Vpr (1-96) procedente del genoma NL4-3.	Vector entrante con la secuencia codificante de la versión natural del genoma NL4-3 de la proteína Vpr del aminoácido 1 al 96.
EVJ49	Secuencia codificante domesticada de Vpr (1-78) procedente del genoma del aislado viral NL4-3.	Vector entrante con la secuencia codificante de la versión natural del genoma NL4-3 de la proteína Vpr del aminoácido 1 al 78.
EVJ56	Centrosómico; versión HxB2 de la proteína Vpr no marcado con proteína fluorescente	ConL1, pGAL1, Vpr clon A, tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1
EVJ70	Centrosómico; versión HxB2 de la proteína Vpr marcada con la proteína fluorescente Venus	ConL1, pGAL1, Vpr (1-78), Venus, tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1
EVJ71	Centrosómico; versión NL4-3 corta de la proteína Vpr no marcada con proteína fluorescente Venus	ConL1, pGAL1, Vpr (1-78), tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1
EVJ72	Centrosómico; versión NL4-3 larga de la proteína Vpr no marcada con proteína fluorescente	ConL1, pGAL1, Vpr (1-96), tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1
EVJ72	Centrosómico; versión NL4-3 corta de la proteína Vpr marcada con la proteína fluorescente Venus	ConL1, pGAL1, Vpr (1-78), Venus, tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1
EVJ73	Centrosómico; versión NL4-3 larga de la proteína Vpr marcada con la proteína fluorescente Venus	ConL1, pGAL1, Vpr (1-96), Venus, tADH1, ConR1, URA3, CEN6/ARS4, AmpR-Cole1

3.3 Gen de Vpr

Se utilizaron cuatro secuencias diferentes de ADN provenientes de los genomas del clon viral del VIH-1 HxB2 (K03455.1 en *GenBank*) y del aislado viral de VIH-1 NL4-3 (AF324493.2 en *GenBank*). Se especifica en la tabla 5 las características de cada una.

Tabla 5. Diferentes secuencias de Vpr.

Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos	Descripción
<p>ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAA GGGCCACAGAGGGAGCCACACAAT GAATGGACACTAGAGCTTTTAGAG GAGCTTAAGAATGAAGCTGTTAGA CATTTTCCTAGGATTTGGCTCCATG GCTTAGGGCAACATATCTATGAAA CTTATGGGGATACTTGGGCAGGAG TGGAAGCCATAATAAGAATTCTGC AACAACTGCTGTTTATCCATTTTCA GAATTGGGTGTCGACATAGCAGAA TAGGCGTTA</p>	<p>MEQAPEDQGP QREPHNEWTLE LLEELKNEAVR HFPRIWLHGLG QHIYETYGDT WAGVEAIIRIL QQLLFIHFQNW VST</p>	<p>Secuencia que proviene del genoma HxB2 que codifica una proteína Vpr truncada (1-78), debido a una mutación <i>nonsense</i> o “sin sentido”, la cual resulta en codón de parada precoz (se señala en negrita). Esto impide que pueda ser marcada con una proteína fluorescente. Además, esta secuencia ha sido optimizada para su expresión en levaduras.</p>
<p>ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAA GGGCCACAGAGGGAGCCACACAAT GAATGGACACTAGAGCTTTTAGAG GAGCTTAAGAATGAAGCTGTTAGA CATTTTCCTAGGATTTGGCTCCATG GCTTAGGGCAACATATCTATGAAA CTTATGGGGATACTTGGGCAGGAG TGGAAGCCATAATAAGAATTCTGC AACAACTGCTGTTTATCCATTTTCA GAATTGGGTGTCGACA</p>	<p>MEQAPEDQGP QREPYNEWTLE LLEELKSEAVR HFPRIWLHNLG QHIYETYGDT WAGVEAIIRIL QQLLFIHFRIGC RHSRIGVTRQR RARNGASRS</p>	<p>Se trata de una secuencia similar a la anterior que no presenta el codón de parada precoz ni los nucleótidos posteriores a él. Por ello, tras su traducción se obtiene la misma secuencia de aminoácidos. Esta versión puede ser marcada con una proteína fluorescente.</p>
<p>ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAA GGGCCACAGAGGGAGCCATAACAAT GAATGGACACTAGAGCTTTTAGAG GAACTTAAGAGTGAAGCTGTTAGA CATTTTCCTAGGATATGGCTCCATA ACTTAGGACAACATATCTATGAAA CTTACGGGGATACTTGGGCAGGAG TGGAAGCCATAATAAGAATTCTGC AACAACTGCTGTTTATCCATTTTCA</p>	<p>MEQAPEDQGP QREPYNEWTLE LLEELKSEAVR HFPRIWLHNLG QHIYETYGDT WAGVEAIIRIL QQLLFIHFRIGC RHSRIGVTRQR RARNGASRS</p>	<p>Secuencia que proviene del genoma NL4-3 dando lugar a una secuencia de aminoácidos más larga (1-96) que puede ser marcada con proteína fluorescente.</p>

AATTGGGTGTCGACATAGCAGAAT AGGCGTTACTCGACAGAGGAGAGC AAGAAATGGAGCCAGTAGATCC		
ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAA GGGCCACAGAGGGAGCCATAACAAT GAATGGACACTAGAGCTTTTAGAG GAACTTAAGAGTGAAGCTGTTAGA CATTTTCCTAGGATATGGCTCCATA ACTTAGGACAACATATCTATGAAA CTTACGGGGATACTTGGGCAGGAG TGGAAGCCATAATAAGAATTCTGC AACAACTGCTGTTTATCCATTTAG AATTGGGTGTCGAC	MEQAPEDQGP QREPYNEWTLE LLEELKSEAVR HFPRIWLHNLG QHIYETYGDT WAGVEAIIRIL QQLLFIHFRIGC RX	Secuencia similar a la anterior que codifica para una proteína de la misma longitud que las versiones derivadas del clon de VIH-1 HxB2 (1-78) Sin embargo, sus últimos seis aminoácidos son diferentes, ya que no presenta la mutación <i>nonsense</i> en su genoma. Esta versión puede ser marcada con proteína fluorescente.

3.4 Medios de cultivo y antibióticos

El medio de cultivo empleado para *E. coli* fue el medio de Luria-Bertani (LB) cuya composición se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Composición del medio LB para el cultivo de *E. coli*.

Ingrediente	Cantidad para 1 litro
Triptona	10 gramos
Cloruro sódico	10 gramos
Extracto de levadura	5 gramos
Agar	20 gramos
Agua	Enrasar a 1 litro

Para el cultivo de *S. cerevisiae* se emplearon dos medios: el medio rico YP y medio sintético sin cinco aminoácidos (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Composición del medio rico YP.

Medio rico YP	
Ingrediente	Cantidad para 1 litro
Peptona	20 gramos
Extracto de levadura	10 gramos
Agar	20 gramos
Agua	Enrasar a 1 litro

Tabla 8. Composición del medio sintético sin 5 aminoácidos.

Medio sintético sin 5 aminoácidos (medio mínimo -5)	
Base de nitrógeno para levaduras (YNB)	6.7 gramos
Mezcla <i>drop-out</i> (sin adenina, histidina, leucina, triptófano y uracilo)	1.37 gramos
Agar	20 gramos
Agua	Enrasar a 1 litro

Los antibióticos utilizados para mantener la presión selectiva en el medio fueron ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y espectomicina en las concentraciones indicadas en la tabla 9.

Tabla 9. Antibióticos utilizados para mantener presión selectiva en los medios de cultivo.

Antibióticos		
	Concentración <i>stock</i>	Concentración final
Ampicilina	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamicina	50 mg/ml	50 µg/ml
Cloranfenicol	20 mg/ml	20 µg/ml
Espectomicina	100 mg/ml	100 µg/ml

Las fuentes de carbono usadas para el cultivo de *S. cerevisiae* han sido **glucosa** al 2% **galactosa** al 2% o **rafinosa** al 2%.

3.5 Reacción en cadena de la polimerasa y *primers*

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen de la proteína Vpr. Para la PCR se preparó una solución de 50µL con buffer HF (10µL), dNTP (1µL), *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (0,5µL), *primer forward* (2,5µL), *primer reverse* (2,5µL), secuencia de Vpr (1µL) y agua Milli-Q® autoclavada¹ (32,5µL), y se introdujo en el termociclador siguiendo el programa que se indica en la figura 7.

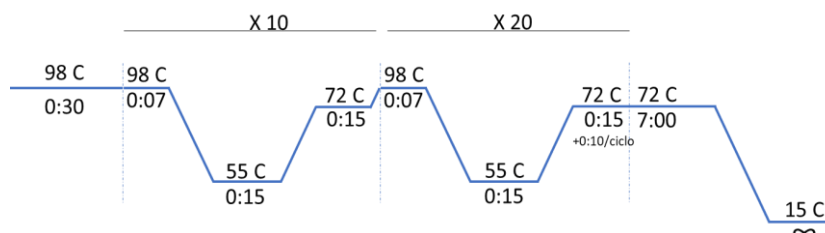


Figura 7. Condiciones seguidas en el termociclador para la PCR de Vpr.

Los *primers* se generaron utilizando la herramienta *Yeast Toolkit Primer Design Tool* (41) y se caracterizan por presentar secuencias compatibles con los extremos de las partes 3, para ser complementarias a los extremos de las partes 2 y 4. Se eliminó el codón de inicio ATG, ya que los *primers* generados lo incluyen, y se comprobó que no hubiese ninguna diana interna para BsaI o BsmBI. Se indican todas las secuencias en dirección 5'-3'.

Tabla 10. *Primers* utilizados para la amplificación de las diferentes secuencias de Vpr. Se marcan en azul las secuencias necesarias para la generación de extremos compatibles con las partes 3, en verde las secuencias de reconocimiento de BsmBI, enzima utilizada para la domesticación de partes en el sistema MoClo y en naranja las secuencias de reconocimiento de BsaI, utilizada para el ensamblaje de todas las partes.

<i>Primer forward</i>	gcatc gtctc atc ggtctc at atg GAACAAGCCCCAGAAGAC	
<i>Primers reverse</i>	Vpr versión HxB2 con codón de parada precoz	atg ccgtctc aggctc aggatcc TAACGCCTATTCTGCTATGTC
	Vpr versión HxB2 sin codón de parada precoz	atg ccgtctc aggctc aggatcc TGTCGACACCCAATTCTG
	Vpr versión NL4-3 corta	atg ccgtctc aggctc aggatcc GTCGACACCCAATTCTGA
	Vpr versión NL4-3 larga	atg ccgtctc aggctc aggatcc GGATCTACTGGCTCCATT

¹ Se trata de agua ultrapura esterilizada en condiciones de autoclave: 120° C durante 20 minutos a una presión de 1 atmósfera.

3.6 Enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas de tipo IIs para el ensamblaje de partes con el sistema MoClo y enzimas de restricción tipo II para la comprobación de este correcto ensamblaje mediante electroforesis tras un proceso de digestión de las muestras de ADN.

Tabla 11. Listado de enzimas de restricción utilizadas en este estudio y sus características.

Tipo de enzima	Enzima	Descripción
IIs	BsmBI y BsmBI-v2 (NEB®)	Se utilizan para la domesticación de la parte 3 y el diseño de partes nuevas. En este trabajo, también se ha utilizado para la digestión del plásmido recombinante completo. Secuencia de reconocimiento: CGTCTC(N) ₁ GCAGAG(N) ₅
	BsaI (NEB®)	Se utiliza para ensamblar todas las partes en un único plásmido listo para ser transcrito. Secuencia de reconocimiento: GGTCTC(N) ₁ CCAGAG(N) ₅
II	NotI (Takara®)	Condiciones para su rendimiento óptimo: buffer H+BSA+Triton X-100 y 37° de temperatura. Secuencia de reconocimiento y corte: GC GGCCGC CGCCGG CG
	HindIII (NEB®)	Condiciones para su rendimiento óptimo: buffer 2.1 y 37° de temperatura. Secuencia de reconocimiento y corte: A AGCTT T TCGA A
	EcoRI (Takara®)	Condiciones para su rendimiento óptimo: buffer H y 37° de temperatura. Secuencia de reconocimiento y corte: G AATTC CTTAA G
	Bgl II (Takara®)	Condiciones para su rendimiento óptimo: buffer H y 37° de temperatura. Secuencia de reconocimiento y corte: A GATCT TCTAG A

3.6.1 Digestión con enzimas de restricción tipo II

Se mezclaron 5 µL de ADN (plásmidos recombinantes), 0,5 µL de enzima de restricción, 2 µL de la solución *buffer 10x* adecuada para la enzima de restricción empleada y 12,5 µL de agua estéril en un tubo de microcentrífuga, obteniendo un volumen final de 20 µL.

Se dejó incubar la muestra a 37° (temperatura óptima de las enzimas de restricción empleadas) durante 30 minutos-1 hora.

3.7 Domesticación de la parte 3

La domesticación consiste en la creación del plásmido que contiene la secuencia génica de Vpr HxB2 (parte 3) utilizando pYTK-001 como vector. Para este proceso se utilizó 1 µL de pYTK-001, 1 µL del ADN diana (la secuencia de Vpr) amplificada según se detalla en el punto 3.3, 1 µL de T4 ligasa, 2 µL de *T4 DNA ligase buffer* (Takara®), 1 µL de BsmBI o BsmBI v2 y 14 µL de agua Milli-Q® autoclavada, obteniendo una solución de 20 µL. Posteriormente, se introdujo la muestra en el termociclador según las condiciones indicadas en *BarrickLab* (42) (tabla 12).

Tabla 12. Programa utilizado en el termociclador para la domesticación de la parte 3.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1	42° C	1, 30 min
2	16° C	3 min
Repetir 1 y 2 (25 veces)		
3	50° C	5 min
4	80° C	10 min

3.8 Ensamblaje del plásmido recombinante multiparte

Para realizar el ensamblaje del plásmido completo se preparó una solución que contenía una cantidad optimizada de cada parte (según se indica en el punto 4.2 de resultados) , 1µL de T4 ligasa, 2µL de *T4 DNA ligase buffer*, 1µL BsaI-HFv2 o BsaI, y un volumen restante de agua Milli-Q® autoclavada hasta alcanzar 20 µL. Se introdujo la muestra final en el termociclador según el protocolo que se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Programa utilizado en el termociclador para el ensamblaje del plásmido multiparte.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1	37°C	1.5 min
2	16°C	3 min
Repetir 1 y 2 (30 veces)		
3	37°C	5 min
4	60°C	10 min

3.9 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

3.9.1 Preparación del gel de agarosa

Se mezcló 0,5 g de agarosa con 50 mL de *buffer* TAE 1X (formado por 0,04 M de tris-acetato y 1 mM de EDTA) en un matraz Erlenmeyer y se calentó hasta obtener una solución homogénea. Tras enfriar la solución mojando el exterior del matraz con agua fría, se le añadió 0,5 µL de *GelRed® Nucleic Acid Stain* 10.000X y se vertió en la cubeta de electroforesis con los peines adecuados para obtener el número de pocillos deseados. Se dejó solidificar la solución obteniendo una consistencia gelificada.

3.9.2 Preparación de las muestras de ADN

Se mezcló el ADN diana (ya digerido anteriormente con las correspondientes enzimas de restricción) con *Nucleic Acid Loading Buffer 5X* (30 % glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 0.3% SDS, 6mM EDTA). Posteriormente, se introduce un volumen de muestra oscilante entre 5µL y 20µL en cada pocillo.

3.10 Transformación de *E. coli*

Se sacó un vial de *E.coli* químicamente competente OneShot™Stb13™ del congelador a -80° y se mantuvo en hielo en el exterior durante 30 minutos para que se descongele el vial, antes de comenzar la transformación. Se añadió 25µL de las bacterias en un tubo de microcentrífuga, se mezcló con 2,5µL de ADN y se dejó incubar durante otros 30 minutos en hielo. Posteriormente, se realizó un choque térmico colocando el tubo en un flotador que se depositó en un baño de agua a 42° durante 45 segundos. Pasado ese tiempo, se colocó el tubo en hielo durante 2 minutos más. Después, se añadió al tubo 250µL de medio S.O.C, compuesto por un 2% de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa. Se incubó de forma horizontal a 37° y 225 rpm durante 1 hora. Finalmente, se extrajo un volumen de 100µL de la solución de bacterias transformadas y se incubaron 12 horas a 37° en una placa con medio LB con el antibiótico correspondiente para la selección del plásmido usado en la transformación.

3.11 Purificación de ADN

Mediante este procedimiento se obtienen los plásmidos recombinantes tras ser clonados en cultivos de *E. coli*. Se utilizaron dos protocolos diferentes de purificación: *QIAprep®*

Spin Miniprep Kit de *Qiagen* y *Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit* del laboratorio *iNtRON Biotechnology*.

3.11.1 Protocolo *Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit*

Para empezar, se introdujo 4 - 5 mL de bacterias en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C en un rotor basculante. a temperatura ambiente y posteriormente, se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 150 µL de *Resuspension Buffer* y se mezcló (con la pipeta o realizando un vórtex) y se transfirió a un tubo de 1.5 mL de micocentrífuga. Se añadió 150 µL de *Lysis Buffer* y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta que la solución se volvió viscosa y de color blanquecino. Después, se añadió 350 µL de *Neutralization Buffer*, se mezcló rápidamente invirtiendo el tubo de 12 a 20 veces (adquiriendo un aspecto nuboso) y se centrifugó durante 5 minutos a 15.000 rpm a 20°C. Se transfirió el sobrenadante a una columna de centrifugación que se introdujo dentro de un tubo colector y se centrifugó de nuevo durante 30 segundos a 12.000 rpm a 20°C; tras descartar el líquido del tubo colector, se volvió a introducir la columna de centrifugación en su interior. Posteriormente, se añadió 300 µL de *Washing Buffer* en la columna de centrifugación y se repitió el procedimiento anterior. Se centrifugó de nuevo 1 minuto a 12.000 rpm a 20°C para eliminar los posibles restos del *Washing Buffer*. Acto seguido, se introdujo la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga Eppendorf, se añadió 50 µL de agua Milli-Q autoclavada y se centrifugó durante 30 segundos a 12.000 rpm. Finalmente, tras desechar las columnas de centrifugación, el tubo de microcentrífuga Eppendorf contiene la solución con el ADN purificado.

3.11.2 Protocolo *QIAprep® Spin Miniprep Kit* de *Qiagen*

Se inocularon 5 ml de medio YP en la cepa bacteriana y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 250 µL de tampón P1 y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Posteriormente, se añadieron 250 µL de solución tampón P2 y se mezcló invirtiendo el tubo unas 12 veces hasta que la solución se volvió completamente azul. Se incubó estrictamente durante 5 minutos. Después, se añadió 350 µL de tampón N3 y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo de nuevo unas 12 veces hasta que la solución se volvió incolora. Seguidamente, se centrifugó durante 10 minutos. Se introdujo el sobrenadante en la columna de centrifugación *QIAprep* con la pipeta, se centrifugó

durante 60 segundos y se desechó lo filtrado. Luego se lavó la columna de centrifugación *QIAprep* añadiendo 500 μ l de tampón PB y se centrifugó de nuevo 60 segundos. Se lavó de nuevo la columna de centrifugación *QIAprep* tras añadir 750 μ l de tampón PE y se centrifugó 60 segundos, después se transfirió la columna de centrifugación *QIAprep* al tubo de recogida. Se centrifugó de nuevo durante 1 minuto para eliminar el tampón de lavado residual. Se colocó la columna de centrifugación *QIAprep* en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Finalmente, para diluir el ADN, se añadieron 60 μ l de tampón EB (10 mM Tris CI, pH 8,5) en el centro de la columna de centrifugación *QIAprep*, se dejó reposar durante 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto más.

3.12 Espectrofotometría

Se utilizó un espectrofotómetro nano-drop para cuantificar la concentración de ADN basado en la absorbancia de la luz en muestras líquidas de ADN a 260 nm así como los ratios 260/280 y 260/230 para determinar su pureza. Se utilizó un espectrofotómetro de cubetas para determinar la densidad óptica de levaduras a 660nm. Para las mediciones se requiere agua Milli-Q® autoclavada (como referencia de concentración cero en las mediciones de ADN) o medio de cultivo de levaduras (como referencia de concentración cero en las mediciones de densidad óptica de levaduras) y papel de arroz para limpiar el detector entre cada muestra a medir en el nano-drop.

3.13 Transformación de *S. cerevisiae*

Se sacó un vial de *S. cerevisiae* químicamente competentes de la congelación a -80°C y se mantuvo fuera en hielo durante el resto de procedimientos. Se añadió 10 μ L de ADN en 50 μ L de levaduras y se mezcló bien con la pipeta. Se añadió un volumen de PEG (solución de polietilenglicol que contiene 100 mM de acetato de litio, 10 mM de Tris-HCl y un 40% PEG3350) 6 veces superior al volumen de la mezcla anterior y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1/9 del volumen de la solución anterior de DMSO (dimetilsulfóxido) y se mezcló con la pipeta. Después, se realizó un choque térmico colocando el tubo en un flotador que se introdujo en un baño de agua a 42°C durante 15 minutos, tras lo cual se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 150 μ L de medio y se extendió en placas de agar.

3.14 Ensayos de inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*

Para realizar los ensayos de inhibición del crecimiento, se dejaron crecer las cepas de levadura toda la noche en medio selectivo -Ura (medio -5 al que se le han añadido los aminoácidos adenina, histidina, leucina y triptófano, pero se ha mantenido la ausencia de uracilo) a 37°C y 180 rpm. Al día siguiente, se midió la concentración de células en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Se ajustaron las concentraciones de todas las cepas a la misma densidad óptica y se realizaron 5 diluciones seriadas (1/1, 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000) en una placa de 96 pocillos y se trasladaron las células a placas de agar sólido con un replicador.

3.15 Inducción de la expresión de Vpr (HxB2)-Venus y su detección por microscopía óptica

Se dejaron crecer las células toda la noche a 160 rpm y 30°C en el medio -Ura, en presencia de rafinosa al 2% como fuente de carbono y suplementado con adenina al 0,02 mg/mL. El medio sin uracilo actúa como presión selectiva, ya que solo crecen las levaduras con el plásmido episomal que codifica para Vpr (HxB2)-Venus (que se llamará Vpr-Venus) y contiene el gen URA3, el cual codifica para el uracilo. La rafinosa mantiene el promotor dependiente de galactosa en un estado “no inducido” y la adenina disminuye la autofluorescencia de las células. A la mañana siguiente, se sedimentaron las células en la centrífuga con un rotor basculante 5 minutos a 2000 rpm. Se retiró el medio sintético por decantación y se añadió el mismo volumen de medio rico YP en presencia de rafinosa al 2% y adenina a 0.02 mg/ml. Tras 3 horas de incubación a 160 rpm y 30°C, se añadió galactosa para inducir la expresión de Vpr-Venus y, transcurridas 5 horas, se observaron las células al microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200 utilizando un filtro específico para detectar proteína amarilla fluorescente.

Para determinar la localización de Vpr HxB2, es decir, el compartimento celular en el que Venus emite señal, las células fueron permeabilizadas con etanol al 40% y teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que marca específicamente el ADN, pudiendo observar si la proteína se encuentra en el núcleo o fuera de él.

Se fotografió lo observado con una cámara Hamamatsu Image-EM tras 0.2 segundos de exposición con un objetivo Plan-FLUAR 100X /1.45.

4. Resultados

4.1 Optimización de MoClo para la creación de plásmidos recombinantes de expresión en *S. cerevisiae*

De cara a establecer un sistema sencillo y rápido para la expresión de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*, como es en este caso la proteína Vpr del clon viral HxB2, se procedió a optimizar e implementar el método MoClo basado en el sistema de clonaje *Golden Gate*. Para ello, se seleccionó la secuencia de Vpr procedente del genoma de referencia HxB2, que se caracteriza por tener un codón de parada precoz, dando como resultado una versión de Vpr truncada. *In vivo*, el virus VIH-1 con el genoma HxB2 presenta una menor capacidad infectiva. Sin embargo, la caracterización molecular de esta variante de Vpr de manera aislada ha sido escasa, a pesar de la información que puede aportar acerca del papel de las diferentes variantes naturales de Vpr en la infectividad y replicación viral.

Con el objetivo de expresar de manera controlada la proteína Vpr HxB2 en levaduras, se comienza amplificando el gen mediante PCR utilizando *primers* compatibles con la domesticación de una secuencia codificante (parte 3) (puntos 3.3 y 3.5) y se combina con el vector pYTK001, dando como resultado un nuevo plásmido recombinante (secuencia de Vpr + pYTK001) (figura 8).

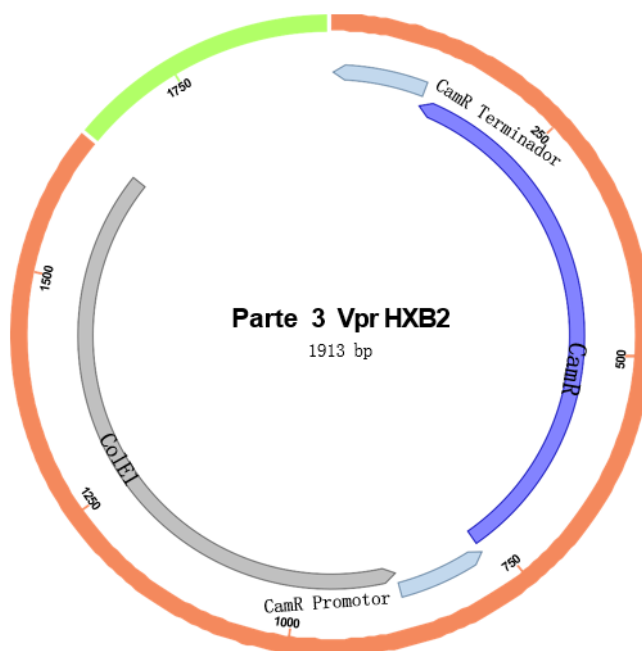


Figura 8. Plásmido resultante de la domesticación de la parte 3. La secuencia de Vpr HxB2 se marca en verde (como sustitución de la GFP). El resto del plásmido, correspondiente al vector pYTK001, está constituido por la secuencia de inicio de la replicación en *E. coli* (ColE1) y el gen de resistencia a cloranfenicol (CamR), que permite mantener presión selectiva en un medio de cultivo con este antibiótico, permitiendo la proliferación únicamente de las bacterias que presentan este plásmido.

Posteriormente, se transforma *E. coli* (punto 3.8) con el plásmido resultante y, mediante la proliferación bacteriana en medios de cultivo, también se obtiene mayor cantidad de copias del plásmido. Se purifican los plásmidos de diferentes colonias bacterianas (punto 3.9) y se combinan con los adecuados del *kit* de MoClo (previamente también amplificados en *E. coli* y purificados), ensamblando así plásmidos multiparte con unidades transcripcionales funcionales para su expresión en levaduras (punto 3.6) (figura 9). Se realizaron electroforesis de los plásmidos (parte 3 domesticada y plásmidos multiparte) tras previa digestión con enzimas de restricción para observar si el ensamblaje se ha producido correctamente (punto 3.4).

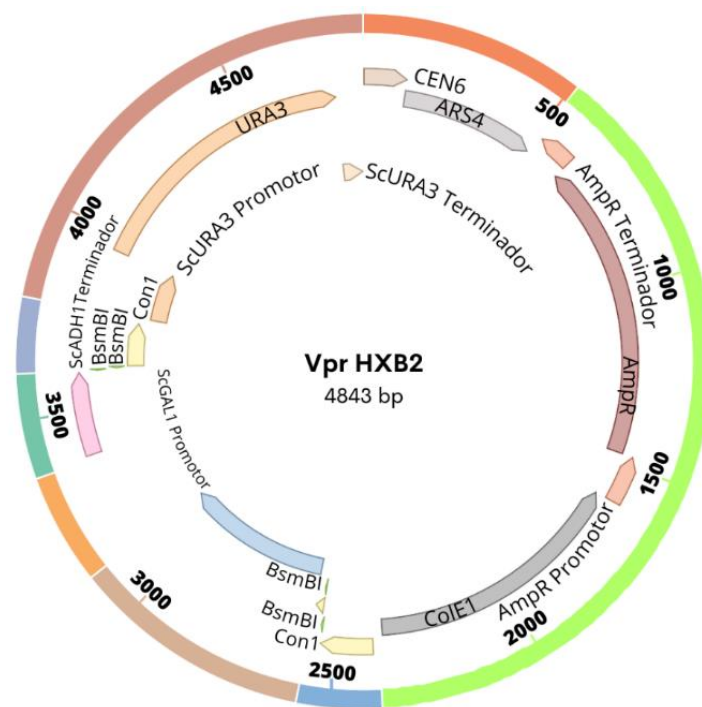


Figura 9. Plásmido recombinante con todas las partes necesarias para su expresión en *S. cerevisiae*.

El siguiente procedimiento consiste en la transformación de *S. cerevisiae* (punto 3.11) y la realización de los experimentos de inhibición del crecimiento mediante diluciones seriadas (punto 3.12). Finalmente, se observa la localización celular de la proteína mediante microscopía óptica (punto 3.13).

A continuación, se detallan los resultados obtenidos con aspectos necesarios para la optimización de procedimientos con la finalidad de conseguir su mayor rendimiento. Esto se traduce, por ejemplo, en una mayor cantidad y mejor calidad de plásmidos o una mayor cantidad de células transformantes positivas.

Es importante tener en cuenta que todos los resultados mostrados se han obtenido utilizando la secuencia de Vpr del genoma HxB2. Para la microscopía óptica se utilizó la secuencia sin el codón de parada precoz para poder enlazarla con la secuencia de la proteína fluorescente Venus, para lo que se creó un nuevo plásmido recombinante multiparte. También se crearon plásmidos multiparte con las secuencias del aislado viral NL4-3 para ser utilizados en futuros experimentos con el fin de observar si existen diferencias entre las versiones truncadas (HxB2) y las no truncadas del genoma NL4-3 en cuanto a la inhibición del crecimiento celular.

4.1.1 Optimización de la domesticación de la parte 3

La domesticación de partes implica la amplificación de la secuencia a domesticar mediante PCR con *primers* con extremos adecuados, para su posterior clonaje en el vector de entrada pYTK001 mediante la enzima de restricción tipo IIs BsmBI. Existen dos variantes comerciales de esta enzima, conocidas como BsmBI y BsmBI-v2. Según los proveedores, BsmBI-v2 está optimizada para el clonaje mediante MoClo con respecto a BsmBI, y ofrece ventajas como la rápida digestión del ADN (entre 5 y 15 minutos) sin provocar su degradación si se supera este tiempo, pudiendo alcanzarse hasta varias horas sin que se afecte a la especificidad de corte por la enzima. En primer lugar, se estudió el efecto que tienen estas variantes en la eficiencia del clonaje, por lo que el procedimiento de domesticación de la parte 3 se realizó dos veces utilizando tanto BsmBI como BsmBI-v2. Paradójicamente, en ambos **casos se obtuvieron más colonias positivas con BsmBI** que con BsmBI-v2, consiguiendo un 25% de colonias positivas frente a un 2%, respectivamente. Se reconocen las colonias positivas (las que han integrado el plásmido recombinante) porque no emiten luz verde fluorescente, ya que la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) presente en el plásmido pYTK001 es sustituida por la secuencia diana, según se observa en la figura 10. Se muestra en la figura 11 una placa de agar con colonias de *E.coli* tras su transformación con los plásmidos domesticados con la secuencia de Vpr (parte 3) visualizada en un transiluminador para detectar las colonias fluorescentes.

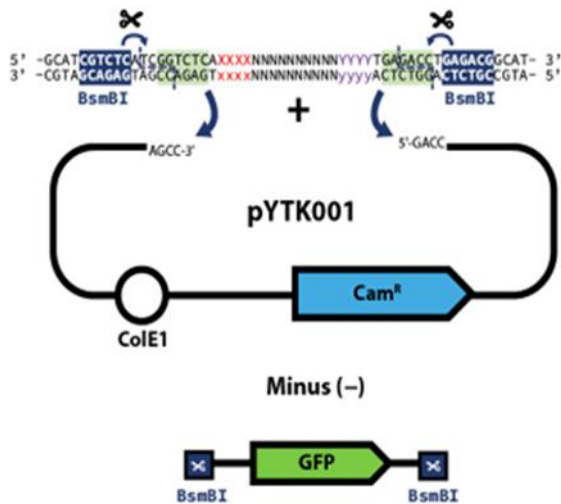


Figura 11. Mecanismo por el que se elimina la secuencia de la GFP y se sustituye por la secuencia diana. Ambas secuencias presentan en sus extremos sitios de reconocimiento para BsmBI, la cual escinde el ADN originando extremos cohesivos complementarios, debido a que la secuencia diana ha sido amplificada con primers adecuados para generar extremos complementarios al plásmido, y característicos de las partes tipo 3 del método MoClo, tras la escisión de la GFP.

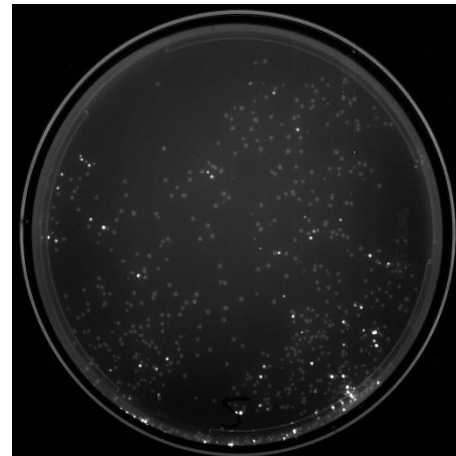


Figura 10. Placa con colonias de *E. coli* transformadas con los plásmidos domesticados con la secuencia de Vpr observadas al transiluminador. Se observa la fluorescencia de las colonias que presentan plásmidos en los que no se ha producido la domesticación de Vpr de forma adecuada, ya que se observa la fluorescencia emitida por la GFP (no se observa de color verde porque la cámara utilizada realiza las fotografías en blanco y negro).

4.1.2 Verificación del plásmido domesticado

Tras aislar y dejar crecer las colonias positivas, se extrajeron los plásmidos que contenían para su comprobación mediante patrones de restricción esperados en un gel de electroforesis. Se eligió la enzima de restricción tipo II EcoRI, ya que produce un número de cortes suficientes para poder establecer si la domesticación de Vpr en el plásmido pYTK001 es correcta.

En la figura 12A, se observa una simulación de electroforesis realizada con la herramienta *Benchling* que muestra el patrón de bandas de ADN esperado tras la digestión del plásmido recombinante con la enzima EcoRI, el cual consiste en una única banda situada entre 2 y 1,6 kilobases (kb). En la figura 12B, se presenta la electroforesis real en la que se digieren los plásmidos purificados de tres colonias diferentes de *E. coli* (A, B y C). Además, también se digiere con la misma enzima el vector pYTK001, observando que no se reproduce el patrón de bandas esperado, ya que el vector no posee el sitio de reconocimiento y corte de EcoRI, a diferencia de la secuencia de Vpr. Por otro lado, también se introdujeron, como controles, muestras en la electroforesis sin una previa digestión con EcoRI (“*uncut*”), observando la diferencia entre la muestra digerida y sin

digerir. Para el ensamblaje del plásmido multiparte se utilizaron los plásmidos del **clon A** debido a que se observa una banda densa, lo que implica mayor cantidad de ADN, con un peso molecular correcto según lo esperado en este caso.

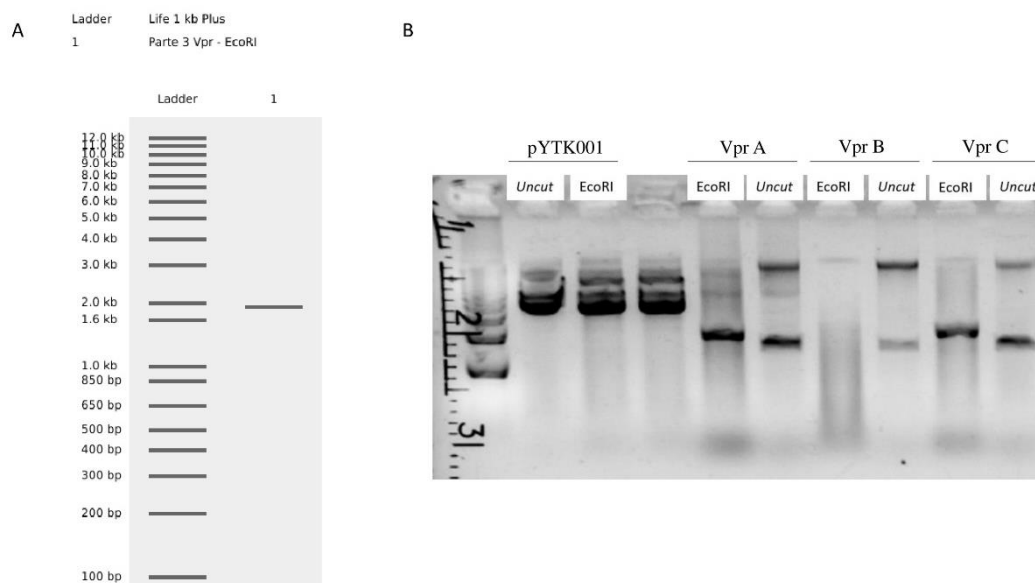


Figura 12. A: se observa la banda de ADN esperada al digerir el plásmido recombinante con EcoRI en una simulación con Benchling. B: se observa la electroforesis real de los plásmidos, que reproducen la secuencia esperada, a excepción de los plásmidos obtenidos del clon B, que no muestra ninguna banda.

4.2 Ensamblaje del plásmido recombinante completo y funcional

Una vez domesticada la forma Vpr del clon viral HxB2 como parte 3, puede realizarse el ensamblaje del plásmido recombinante funcional para ser replicado en bacterias y expresado en levaduras.

Para el ensamblaje del plásmido multiparte, basado en el uso de la enzima de restricción IIs BsaI (punto 3.6), se probaron diferentes concentraciones de las múltiples partes a ensamblar. Los ratios entre inserto y vector tienen un impacto notable en la eficacia de los clonajes (43). En la bibliografía existente aparecen referencias de concentraciones variables de las múltiples partes a ensamblar, por lo que se realizaron dos procesos de clonaje multiparte en los que se utilizaron cantidades diferentes de ADN. En este caso, el plásmido sobre el cual se ensamblan cada una de las partes (ejerciendo una función similar al vector de entrada pYTK001) es pYTK0083, el cual presenta un gen codificante de la proteína roja fluorescente (RFP), que permite la selección de colonias positivas mediante la selección de colonias que no emiten fluorescencia roja (de forma similar a lo que ocurría con la GFP). Durante el clonaje y corte con BsaI, el gen de la RFP se escinde del resto del plásmido permitiendo el ensamblaje de la parte 8 con las partes 1 y 7.

Se realizaron dos procesos de transformación en los que se utilizaron cantidades diferentes de ADN para averiguar las concentraciones más adecuadas para hacer el ensamblaje multiparte. En la figura 13 se muestran las placas de agar con las colonias de *E. coli* tras su transformación con el plásmido multiparte. La figura 13A corresponde a las colonias transformadas con una cantidad de **10 femtomolar (fM)** de plásmidos recombinantes, resultando todas positivas, es decir, todas incorporaron el plásmido (colonias blancas). Cuando se utilizaron **100 fM** de ADN se obtuvieron más colonias, aunque muchas no habían integrado un plásmido correctamente ensamblado, por lo que se observaron numerosas colonias rojas (figura 13B). Probablemente, se dificulta el ensamblaje a mayor cantidad de ADN debido a la **saturación enzimática** de BsaI-v2, resultando en una menor eficacia en la transformación bacteriana.

Se utilizó la herramienta *Broad Host Range Reaction Calculator* de *BarrickLab* para el cálculo de los volúmenes de cada soluto necesarios para el ensamblaje del plásmido multiparte ajustados a una cantidad de ADN de 10fM o 100fM.

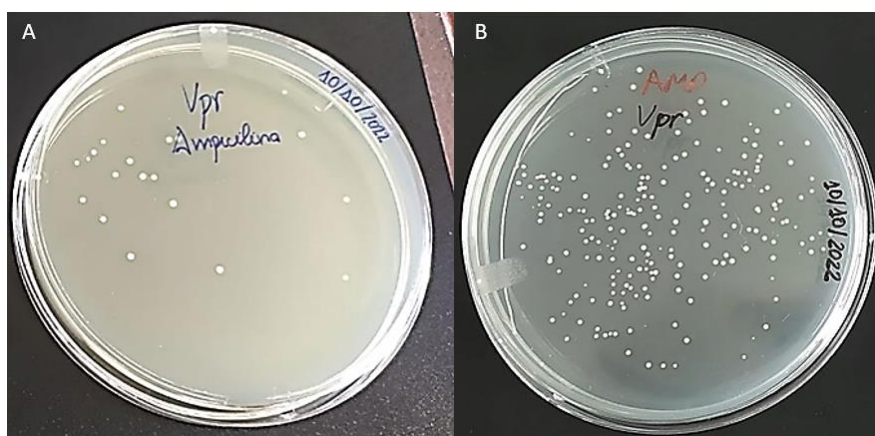


Figura 13. Placas de agar con colonias de *E. coli* transformadas con plásmidos multiparte con diferentes cantidades de ADN. El medio presenta ampicilina como presión selectiva, ya que las bacterias que han integrado el plásmido multiparte presentan el gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*) en la parte 8.

4.2.1 Verificación del plásmido multiparte completo y funcional

En un primer momento, se realizó la purificación de ADN de seis colonias positivas (obtenidas de las placas de 10 fM) con el *kit Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification*; posteriormente, fue necesario repetir el proceso con el *kit QIAprep® Spin Miniprep*, ya que con el primero no se observó el patrón de bandas de electroforesis esperado tras la digestión con BglII y EcoRI (figuras 14A y 14B). En la figura 14C se observa la electroforesis del ADN de las seis colonias purificadas con el segundo *kit* (A1, A2, A3, A4, A5 y A6) en la que se reproduce el mismo patrón de bandas que en la simulación,

indicando un ensamblaje adecuado. La diferencia entre ambos *kits* radica en que QIAprep® Spin Miniprep especifica que elimina las endonucleasas celulares (encargadas de escindir el ADN exógeno), por lo que no degradan los plásmidos y pueden observarse en la electroforesis. Sin embargo, es muy probable que con el kit *Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification* no se eliminara la endonucleasa presente en la cepa *Stb13* de *E. coli* utilizada (*EndA*), por lo que los plásmidos se degradaron resultando en una electroforesis aberrante.

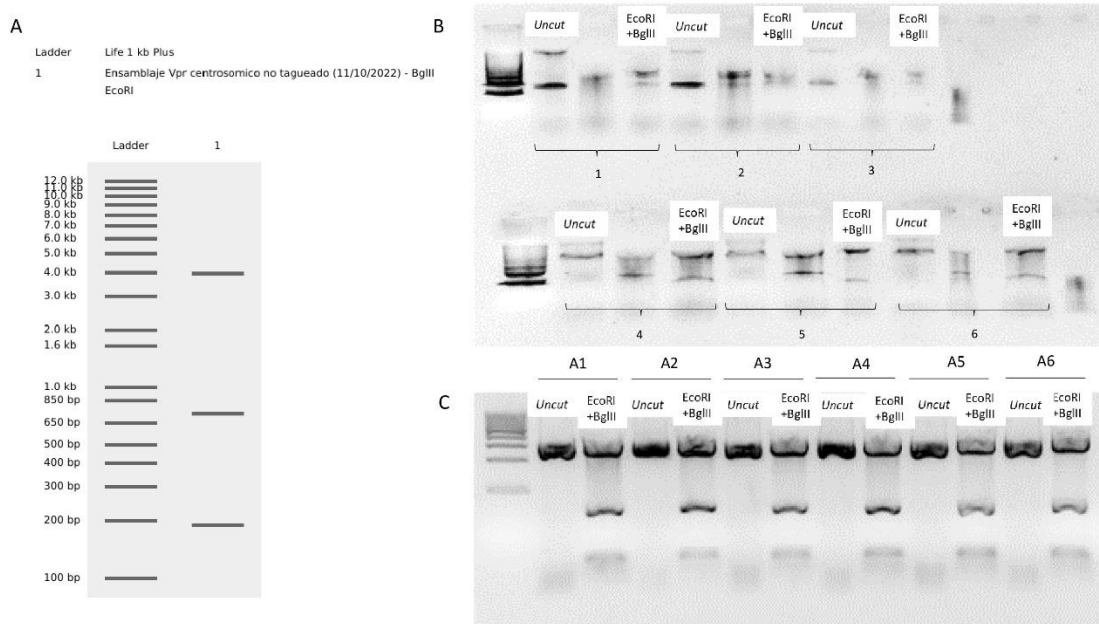


Figura 14. A: simulación en Benchling del patrón de bandas esperado tras la digestión de los plásmidos multiparte con las enzimas de restricción tipo II *BglII* y *EcoRI*. B: no se observan los patrones de bandas adecuados ya que los plásmidos fueron degradados por la endonucleasa *EndA* de la cepa *Sb13* de *E. coli*. C: electroforesis con el patrón de bandas esperado ya que el kit de purificación de ADN utilizado en este caso eliminó la endonucleasa.

4.3 Ensayos de inhibición del crecimiento de *S.cerevisiae*

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada para estos ensayos es auxótrofa para el uracilo; es decir, solo puede crecer en un medio que presenta uracilo, ya que no es capaz de sintetizarla. Una vez transformadas estas levaduras con el plásmido multiparte, se cultivan en diferentes medios (rico YP o medio sin uracilo) y fuentes de carbono (glucosa o galactosa) en forma de cinco diluciones seriadas. Se cultivan de la misma manera levaduras con plásmidos que solo contienen el gen *URA3* (plásmidos *pRS316*), adquiriendo la capacidad de crecer en un medio sin uracilo (-Ura). Estas se utilizan como control, ya que son capaces de crecer en el medio rico YP y en el medio -Ura sin ser afectados por la expresión de *Vpr*, ya que no está codificado en este plásmido, indicando que los medios son viables para proliferar sin expresar la proteína *Vpr*. En efecto, se observa que las levaduras control crecen en todos los medios a las diferentes concentraciones. Lo mismo

ocurre con las que expresan Vpr, por lo que no hay inhibición del crecimiento con la secuencia de Vpr del genoma HxB2.

Si existiera inhibición de la proliferación de *S. cerevisiae* por la acción de Vpr, no deberían crecer colonias en los medios con galactosa. Ya que el promotor del gen de Vpr es pGAL1, dependiente de la presencia de galactosa en el medio para su activación. En los medios con glucosa, sí se esperaría crecimiento de levaduras, ya que esta inhibe la inducción de pGAL1. En el medio -Ura se observaría la misma tendencia, pero los fenotipos de inhibición, en caso de existir, serían más acusados, ya que en este medio se mantiene la presión selectiva y, aunque el producto de Vpr fuese tóxico para la célula (produciendo la parada del ciclo celular, por ejemplo) la célula se vería obligada a mantener este plásmido para poder continuar disponiendo del gen URA3, también codificado en el mismo plásmido. Por el contrario, en el medio rico YP, si la expresión de Vpr HxB2 fuese tóxica, este plásmido podría perderse de manera estocástica en las sucesivas descendencias celulares, ya que no requerirían del plásmido para sintetizar uracilo, presente en el medio. En conclusión, este experimento muestra que la versión truncada de Vpr presente en el genoma de referencia HxB2, no es capaz de inhibir el crecimiento celular (figura 15).



Figura 15. Experimentos de inhibición del crecimiento mediante diluciones seriadas de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido multiparte en placas en diferentes condiciones de medio (rico YP y -Ura) y fuente de carbono (glucosa y galactosa), observando que la versión truncada de Vpr presente en el genoma HxB2 no inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae*, ya que se visualizan colonias en todos los medios y a diferentes concentraciones a pesar de la expresión de Vpr.

4.4 Determinación de la sublocalización celular de Vpr HxB2

Localizando la fluorescencia que emite la proteína Venus mediante microscopía de epifluorescencia, se localiza, a su vez, Vpr HxB2, ya que ambas proteínas se encuentran enlazada debido a la inserción de la secuencia de Venus (parte 4a) posterior a la secuencia de Vpr HxB2 sin el codón de parada precoz (parte 3), y anterior al terminador tADH1 (parte 4b) como se observa en la simulación realizada con la herramienta *Benchling* (figura 16). Se muestra en la figura 17A la fluorescencia captada en el interior celular con el microscopio de epifluorescencia. A partir de estas imágenes, puede deducirse una localización nuclear. Para determinar con seguridad que la señal proviene del núcleo celular, se tiñeron las células con el marcador fluorescente DAPI, el cual emite fluorescencia al unirse a secuencias de ADN y ser excitado con luz de una longitud de onda próxima a 360 nm, indicando la localización del núcleo celular. En la figura 17B se observa que la localización de la fluorescencia de DAPI coincide con la de Venus, lo que indica que la fusión Vpr-Venus se encuentra en el núcleo. Es de destacar que, aunque la localización de Vpr es claramente nuclear, una vez se permeabiliza el núcleo para favorecer la entrada de DAPI (punto 3.13), se observa que esta señal se pierde con gran rapidez.

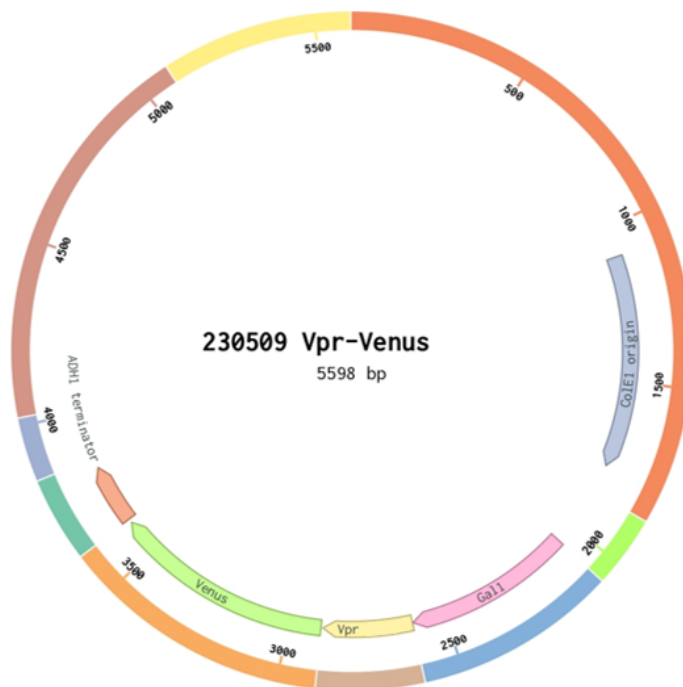


Figura 16. Plásmido al que se le ha añadido como parte 4b la secuencia de la proteína fluorescente Venus, que se traducirá fusionada a la proteína Vpr de estudio.

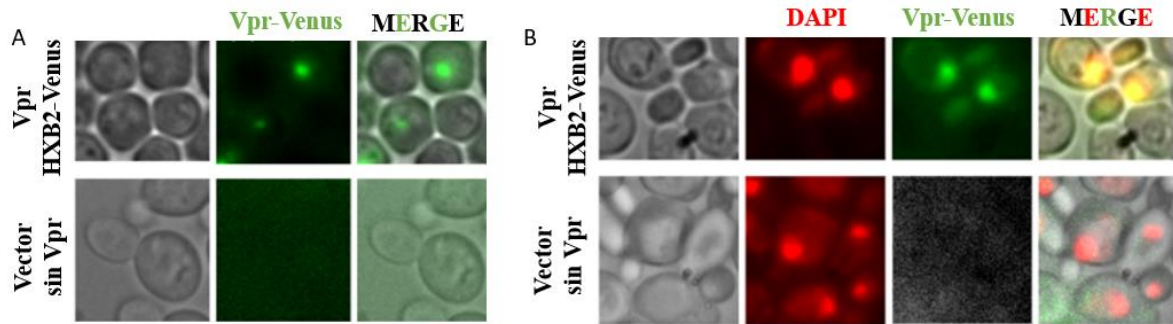


Figura 17. Se observa la localización nuclear de Vpr a partir de la fluorescencia emitida por la proteína Venus, enlazada a Vpr de estudio, y la tinción celular con el marcador DAPI. La creación de la fusión Vpr-Venus se realizó mediante la síntesis de un plásmido recombinante multiparte que presenta como parte 4a, posterior a la secuencia de Vpr, la secuencia de ADN de Venus

5. Discusión

Los resultados mostrados indican que la proteína Vpr del clon viral HxB2 no inhibe la proliferación de *S. cerevisiae*, por lo que podría inferirse que no inhibe el ciclo celular de células eucariotas. Sin embargo, diversos estudios han demostrado la capacidad de Vpr, en su versión más larga o completa, de secuestrar el ciclo celular en su paso de G2 a M, como se ha desarrollado en el punto 1.1.3 de la introducción (19,20). La clave que explica estas observaciones puede encontrarse en los procesos de atenuación de patogenicidad que sufren diversos virus tras ser cultivados *in vitro* durante un largo periodo. Los mecanismos que dan lugar a estas modificaciones no están del todo esclarecidos, pero es muy probable que impliquen mutaciones en regiones que favorecen la patogenicidad *in vivo*, pero no afectan a la replicación *in vitro* (13). Como se ha indicado anteriormente, la secuencia de Vpr utilizada para los experimentos de exploración de la capacidad de inhibición del ciclo celular, proviene de la variante HxB2. A su vez, esta variante surgió de cultivos de células T infectadas con el VIH-1 aislado de un paciente (denominado paciente LAI) hacia 1983 (15). La expansión *in vitro* dio lugar a la aparición de variantes atenuadas como HxB2, la cual produce una Vpr truncada sin capacidad replicativa *in vivo*. Sin embargo, tras la infección accidental de un trabajador de laboratorio con esta variante (punto 1.1.3) se revirtieron estas mutaciones.

Por lo tanto, la proteína truncada no conserva la capacidad inhibitoria ya que no supone una ventaja en la supervivencia y replicación del virus *in vitro*, sin embargo, la inhibición del ciclo celular supone ventajas adaptativas *in vivo*, como evitar la expansión clonal de

los linfocitos T, proceso elemental para que se instaure una respuesta inmunitaria efectiva. Así pues, el proceso de inhibición del ciclo celular inducido por Vpr completo, es un mecanismo por el que se produce la disfunción del sistema inmune en la infección por el VIH-1. Además, mantener a las células en una fase activa del ciclo maximiza la producción de viriones. Los estudios que demuestran la inhibición del ciclo celular se realizaron con la variante NL4-3, que produce versiones no truncadas de Vpr, lo que corrobora que diferentes versiones de Vpr producen diferentes efectos en la inhibición celular (19). Un aspecto importante que debe plantearse, es si el truncamiento de la proteína en el aminoácido 78 implica que la región clave para las funciones de inhibición celular se localiza entre el aminoácido 78 y el 96 y qué otras funciones se ven afectadas debido a esta mutación. Por ello, en este trabajo se han diseñado plásmidos con secuencias de Vpr que proceden también de NL4-3 con perspectivas para ser utilizadas en futuros estudios y experimentos de inhibición.

Vpr podría convertirse en una diana para nuevos fármacos antivirales, ya que impedir la inhibición de la expansión clonal resultaría en una mayor respuesta inmunitaria contra el virus. Por ello, es de gran utilidad disponer de un modelo celular para su expresión y estudio con el mayor rendimiento posible. Con esta finalidad, se ha desarrollado en este trabajo el clonaje de Vpr HxB2 en *S. cerevisiae* utilizando el método MoClo de ensamblaje multiparte en una sola reacción. Sin embargo, ha sido necesario optimizar este método para adaptarlo a los medios disponibles y determinar aspectos que influyen en la eficacia de las transformaciones celulares de cara a su aplicación en futuros estudios de Vpr o de otras proteínas de interés. De esta manera, se determina que se obtienen más colonias positivas de *E. coli* con BsmBI que con la BsmBI-v2, y que no aumenta el número de transformantes positivos a mayores cantidades de plásmidos multiparte de forma proporcional debido a la saturación de BsaI. Por otro lado, es importante utilizar un *kit* de purificación de ADN que elimine endonucleasas celulares o, en su defecto, utilizar para futuros experimentos cepas de *E. coli* con el gen *EndA* delecionado.

6. Conclusiones

- Se ha optimizado el método MoClo de Golden Gate para el clonaje de la proteína Vpr en *S. cerevisiae*.

- Se ha desarrollado un modelo celular eucariota en *S. cerevisiae* para el estudio de los efectos celulares de Vpr y sus dianas moleculares.
- La versión de Vpr truncada del genoma HxB2 no inhibe el crecimiento celular y se localiza en el núcleo, aunque se pierde rápidamente esa localización al permeabilizar la membrana nuclear.

7. Perspectivas

- Se espera, según datos bibliográficos, que las versiones no truncadas de Vpr procedentes del genoma NL4-3 sí produzcan inhibición de ciclo celular, para lo que se han sintetizado plásmidos multiparte que se utilizarán en futuros experimentos.

8. ¿Qué he aprendido durante el TFG?

La realización de este TFG ha sido muy enriquecedora en muchos aspectos. En primer lugar, el hecho de participar en una investigación experimental me ha permitido conocer el campo en más profundidad, entendiendo la importancia de la colaboración entre la investigación y el servicio asistencial en Medicina y, en contraste, observando la falta de recursos que muchas veces atraviesa el campo experimental a pesar de su importancia, ya que es el medio a través del cual se crea el conocimiento.

Durante esta investigación, he aprendido diversas técnicas de laboratorio (PCR, cultivo celular, electroforesis, purificación de ADN, transformación de bacterias y levaduras, etc.) y me he familiarizado con un método novedoso y específico de clonaje de ADN, mejorando la sistematización de procedimientos y recogida minuciosa de datos.

Por otro lado, he practicado la búsqueda de información e interpretación de fuentes de datos como PubMed, manejando y seleccionando multitud de información sobre el VIH y su proteína accesoria Vpr.

En definitiva, durante este TFG he ampliado mis conocimientos del campo de la investigación, la metodología científica, la tecnología del ADN y el VIH/SIDA, lo que ha supuesto mucho esfuerzo y dedicación, acercándome un poco más a imaginar y valorar el trabajo que realizan muchas personas cada día para crear conocimiento.

9. Bibliografía

1. Murray PR. Microbiología médica básica. Barcelona: Elsevier; 2018.
2. Timeline of The HIV and AIDS Epidemic [Internet]. HIV.gov. [citado 3 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline>
3. Cohen J. Early AIDS virus may have ridden Africa's rails. *Science*. 3 de octubre de 2014;346(6205):21-2.
4. En peligro: Actualización mundial sobre el sida 2022. 2022;
5. Ministerio de Sanidad - Ciudadanos - Vigilancia epidemiológica [Internet]. [citado 8 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/>
6. Male D, Stokes Peebles Jr R, Male V. Inmunología. Barcelona: Elsevier, 2021, 9ª edición.
7. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. julio de 2012;2(7):a006924.
8. Nduati R, Mbori-Ngacha D, John G, Richardson B, Kreiss J. Breastfeeding in women with HIV. *JAMA*. 23 de agosto de 2000;284(8):956-7.
9. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 1 de octubre de 2015;1(1):1-22.
10. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. junio de 2003;9(6):727-8.
11. Trono D. When accessories turn out to be essential. *Nat Med*. diciembre de 1998;4(12):1368-9.
12. Wang B, Ge YC, Palasanthiran P, Xiang SH, Ziegler J, Dwyer DE, et al. Gene Defects Clustered at the C-Terminus of the vpr Gene of HIV-1 in Long-Term Nonprogressing Mother and Child Pair: In Vivo Evolution of vpr Quasispecies in Blood and Plasma. *Virology*. 1 de septiembre de 1996;223(1):224-32.
13. Su L, Kaneshima H, Bonyhadi ML, Lee R, Auten J, Wolf A, et al. Identification of HIV-1 determinants for replication in vivo. *Virology*. 6 de enero de 1997;227(1):45-52.
14. Miller ED, Duus KM, Townsend M, Yi Y, Collman R, Reitz M, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 IIIB Selected for Replication In Vivo Exhibits Increased Envelope Glycoproteins in Virions without Alteration in Coreceptor Usage: Separation of In Vivo Replication from Macrophage Tropism. *J Virol*. septiembre de 2001;75(18):8498-506.
15. Beaumont T, van Nuenen A, Broersen S, Blattner WA, Lukashov VV, Schuitemaker H. Reversal of Human Immunodeficiency Virus Type 1 IIIB to a Neutralization-Resistant Phenotype in an Accidentally Infected Laboratory Worker with a Progressive Clinical Course. *J Virol*. marzo de 2001;75(5):2246-52.
16. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR. *Journal of Molecular Biology*. 14 de marzo de 2003;327(1):215-27.

17. González ME. The HIV-1 Vpr Protein: A Multifaceted Target for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci.* 10 de enero de 2017;18(1):126.
18. Patel CA, Mukhtar M, Pomerantz RJ. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Induces Apoptosis in Human Neuronal Cells. *J Virol.* octubre de 2000;74(20):9717-26.
19. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol.* octubre de 1995;69(10):6304-13.
20. Kamata M, Watanabe N, Nagaoka Y, Chen ISY. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Binds to the N Lobe of the Wee1 Kinase Domain and Enhances Kinase Activity for Cdc2. *J Virol.* junio de 2008;82(12):5672-82.
21. Greenwood EJD, Williamson JC, Sienkiewicz A, Naamati A, Matheson NJ, Lehner PJ. Promiscuous Targeting of Cellular Proteins by Vpr Drives Systems-Level Proteomic Remodeling in HIV-1 Infection. *Cell Rep.* 30 de abril de 2019;27(5):1579-1596.e7.
22. Lv L, Wang Q, Xu Y, Tsao LC, Nakagawa T, Guo H, et al. Vpr targets TET2 for degradation by CRL4VprBP E3 ligase to sustain IL-6 expression and enhance HIV-1 replication. *Mol Cell.* 7 de junio de 2018;70(5):961-970.e5.
23. Lubow J, Collins KL. Vpr Is a VIP: HIV Vpr and Infected Macrophages Promote Viral Pathogenesis. *Viruses.* 27 de julio de 2020;12(8):809.
24. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. 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.* 19 de julio de 1994;91(15):7311-5.
25. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature.* 26 de febrero de 2015;518(7540):547-51.
26. Olazábal Olarreaga I, Arias Navalón JA. Mecanismos del sistema inmune innato. En: Olazábal Olarreaga I, Arias Navalón JA. *Inmunología básica para medicina.* Barcelona: Elsevier; 2018. p. 19-23.
27. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1 de noviembre de 1991;174(5):1209-20.
28. Sm C, Nj V, Sj K, Al M, Mj H, Ms M, et al. HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of *Candida albicans*. *Journal of leukocyte biology* [Internet]. septiembre de 1994 [citado 1 de mayo de 2023];56(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8083603/>
29. Groot F, Welsch S, Sattentau QJ. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood.* 1 de mayo de 2008;111(9):4660-3.
30. Collins DR, Lubow J, Lukic Z, Mashiba M, Collins KL. Vpr Promotes Macrophage-Dependent HIV-1 Infection of CD4+ T Lymphocytes. *PLOS Pathogens.* 17 de julio de 2015;11(7):e1005054.
31. Lubow J, Virgilio MC, Merlino M, Collins DR, Mashiba M, Peterson BG, et al. Mannose receptor is an HIV restriction factor counteracted by Vpr in macrophages. *eLife.* 9:e51035.

32. Baynes JW. *Bioquímica médica*. Barcelona: Elsevier; 2019.
33. Sandhu SS. *Recombinant DNA Technology*. I. K. International Pvt Ltd; 2013. 227 p.
34. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One*. 5 de noviembre de 2008;3(11):e3647.
35. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol*. 18 de septiembre de 2015;4(9):975-86.
36. Galao RP, Scheller N, Alves-Rodrigues I, Breinig T, Meyerhans A, Díez J. *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microb Cell Fact*. 10 de octubre de 2007;6:32.
37. All Nobel Prizes [Internet]. NobelPrize.org. [citado 3 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes>
38. Zhao RY, Elder RT. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res*. marzo de 2005;15(3):143-9.
39. Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Ishimoto A, et al. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J Virol*. septiembre de 1989;63(9):4110-4.
40. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*. enero de 1985;40(1):9-17.
41. Lavallée C, Cohen EA. HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids. *J Acquir Immune Defic Syndr (1988)*. mayo de 1993;6(5):529-30.
42. Yeast Toolkit Primer Design Tool [Internet]. [citado 13 de mayo de 2023]. Disponible en: https://ytkprimerdesign.shinyapps.io/ytk_primer_design/
43. Barrick Lab: ProtocolsBTKMakeANewPartPlasmid [Internet]. [citado 10 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsBTKMakeANewPartPlasmid>
44. Green MR, Sambrook J. Cloning in Plasmid Vectors: Blunt-End Cloning. *Cold Spring Harb Protoc*. 2 de noviembre de 2020;2020(11).

