
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL PAPEL DE NF- κ B EN LA
REACTIVACIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA EN LINFOCITOS CD4**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ ALCAMÍ PERTEJO

Madrid, 1994

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

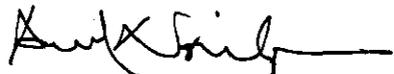
El trabajo sobre "Análisis molecular del papel de NF-kB en la reactivación del virus de la inmunodeficiencia humana en linfocitos CD4" ha sido realizado por D. José ALCAMI PERTEJO bajo mi supervisión.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, virología y biología celular son científicamente consistentes y han sido contrastados adecuadamente, por lo que su validez y fiabilidad están garantizados, a pesar de las dificultades técnicas que supone trabajar en los sistemas celulares utilizados.

Los datos obtenidos aportan datos originales para la comprensión de los mecanismos de latencia y reactivación del VIH y determinados aspectos patogénicos del SIDA.

Por todo ello considero que en su estado actual el trabajo puede ser presentado como Tesis Doctoral para la obtención del grado de Doctor.

El Director de la Tesis



Madrid, 27 de junio 1994

Fdo.: Dr. A. Rodríguez Noriega
(fecha y firma)

D.N.I.: 10.466.797

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

JOSE PRIETO PRIETO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMA: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D. José Alcami Pertejo, titulado: "Análisis molecular del papel de NF-kB en la reactivación del virus de la inmunodeficiencia humana en linfocitos CD", dirigida por el Prof. Dr. D. Antonio Rodríguez-Noriega, este Departamento da su conformidad para que dicho Trabajo sea leído y defendido en público con vista a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

29-6-1994

El Director del Departamento



Madrid, 29 de Junio de 1994

Fdo.: José Prieto Prieto.
(fecha y firma)

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar al Dr. Antonio Noriega su ayuda y aliento no sólo para realizar este trabajo de Tesis sino en el trabajo diario en el laboratorio. Quiero también agradecer especialmente a Rafael Delgado el apoyo prestado a lo largo de estos años apasionantes y difíciles. Agradecer asimismo a María Teresa Laín de Lera, Dolores Folgueira y María Antonia Pedraza la ayuda prestada en la realización de este trabajo. Al resto de compañeros del Centro de Investigación y del Servicio de Microbiología del Hospital 12 de Octubre mi agradecimiento por contribuir a crear un ambiente de trabajo científico y de camaradería sin el que hubiera sido difícil realizar muchos proyectos.

Algunos materiales fueron cedidos sin concesiones por distintos laboratorios: agradecer al Dr. Ron T. Hay de la Universidad de St. Andrews los antisueros y proteínas recombinantes facilitados y al Dr. Richard Gaynor de la Universidad de Dallas los plásmidos provirales que han servido para realizar los experimentos de infección.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, sin cuya generosa ayuda no hubiera sido realizable.

Quiero agradecer a todos los componentes de la Unidad de Inmunología Viral del Instituto Pasteur de París la ayuda prestada a lo largo de este proyecto sobre el cual hemos discutido durante largas horas intentando comprender lo que la realidad tercamente intenta comunicarnos. Quiero destacar la ayuda prestada por Jean-Louis Virelizier a este trabajo y agradecer muy especialmente el apoyo sin límites que nuestro laboratorio ha recibido por parte de Fernando Arenzana-Seisdedos, científico excepcional y amigo de todas las horas.

Agradecer finalmente a Cruz, Pepe, Jaime e Irene el estar siempre a mi lado y su sentido crítico a la hora de enjuiciar y relativizar este trabajo.

*A mis padres, a sus huellas,
el único camino...*

Si tuviera que expresar mediante una comparación mi sentimiento sobre la investigación en ciencias de la vida, diría que es un salón maravilloso y lleno de luz al cual no es posible llegar más que atravesando una larga y horrible cocina.

Claude Bernard

"Introducción al estudio de la Medicina Experimental"

INDICE

INDICE

página

1. Introducción

1.1. Generalidades	2
1.2. Epidemiología de la infección por el VIH	3
1.3. Retrovirus	5
a. Oncovirus	6
b. Lentivirus	6
c. Espumavirus	7
1.4. Estructura genómica del VIH	8
a. Genes estructurales	9
b. Genes reguladores	10
c. Las secuencias repetitivas largas (LTR)	12
1.5. Ciclo biológico del VIH	15
a. Interacción con el receptor e infección celular	15
b. Retrotranscripción e integración	17
c. Replicación viral	19
1.6. Latencia y reactivación del VIH	23
a. Células diana	23
b. El reservorio viral	23
c. Latencia celular y latencia clínica	24
1.7. El factor de transcripción NF-kB	26
a. Generalidades	26
b. La familia rel/NF-kB	27
c. La familia de proteínas IκB (Inhibidores de NF-kB)	30
d. Regulación de las proteínas de la familia NF-kB	31

2. Hipótesis de trabajo. Objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo	37
2.2. Objetivos	40

3. Materiales y métodos

3.1. Células	42
3.2. Plásmidos	42
3.3. Activadores utilizados	45
3.4. Oligonucleótidos y sondas	45
3.5. Medio de cultivo	46
3.6. Aislamiento de linfocitos CD4 de sangre periférica	47
3.7. Ensayos de transfección	47
3.8. Ensayos de unión ADN-proteína	48
3.9. Análisis cuantitativo del ADN de bajo peso molecular	50
3.10. Sistemas de infección con provirus	51
3.11. Detección del ADN proviral y de transcritos de ARNm en células infectadas	52

4. Resultados

4.1. Los linfocitos T CD4 en estado de reposo presentan un entorno celular poco permisivo para la actividad transcripcional del VIH	55
4.2. Diferentes promotores se expresan a bajo nivel en linfocitos CD4	57
4.3. La baja expresión del LTR del VIH en linfocitos CD4 no es debida a una baja eficiencia en la transfección de dichas células	58
4.4. La inducibilidad NF-kB dependiente del LTR del VIH es comparable en linfocitos CD4 normales y células transformadas	60
4.5. Sinergia entre activación celular y la expresión de Tat	61
4.6. Papel de las secuencias NF-kB en la transactivación inducida por Tat sobre el LTR del VIH	62
4.7. Vías alternativas de activación del LTR en linfocitos CD4	64
4.8. Papel de NF-kB en la producción de la proteína Tat	65
4.9. Proteínas de la familia rel/NF-kB en linfocitos CD4	68
4.10. Cooperación entre Tat y la subunidad p50 de NF-kB	70
4.11. Estudio de la replicación de provirus con mutaciones en el consenso NF-kB en linfocitos CD4	71

5. Discusión

5.1. La baja actividad transcripcional del LTR del VIH en linfocitos CD4 como mecanismo de latencia viral	74
5.2. Diferentes requerimientos y modo de actuación de la proteína Tat en linfocitos CD4 y líneas linfoblastoides T	81
5.3. Los linfocitos CD4 en reposo presentan en su núcleo complejos homodiméricos de p50 que cooperan con la proteína Tat en la transactivación del LTR	85
5.4. NF- κ B es un factor esencial para la replicación del VIH en linfocitos CD4	89

6. Conclusiones 92

7. Bibliografía 95

ABREVIATURAS

ADN	Acido deoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
CPM	Cuentas por minuto
IκB	Inhibidor de NF- κ B
IL2	Interleucina 2
kD	kilodaltons
LTR	Terminaciones repetitivas largas ("Long Terminal Repeats")
NF-κB	Factor nuclear kappa-B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBL	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón Salino Fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Phytohemaglutinina
PMA	Acetato de forbol mirístico
RLU	Unidades arbitrarias de luciferasa ("Relative luciferase units")
RRE	Elemento de respuesta a Rev ("Rev responsive element")
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de la inmunodeficiencia del simio
SVF	Suero de ternera fetal
TA	Temperatura ambiente
TAR	Elemento de respuesta a Tat
TI	Transcriptasa inversa
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue aislado por primera vez en el Instituto Pasteur de París en 1983 (Barré-Sinoussi y cols.,1983). Este retrovirus fue denominado LAV (Lymphadenopathy associated virus) debido a su asociación con el cuadro de linfadenopatía generalizada que presentaba el paciente del cual fue aislado. Posteriormente, en 1984, varios grupos americanos describen otros aislados virales en pacientes con SIDA que son denominados HTLV-III (Popovic y cols.,1984) y ARV (Levy y cols.,1984). El clonaje molecular y la secuenciación de estos virus, que presentaban características biológicas y antigénicas similares, confirmaron que se trataba de aislados diferentes de un mismo retrovirus (Wain-Hobson y cols.,1985; Ratner y cols.,1985; Sanchez-Pescador y cols.,1985; Muessing y cols.,1985).

En 1986 estos diferentes aislados (LAV, HTLV-III y ARV) se agruparon bajo la denominación VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) (Coffin y cols.,1986) estableciéndose firmemente mediante datos virológicos, epidemiológicos, clínicos y de laboratorio la asociación entre la infección por el VIH y el desarrollo del SIDA (Brun-Vézinet y cols.,1984a,1984b; Kalyanaraman y cols.,1984; Curran y cols.,1984,1985; Evans.,1991).

La infección por el VIH origina un trastorno grave, progresivo e irreversible de la función inmune cuya expresión final viene representada por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Bajo el término "SIDA" se agrupan por lo tanto una serie de infecciones oportunistas graves secundarias al déficit inmunitario ocasionado por la infección por el VIH. El SIDA incluye también una afectación neurológica polimórfica y la aparición de tumores malignos de los cuales los más característicos son el Sarcoma de Kaposi y los linfomas no Hodgkin (Castro y cols.,1993).

1.2. Epidemiología de la infección por el VIH.

Los primeros casos de SIDA fueron descritos en San Francisco en el año 1981 (Gottlieb y cols.,1981; Center for Diseases Control.,1981). En pocos meses gracias a los sistemas de vigilancia epidemiológica vigentes en Estados Unidos se confirmó la existencia de una nueva epidemia. Las investigaciones epidemiológicas demostraron que se trataba de una enfermedad infecciosa transmisible por vía sanguínea (Rosen y cols.,1985), sexual (Piot y cols., 1984; Quinn y cols.,1986) y vertical madre-hijo (Brunet y cols.,1987; Piot y cols.,1988).

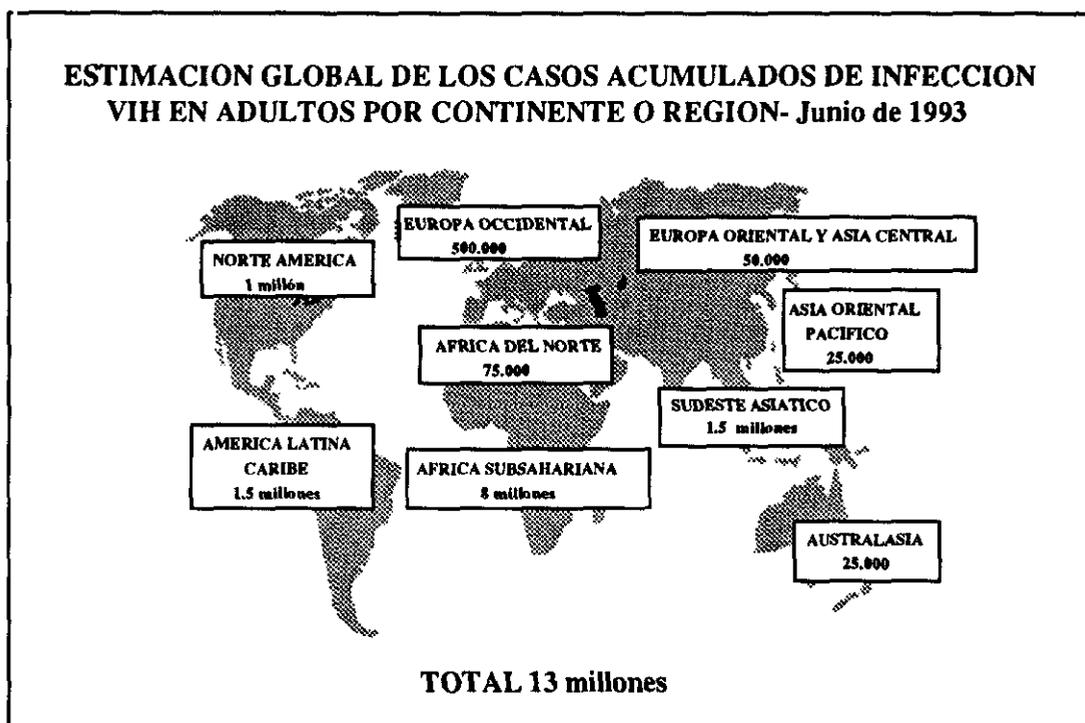
Los sistemas de vigilancia epidemiológica no sólo detectaron rápidamente la existencia de la epidemia sino que establecieron los mecanismos de transmisión del virus y los métodos de prevención frente a la infección (Curran y cols.,1984,1985). A su vez, el aislamiento y caracterización del VIH permitió el desarrollo de tests diagnósticos que han permitido eliminar prácticamente la transmisión de la infección por transfusión de hemoderivados.

A pesar de estos esfuerzos, la infección por el VIH se ha extendido hasta constituir actualmente una pandemia de consecuencias imprevisibles que supone el mayor problema de Salud Pública que tienen planteados los países desarrollados y una amenaza para la supervivencia de los países en vías de desarrollo. Las cifras actuales de la OMS recogen en Junio de 1993 un total de 611.589 casos de SIDA declarado, aunque se estima que debido a la infradeclaración en los países en vías de desarrollo el número de casos de SIDA supera los dos millones de afectados. Actualmente se estima que la infección por el VIH afecta a más de 13 millones de sujetos en el mundo (Figura 1).

Las previsiones de la OMS apuntan a que en el año 2000 más de 20 millones de sujetos se encontrarán infectados por el VIH y que 9 de cada 10 individuos infectados se encontrarán en países en vías de desarrollo. Las proyecciones epidemiológicas dibujan perspectivas

especialmente dramáticas en los países del Africa subsahariana, en la India y en el Sudeste asiático donde el SIDA puede transformarse en una epidemia incontrolable.

Figura 1



En los países desarrollados el SIDA tiene un enorme impacto económico y social. En zonas urbanas de alta incidencia hasta el 25% de las camas hospitalarias del Area de Medicina se encuentran ocupadas por pacientes con SIDA. En Estados Unidos el SIDA es la primera causa de muerte entre varones de 25 a 40 años y la primera causa de pérdida de años vida en la población masculina desde 1992. Sin embargo, los recursos sanitarios disponibles, el mayor nivel económico y el desarrollo de los medios de comunicación de masas hacen que las proyecciones de evolución de la epidemia sean menos pesimistas en los países desarrollados, en los que se apunta a una estabilización en la incidencia de casos SIDA a comienzo del siglo XXI.

En nuestro país (Comunidad de Madrid, Boletín de Vigilancia Epidemiológica) el número de casos acumulados de SIDA registrados hasta Septiembre de 1993 es de 21.205 casos y se estima que la cifra de seropositivos puede estar entre 100.000 y 200.000 individuos.

A diferencia de lo que sucede en el resto de países occidentales, en España la mayoría de los casos de SIDA se dan en el grupo de adictos a drogas por vía parenteral. Nuestro país presenta actualmente la mayor tasa acumulada de casos de SIDA por millón de habitantes de los países europeos así como el mayor número de casos de SIDA pediátrico.

Dada la extensión de la epidemia y la amenaza que supone para la Salud de una gran parte de la población mundial, la obtención de un tratamiento y vacuna eficaces frente a la infección por el VIH constituye por lo tanto uno de los mayores desafíos que tiene planteados la ciencia en el momento actual.

1.3. Retrovirus.

El VIH es un retrovirus perteneciente a la familia de los Lentivirus (Chiu y cols.,1985; Gonda y cols.,1985,1986; Gallo.,1991). Los retrovirus son virus cuyo genoma está constituido por una doble hebra idéntica de ARN de polaridad positiva. El genoma esencial de los retrovirus está constituido por tres genes estructurales, *gag*, *env* y *pol* (Varmus,1988). Los dos primeros codifican las proteínas del *core* y de la envuelta viral respectivamente y el último codifica un enzima específica de este grupo de virus, la Transcriptasa Inversa (TI) (Temin y Mizutani.,1970; Baltimore.,1970). Este enzima realiza la reacción de síntesis de una doble hebra de ADN a partir de una hebra de ARN viral en el proceso denominado retrotranscripción y desempeña un papel central en el ciclo biológico de los retrovirus.

Los retrovirus se clasifican de acuerdo a sus características biológicas en tres familias virales: oncovirus o virus transformantes, lentivirus o virus lentos y espumavirus (Tabla 1) (Fenner.,1975; Teich.,1984)

TABLA 1. CLASIFICACIÓN Y PRINCIPALES PROPIEDADES DE LOS RETROVIRUS

RETROVIRUS	ONCOVIRUS	LENTIVIRUS	ESPUMAVIRUS
HUESPED	Hombre. HTLV-I HTLV-II Aves y mamíferos	Hombre. VIH1 VIH2 Mamíferos superiores	Encontrados en prácticamente todas las especies
PROPIEDADES BIOLÓGICAS	Tumorigénesis Malignización	Efecto citopático Virus lentos, latencia	
EFFECTO PATÓGENO	Transformación tumoral: leucemias cáncer	Inmunodeficiencia Cuadros neurológicos Trastornos autoinmunes	No conocido

a. Oncovirus.

Los oncovirus o virus transformantes se caracterizan por inducir transformación tumoral en los huéspedes infectados (Bishop y Varmus, 1984). Se conocen dos mecanismos de producción de tumores por los oncovirus: por una parte los oncovirus pueden incorporar en su genoma oncogenes procedentes de proto-oncogenes celulares (oncovirus transductores) (Takeya y Anafusa., 1983; Duesberg y Vogt., 1970). La infección por estos retrovirus origina en la célula huésped un aumento en la actividad de las proteínas producto de estos oncogenes. Esto es debido a la existencia en las mismas de mutaciones que conllevan una mayor actividad funcional o a un aumento anormal en su producción, al encontrarse ésta bajo el control de las secuencias reguladoras del virus.

Un segundo mecanismo de oncogénesis se produce cuando virus que no albergan oncogenes en su genoma se insertan en la proximidad de proto-oncogenes celulares y alteran la regulación en la expresión de los mismos al pasar a depender ésta de las secuencias reguladoras virales (oncovirus lentos) (Steffen., 1984; Nusse y Varmus., 1982).

b. Lentivirus.

Los lentivirus constituyen una familia dentro de los retrovirus caracterizada por producir en numerosas especies animales una gran diversidad de patologías de evolución lenta

que podemos agrupar en tres tipos de síndromes: neurológicos, autoinmunes y de inmunodeficiencia (Tabla 2) (Haase.,1986). Al no transportar en su genoma oncogenes derivados de proto-oncogenes celulares no producen tumores por este mecanismo. Los lentivirus tienen una estructura genómica más compleja que la de los oncovirus, ya que además de los genes estructurales comunes a todo retrovirus (*env,gag,pol*) contienen una serie de genes reguladores de su ciclo biológico y de su infectividad. Asimismo, todos los lentivirus tienen un tropismo preferente por células del sistema inmune y neurológico lo que condiciona la patología que producen. Como última característica común a la familia de los lentivirus se encuentra la existencia a lo largo de su ciclo biológico de periodos de latencia viral en la célula infectada que alternan con fases de replicación viral (Haase.,1975,1977,1986). Esta latencia condiciona en gran parte el curso insidioso y lento de muchas de las enfermedades producidas por lentivirus así como la latencia clínica observada en los huéspedes infectados.

Tabla 2. PRINCIPALES LENTIVIRUS

LENTIVIRUS	HUESPED	PATOLOGÍA ASOCIADA
Virus de la Anemia infecciosa equina	Caballo	Anemia hemolítica, encefalopatía
Visna virus	Oveja	Encefalopatía
Virus de la Artritis-encefalitis caprina	Cabra	Inmunodeficiencia, encefalopatía
Virus de la inmunodeficiencia bovina	Vaca	Linfadenopatía, encefalopatía
Virus de la Inmunodeficiencia felina	Gato	Inmunodeficiencia
Virus de la Inmunodeficiencia del simio	Primates	Inmunodeficiencia, encefalopatía
Virus de la Inmunodeficiencia humana	Humano	Inmunodeficiencia, encefalopatía, tumores

c. Espumavirus.

Los espumavirus son retrovirus aislados fundamentalmente de lesiones espongiiformes de sistema nervioso central. Sin embargo, hasta el presente no se ha podido demostrar una relación causal entre la presencia de espumavirus y trastornos patológicos, por lo que su situación sigue siendo la de un virus "a la búsqueda de enfermedad" (Flugel.,1991).

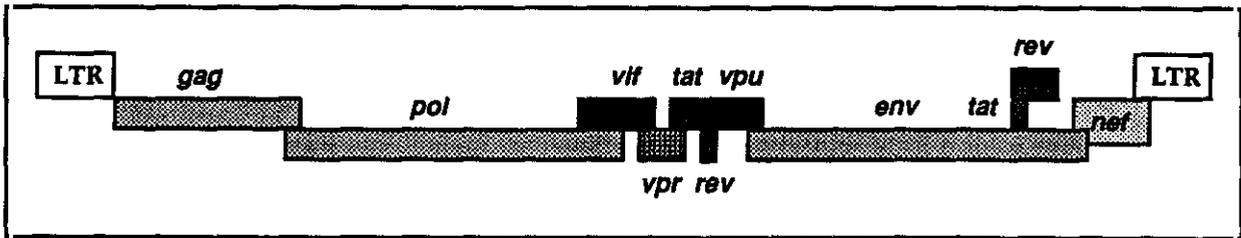
1.4. Estructura genómica del VIH-

El genoma del VIH tiene una longitud de 9.800 pares de bases (pb) y está constituido por tres genes estructurales y al menos seis genes reguladores (revisado en Green.,1991; Vaishnak y Wong-Staal.,1992) (Tabla 3 y Figura 2). En su forma de provirus el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR) que le permiten la integración en el genoma celular y en las que se encuentran los elementos reguladores de la iniciación de la transcripción viral (Gaynor 1992).

TABLA 3. GENES DEL VIH Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS QUE CODIFICAN.

GEN	PROTEINA	PESO MOLECULAR (KD)	FUNCIÓN
<i>env</i>	gp160	160	Precursor pre-proteico
	gp120	120	Proteína de la envoltura viral Interacción con el receptor CD4
	gp41	41	Fusión de membranas
<i>gag</i>	p55	55	Precursor preproteico
	p24	24/25	Proteína de la nucleocapside
	p17	17	Proteína de la matriz
	p9	9	Ribonucleoproteína
	p6	6	Ribonucleoproteína, esencial para la encapsidación viral
<i>pol</i>	Transcriptasa inversa	63	Retrotranscripción, Actividad RNasa H
	Integrasa	11	Integración
	Proteasa	15	Procesamiento postransduccional de las proteínas virales
<i>tat</i>	Tat	14	Transactivador
<i>rev</i>	Rev	19	Regulador del transporte y procesamiento del ARNm
<i>nef</i>	Nef	27	Desconocida. Esencial para la replicación viral
<i>vif</i>	Vif	23	Aumenta la infectividad viral
<i>vpr</i>	Vpr	18	Transactivador viral
<i>vpu</i>	Vpu	15	Aumenta la liberación de viriones
<i>vpx</i>	Vpx	15	Aumenta la infectividad viral
<i>tev</i>	Tev	26	Activador de <i>tat</i> y <i>rev</i>

Figura 2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VIH



a. Genes estructurales

El gen *env* codifica las proteínas que constituyen la envoltura viral. El ARN mensajero (ARNm) de *env* se produce por procesamiento único del ARNm genómico y codifica una proteína de 160 kilodaltons (kD) que es procesada mediante proteólisis por la propia proteasa viral en en dos subunidades, gp120 y gp41, siendo este proceso esencial para la infectividad viral (Di Marzo-Veronese y cols.,1985; McCune y cols.,1988). La gp120 se encuentra fuertemente glicosilada y constituye la porción exterior de la envoltura viral que participa directamente en el reconocimiento del receptor específico del virus, la molécula de CD4 (Dalglish y cols.,1984; Klatzmann y cols.,1984a,1984b; McDougal y cols.,1986). La gp41 se encuentra anclada en la membrana viral y es la proteína que está implicada en el proceso de fusión de membranas entre el virus y la célula una vez que se ha producido la unión del virus a su receptor (Sodroski y cols.,1986; Kowalsky y cols.,1987; Stein y cols.,1987; Gallaher y cols.,1987).

El gen *gag* codifica una proteína de 55kD que es procesada por la proteasa viral en proteínas de menor tamaño: p24, p17, p9 y p6 (Di Marzo y cols.,1988). La p24 es la proteína estructural que constituye mayoritariamente la capsida o *core* viral. La p17 es una proteína fuertemente miristilada en su porción amino-terminal (Leis y cols.,1988) que forma la matriz del virus. Las proteínas p6 y p9 poseen residuos cisteína típicos de ribonucleoroteínas (Berg y cols.,1986; Hervis y cols.,1988) y se asocian al ARN viral. La p6 es una proteína crítica en la

encapsidación del genoma y favorece la formación de partículas virales maduras (Aldovini y cols.,1990; Gorelick y cols.,1990).

El gen *pol* codifica la síntesis de la enzima Transcriptasa Inversa cuya actividad ARN polimerasa-ADN dependiente realiza el proceso de retrotranscripción del genoma viral (Jacks y cols.,1988). El gen *pol* codifica asimismo por dos enzimas esenciales en el ciclo replicativo del virus: la Integrasa, que permite la integración del genoma proviral retrotranscrito por la Transcriptasa Inversa, y la Proteasa que participa en el proceso de integración (Di Marzo y cols.,1986; Lightfoote y cols.,1986) y en el procesamiento de los precursores pre-proteicos que formarán la estructura del virión (Loeb y cols.,1989; Kohl y cols.,1988).

b. Genes reguladores.

El VIH se encuentra sometido a un estrecho proceso de regulación genética. De los seis genes reguladores conocidos hasta el momento únicamente *nef*, *rev* y *tat* son genes esenciales para la replicación viral. Los otros tres genes *vif*, *vpr* y *vpu* son genes reguladores menores que colaboran en la transcripción del genoma viral o en la infectividad y maduración de los viriones pero que no son esenciales en la producción de partículas virales infectivas. El papel de otros genes como *vpx* y *tev* se encuentra menos definido.

El gen *vpu* codifica una proteína de 16 kD (Matsuda y cols.,1988; Cohen y cols.,1988) cuya mutación origina una disminución en la producción de partículas virales y una acumulación intracelular de las mismas por lo que probablemente se encuentra implicada en los procesos de maduración y liberación de viriones (Strebel y cols.,1988; Klimkatt y cols.,1990).

El gen *vpr* sintetiza una proteína de 15 kD (Wong-Staal y cols.,1987; Ogawa y cols.,1987) cuya delección tiene como consecuencia una disminución en la replicación viral. *vpr* tiene un efecto transactivador sobre el LTR viral y podría colaborar en la iniciación de la transcripción del genoma proviral (Cohen y cols.,1990a,1990b).

El producto del gen *vif* (Kan y cols., 1986; Lee y cols.,1986) es una proteína de 24 kD que no es esencial para la replicación viral (Sodroski y cols.,1986b). Su delección conlleva sin embargo una importante disminución en la infectividad del VIH (entre 100 y 1000 veces) por lo que se postula su papel en la maduración de las partículas virales (Estrebel y cols.,1987; Fisher y cols.,1987).

El gen *nef* codifica una proteína de 27 kD (Allan y cols.,1985) que se encuentra miristilada y cuya función es desconocida en la actualidad. Los primeros estudios funcionales mostraron que *nef* no era un gen esencial para la replicación viral (Fisher y cols.,1986; Tergiviller y cols.,1986). Basandose en sistemas de cultivos "in vitro" en los que se utilizan virus deletados en *nef* se postuló que Nef tenía una función de regulación negativa (Luciw y cols.,1987), -de donde su nombre, Nef por "negative factor"(Gallo y cols.,1988)- y actuaría como un represor de la transcripción viral (Haseltine.,1988; Ahmad y cols.,1988). Los trabajos iniciales no fueron confirmados por distintos autores (Kim y cols.,1989; Hammes y cols.,1989; Bachelerie y cols.,1990) y en la actualidad se piensa que *nef* es un gen esencial para la replicación del VIH cuyo papel no es en ningún caso el de regulador negativo. Aunque es cierto que en determinados sistemas celulares virus deletados en *nef* tienen una mayor replicación (Luciw y cols.,1987), "in vivo" parece existir un efecto contrario. Así, se ha demostrado que en macacos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), provirus que no expresan Nef son altamente defectivos en su replicación (Kestler y cols.,1991), aunque el mecanismo de este fenómeno es desconocido.

El gen *tat* codifica una proteína de 14 kD de localización nuclear que activa en trans la expresión del genoma del VIH (Sodroski y cols.,1985; Goh y cols.,1986; Arya y cols.,1986; Hauber y cols.,1987) La transactivación mediada por Tat requiere de un elemento en cis, la región TAR (trans activation response element o elemento de transactivación por Tat), localizada en la región +14/+44 a cuyo ARN la proteína Tat se une (Rosen y cols.,1985; Hauber y cols.,1988). El mecanismo de acción de Tat no es completamente conocido pero su expresión aumenta enormemente la transcripción del genoma viral. Este efecto parece ser

debido a un doble mecanismo: como iniciador de la transcripción (Hauber y cols.,1987; Rice y cols.,1988) y como elongador del ARNm naciente (Cullen y cols.,1986; Peterlin y cols.,1986; Rosen y cols.,1986; Kao y cols.,1987; Selby y cols.,1989; Braddock y cols., 1989).

El gen *rev* sintetiza una proteína nuclear de 20 kD que se acumula preferentemente en las estructuras nucleolares (Cullen y cols.,1988; Perkins y cols.,1989; Felber y cols.,1989). La proteína Rev es esencial para la replicación viral y se encuentra implicada en el procesamiento y transporte del ARNm del VIH (Feinberg y cols.,1986; Leim y cols.,1988; Malim y cols.,1989; Felber y cols.,1989; Chang y cols.,1990). Esta acción se produce mediante interacción con regiones del ARNm localizadas en las secuencias codificadoras para la región aminoterminal de la gp41 y denominadas RRE (elementos de respuesta a Rev) (Rosen y cols.,1988; Dayton y cols.,1989; Hadzopoulou y cols.,1989; Malim y cols.,1989). La interacción de la proteína Rev con estas estructuras permite la exportación del ARNm no procesado al citoplasma y su posterior procesamiento en los ARNs que codificarán por las diferentes proteínas estructurales y reguladoras del VIH (Arrigo y cols.,1989; Chang y cols.,1990; Felber y cols.,1990).

c. Las secuencias repetitivas largas (LTR).

A lo largo del proceso de retrotranscripción del ARN viral se produce una duplicación de las secuencias U3 y U5 que se sitúan adyacentes a la región R a ambas extremidades del genoma proviral (Coffin.,1990). La transcripción del VIH a partir de su forma de provirus integrado requiere de un dominio promotor - una secuencia que localiza la ARN polimerasa en el sitio de iniciación de la transcripción- y uno (o varios) dominios "enhancer" que facilitan la transcripción y que no necesitan estar situados en la proximidad del promotor al poder ejercer su función a distancia (Ptashne.,1988; Mitchell y Tjian.,1989; Lewin.,1990). Al estudiar la secuencia del LTR viral se ha definido fácilmente el dominio promotor del VIH que es una secuencia TATA clásica. Sin embargo la definición de las regiones enhancer en el LTR del VIH ha resultado mucho más compleja al contener éstas secuencias consenso para múltiples factores de transcripción (Gaynor.,1992). Es importante conocer cuáles de los elementos reguladores del VIH-LTR participan en la regulación positiva o negativa de la expresión génica. El análisis

de estas regiones ha permitido definir una serie de locus capaces de mediar una función enhancer y caracterizar parcialmente los factores de transcripción que se unen a estas secuencias reguladoras (Rosen y cols.,1985; García y cols.,1987).

En el genoma del VIH, la zona reguladora del LTR comprende la región situada entre las posiciones -454 y +184 (Ratner y cols.,1985; Sanchez-Pescador y cols.,1984; Wain-Hobson y cols.,1985) y se puede dividir a su vez en tres regiones basandose en los efectos globales de las mismas sobre la expresión viral: moduladora, (-454/-78), el núcleo promotor (-78/-1), y la región TAR (+1/+60) (Figura 3).

La región moduladora contiene al menos seis elementos definidos que unen los siguientes factores de transcripción (Tabla 4): Proteína activadora 1 (AP1) (Franza y cols.,1988); factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina aviar (COUP) (Orchard y cols.,1990; Cooney y cols.,1991); factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (Crabtree.,1988); factor estimulador "upstream" (USF) (Pognoner y Roeder.,1991; Smith y Greene.,1989); factor 1- α de linfocitos T (TCF-1 α) (Waterman y Jones.,1990; Waterman y cols.,1991); factor nuclear kappa-B (NF-kB) (Nabel y Baltimore.,1987; Kieran y cols.,1990; Ghosh y cols.,1990; Kawakami y cols.,1990). Además, la región moduladora contiene un elemento adicional de regulación negativa (NRE) descrito por distintos autores y localizado entre las posiciones -185 y -340 (Rosen y cols.,1985).

Algunos de estos elementos son críticos para regular la expresión del VIH en tipos celulares específicos como linfocitos y macrófagos en respuesta a distintos tipos de activación celular y son por tanto las secuencias que median una respuesta "inducible" del LTR. Sin embargo su capacidad funcional y su importancia relativa en la transactivación del LTR debe ser valorada en distintos sistemas celulares. Aunque estos elementos son capaces de unir factores de transcripción "in vitro", ésto no siempre conlleva una actividad funcional de los mismos.

El elemento promotor es esencial en la expresión basal e inducida por Tat del VIH-LTR. En él se encuentran tres consensos para el factor SP1 (Jones y cols.,1986; Harrich y cols.,1989; Kamine y cols.,1991; Southgate y Green.,1991), una secuencia TATA (García y cols.,1987, 1989; Jones y cols.,1988; Berkhout y Jeang.,1992) y un elemento iniciador (Jones y cols.,1988). Los factores celulares que se unen a esta región inducen la asociación con el complejo transcripcional primario permitiendo la transcripción mediada por la ARN-polimerasa II (Lewin., 1990; Meisterernst y Roeder., 1991; Pugh y Tjian.,1992).

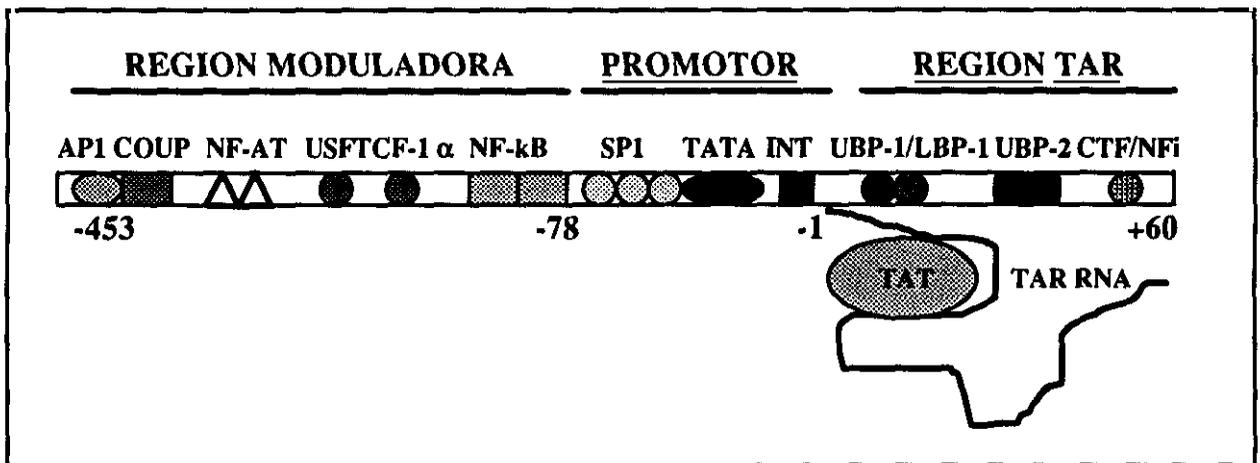
TABLA 4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE SE UNEN A LA REGIÓN MODULADORA DEL LTR DEL VIH.

REGION	NUCLEOTIDOS	PROTEINA (kD)	FUNCION
COUP (Promotor del gen de ovoalbumina)	-371/-334	COUP (68)	NEGATIVA
AP1 (Proteína activadora 1)	-347/-329	AP-1 (43)	?
NF-AT (Factor nuclear de células activadas)	-292/-255	NF-AT (90,45,23) ILF (60) ETS1 y 2 (55)	POSITIVA POSITIVA ?
REGION DE REGULACION NEGATIVA	-173/-160	USF (44/43) Otras proteínas hélice-asa-hélice	NEGATIVA POSITIVA ?
TCF-1 α (Factor de células T,1 α)	-139/-124	TCF-1 α (55)	POSITIVA
ENHANCER NF- κ B (Factor nuclear κ B)	-104/-81	Proteínas de la familia rel/NF- κ B (49,50,65,85) PRDII-BF-1 MBP-1 (300,200,70)	POSITIVA POSITIVA NEGATIVA ?

El elemento TAR es crítico para la activación mediada por la proteína viral Tat (García y cols., 1989; Berkhout y cols., 1989; Hauber y Cullen.,1988; Selby y cols.,1989). El ARN producido por el elemento TAR forma una estructura estable a la cual se une la proteína Tat (Feng y Holland.,1988; Roy y cols.,1990). Tat sería por lo tanto un enhancer ARN capaz de completar la elongación del ARN naciente (Berkhout y cols.,1989; Dingwall y cols.,1990; Sharp

y Marciniak.,1990; Jones.,1993; Cullen.,1993). A esta estructura se une no sólo la proteína viral Tat sino una serie de factores celulares (TRP-185 y p68) (Wu y cols.,1991; Sheline y cols.,1991; Gatignol y cols.,1989; Marciniak y cols.,1990). Además otros factores celulares (UBP-1 y LBP-1) (Wu y cols., 1988; Pognonec y Roeder.,1991) se unen al ADN de TAR y colaboran en la formación del complejo transcripcional primario

Figura 3.ESQUEMA DEL LTR DEL VIH



1.5. Ciclo biológico del VIH.

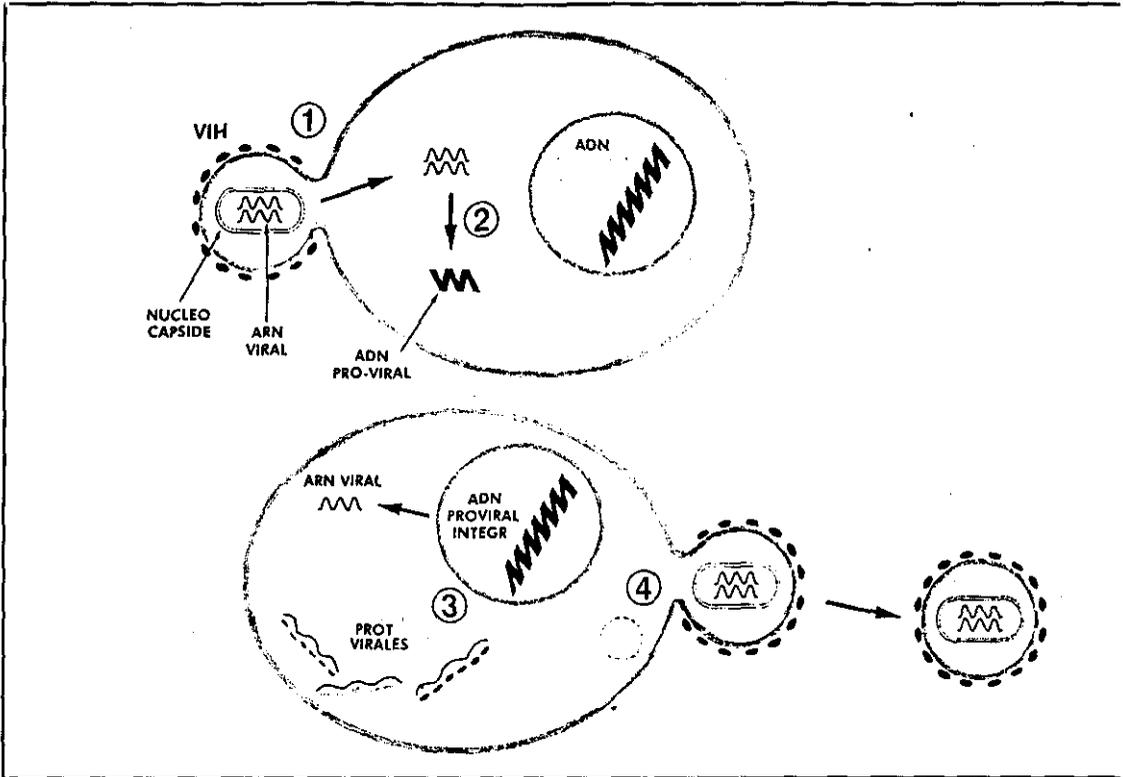
El ciclo biológico del VIH puede ser dividido en dos etapas: la primera culmina con la integración del genoma viral en el ADN del huésped. A partir de este momento el VIH puede permanecer en un estado de latencia, sin replicación viral detectable o iniciar su replicación activa en lo que constituye la segunda fase del ciclo biológico del virus (Figura 4).

a. Interacción con el receptor e infección celular.

La entrada del virus en la célula tiene como primer paso la interacción con un receptor viral específico, la molécula de CD4 (Dalglish y cols.,1984; Klatzmann y cols., 1984a, 1984b). Esta proteína se encuentra presente esencialmente en la superficie de linfocitos CD4 y células de la estirpe mononuclear-fagocítica lo que determina el tropismo viral por estos tipos celulares

(Klatzmann y cols.,1984a, Sattentau y cols.,1986; Popovic y Gatner.,1987; O'Brien y cols.,1990; Perno y cols.,1990).

Figura 4. CICLO BIOLÓGICO DEL VIH



Fases del ciclo biológico del VIH: 1. Entrada. 2. Retrotranscripción e Integración. 3. Transcripción del genoma viral y síntesis de proteínas virales. 4. Gemación.

La interacción CD4-gp120 se produce entre el dominio V1 de la molécula de CD4 y los aminoácidos 413-447 de la gp120, situados en la cuarta región de la molécula y próxima al dominio carboxi-terminal (Clayton y cols.,1988; Lasky y cols.,1987; Sattentau y cols.,1986; Sattentau y Weiss.,1988; Mizukami y cols., 1988; Bowman y cols., 1990; Arthos y cols., 1989; Capon y Ward., 1991) Sin embargo, dado que la conformación tridimensional de la gp120 es esencial para la unión a la molécula de CD4, modificaciones de la proteína viral alejadas de la zona de unión pero que modifican su estructura terciaria impiden la interacción CD4-gp120 (Kowalski y cols., 1987; Richardson y cols., 1988; Eiden y Lifson.,1992, O'Brien y cols., 1990). Asimismo se ha demostrado que modificaciones mínimas en la gp120 condicionan el tropismo viral por linfocitos o macrófagos (Cordonnier y cols., 1989; Olshevsky y cols.,1989).

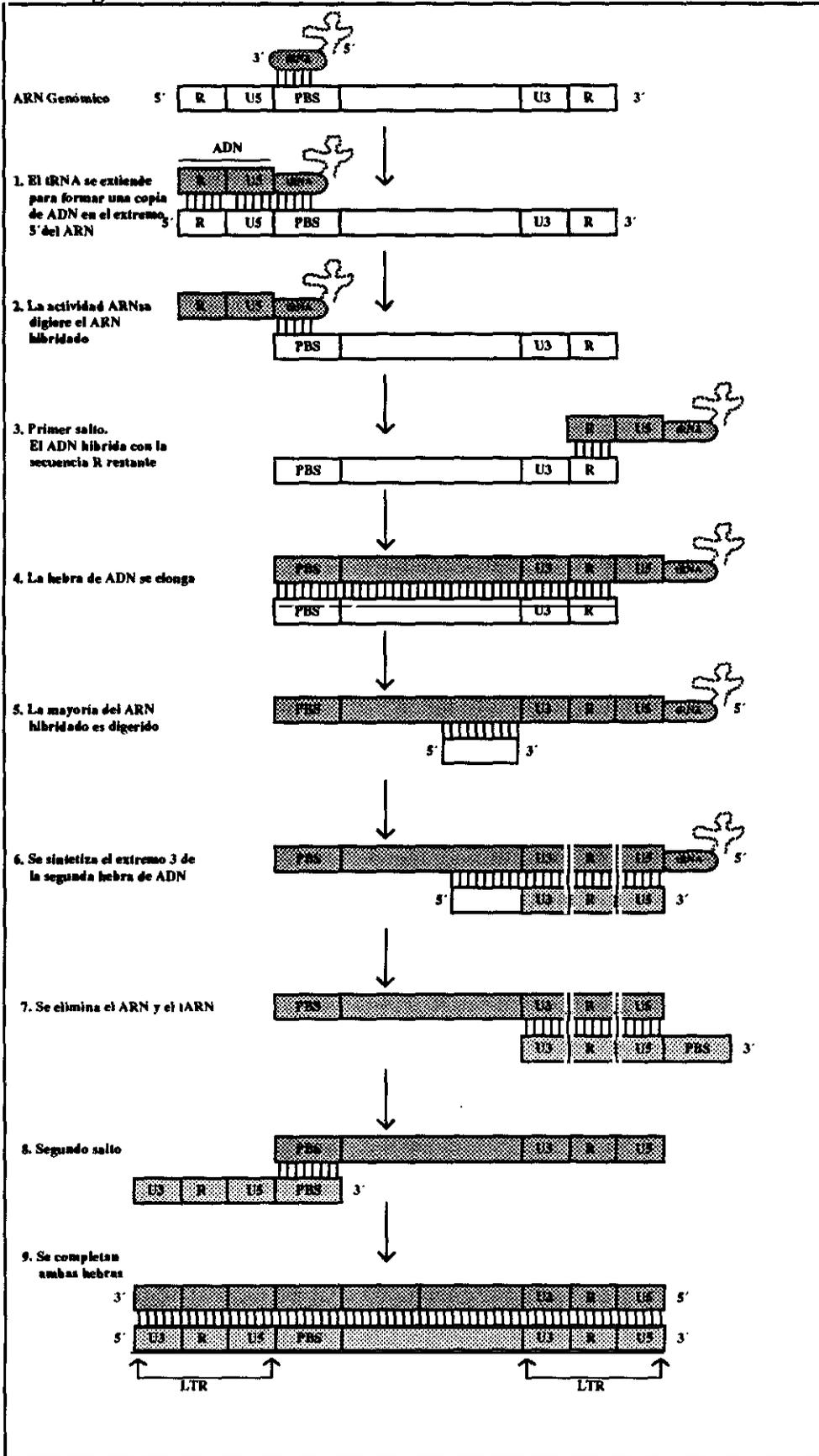
La unión de la gp120 al receptor CD4 origina un cambio conformacional de la proteína viral que permite la proteólisis de la misma a nivel del dominio V3 (Moore y cols., 1991). Este proceso permite la interacción de la gp41 con la membrana celular lo que origina una fusión de las membranas viral y celular (Gallaher.,1987; Gonzalez-Scarano y cols.,1987; Pérez y cols.,1992).

b. Retrotranscripción e integración.

Una vez que la nucleocapside viral penetra en la célula se produce la retrotranscripción de una de las hebras de ARN viral mediante la enzima TI que es transportada en el propio virión (Varmus.,1988). La retrotranscripción supone un complejo proceso que se realiza en el citoplasma celular y que se inicia con la utilización como cebador de un ARN de transferencia (ARNt) que se une al ARN viral en la región 3' adyacente a la secuencia U5 (Panganiban y cols.,1988). En nueve pasos y mediante la utilización de sus actividades ADN polimerasa y ARNasa, la TI genera una doble hebra de ADN que duplica los LTR que se sitúan en ambas extremidades del genoma proviral (Fig.5).

Se ha demostrado que el proceso de retrotranscripción e integración es dependiente de la activación celular aunque los requerimientos varían según el tipo celular considerado. En linfocitos CD4 en reposo, una vez internalizado, el genoma viral es retrotranscrito de forma incompleta y no se produce la finalización de la retrotranscripción y la integración a menos que la célula sea activada (Zack y cols., 1990; 1992). De hecho, se ha demostrado en linfocitos de sangre periférica de pacientes seropositivos la existencia de ADN proviral no integrado que es susceptible de integración y replicación si dichas células son activadas (Bubrinisky y cols.,1991). Estas formas provirales no integradas pueden permanecer en el citosol celular hasta dos semanas para algunos autores (Bubrinisky y cols.,1991) y constituyen un reservorio potencial del VIH.

Figura 5. MECANISMO DE RETROTRANSCRIPCIÓN



c. Replicación viral.

La replicación del VIH está sometida a un estrecho proceso de control debido a factores celulares y virales y que podemos sistematizar en distintas etapas:

- Iniciación de la transcripción.
- Transcripción del genoma viral y síntesis de proteínas reguladoras y estructurales.
- Formación y maduración de viriones.

c.1. Iniciación de la transcripción.

La iniciación de la transcripción del genoma del VIH es dependiente de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en el LTR (Gaynor.,1992). Estos factores actúan a nivel de las secuencias enhancer y promotor del LTR y permiten la formación y activación del complejo transcripcional primario de la ARN polimerasa II. De entre los múltiples factores de transcripción descritos capaces de unirse a las secuencias reguladoras del VIH, el principal elemento "enhancer" demostrado corresponde al factor de transcripción NF-kB (Nabel y Baltimore.,1987; Lenardo and Baltimore.,1989). El papel de NF-kB en la iniciación de la transcripción constituye el tema central de este trabajo y se analiza en detalle más adelante.

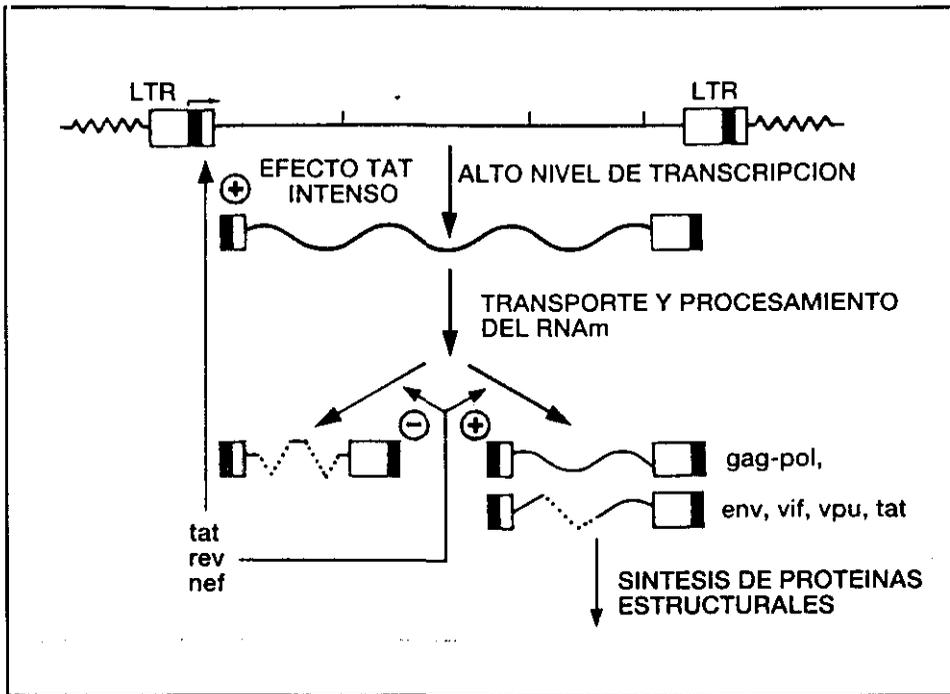
c.2. Transcripción del genoma viral y síntesis de proteínas reguladoras y estructurales.

Una vez iniciada la transcripción del genoma viral la regulación en la expresión completa del mismo se produce esencialmente por la acción de dos genes reguladores Tat y Rev (Figura 6). *Tat* codifica por una proteína de 15 kD que es un potente transactivador que aumenta la transcripción del genoma viral del orden de $10^3 / 10^4$ veces (Sodroski y cols.,1985; Goh y cols.,1986; Arya y cols.,1986; Hauber y cols.,1987; Jones.,1993; 3). La diana de Tat es la secuencia TAR, situada en la región +1/+64, es decir inmediatamente después del sitio de iniciación de la transcripción. Los primeros 59 nucleótidos de los transcritos del VIH configuran una estructura del ARN que permite la interacción con la proteína Tat. El transactivador del VIH es por lo tanto un "enhancer" ARN (Rosen y cols.,1985; Hauber y

cols.,1988; Sharp y Marciniak.,1989; Cullen.,1993). El mecanismo de acción de Tat no se encuentra completamente dilucidado y probablemente actúe a distintos niveles. Inicialmente se demostró que Tat aumentaba la tasa de transcripción del genoma del VIH y que dicho efecto era debido a una mayor elongación de los transcritos de ARNm. En ausencia de Tat se produce una elongación incompleta del ARNm y la presencia de Tat permite que su síntesis alcance la longitud correspondiente a todo el genoma viral (Cullen y cols.,1986; Peterlin y cols.,1986; Rosen y cols.,1986; Kao y cols.,1987; Selby y cols.,1989; Braddock y cols., 1989). Por este motivo se denominó a esta proteína Tat (por Transcription anti-terminator). Junto a este efecto "elongador" muchos datos experimentales apuntan a que Tat probablemente actúa asimismo a nivel de la iniciación de la transcripción (Hauber y cols.,1987; Rice y cols.,1988; Cullen.,1991;1993).

En este sentido se ha descrito la interacción, o la dependencia de Tat de secuencias localizadas en el LTR viral como Sp1 y NF-kB y el sinergismo entre la proteína Tat y factores transcripcionales que se unen a estas secuencias consenso (Berkhout y cols.,1990;Harrich y cols.,1990; Bachelerie y cols.,1991; Liu y cols.,1992; Berkhout y Keang.,1992; Kamine y Chinnadurai.,1992; Taylor.,1992). Recientemente se ha demostrado una interacción directa entre Tat y la proteína TFIID perteneciente al complejo transcripcional primario (Kashanchi y cols.,1994). Todos estos datos apuntan a la existencia de una colaboración a nivel de iniciación de la transcripción entre distintos factores celulares y la proteína transactivadora Tat (Wu y cols.,1991; Sheline y cols.,1991; Gatignol y cols.,1989; Marciniak y cols.,1990; Wu y cols., 1988; Pognonec y Roeder.,1991). La producción del ARN naciente permitiría en un segundo paso la unión de Tat a su secuencia diana en el ARN y la elongación completa del mismo (Sharp y Marciniak.,1991; Cullen.,1991). La proteína transactivadora Tat es uno de los elementos esenciales en la replicación del VIH por lo que el estudio de los mecanismos de acción de la misma es un elemento decisivo en la comprensión de los mecanismos de reactivación del VIH (Cullen.,1993).

Figura 6. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL VIH



El ARNm del VIH se sintetiza en forma de un único transcrito que debe ser procesado en los transcritos de distinto tamaño que permitirán la síntesis de las proteínas reguladoras y estructurales del VIH (Cullen y Greene.,1989). La proteína Rev desempeña un papel central en este procesamiento. Rev es una proteína de 19kD, intensamente fosforilada que tiene una localización nuclear y particularmente nucleolar (Cullen y cols.,1988; Perkins y cols.,1989; Felber y cols.,1989). La expresión de la proteína Rev permite el transporte al citosol y el procesamiento del ARN mensajero (Feinberg y cols.,1986; Leim y cols.,1988; Malim y cols.,1989; Felber y cols.,1989; Chang y cols.,1990). La diana de Rev se encuentra en el ARN viral a nivel de las secuencias de *env*. En esta región se define una zona denominada RRE (Rev responsive element) a la que se une la proteína Rev, quizás directamente o alterando la actividad de una proteína celular de unión a ARN (Rosen y cols.,1988; Dayton y cols.,1989; Hadzopoulou y cols.,1989; Malim y cols.,1989). La acción de Rev explicaría el que en determinados modelos experimentales existe una fuerte expresión de ARNm en ausencia de traducción proteica. Este mecanismo permitiría en la célula infectada una acumulación del

ARNm viral cuya traducción se realizaría masivamente en presencia de la proteína Rev (Arrigo y cols.,1989; Chang y cols.,1990; Felber y cols.,1990).

Este retraso en la producción de proteínas estructurales del virus sería seguido por una producción masiva de la expresión proteica en un periodo breve de tiempo. Esto conllevaría por una parte la destrucción celular por efecto citopático, y por otra el escape de la célula infectada a los mecanismos de reconocimiento inmune al no producirse una expresión de proteínas en la membrana celular previamente a la replicación masiva del virus (Cullen y Greene.,1989).

c.3. Maduración de viriones.

Además del papel central de Rev en la regulación de la producción de las proteínas estructurales del VIH, éstas deben ser procesadas postraduccionalmente antes de ensamblarse en lo que constituirán las partículas virales maduras. En este proceso participan distintas proteínas virales entre las que destacan Vif, Vpu y la Proteasa viral. El producto del gen *vif* no es esencial para la replicación viral ni disminuye el efecto citopático observado en linfocitos T infectados. Sin embargo los virus deletados en *vif* disminuyen su infectividad entre 100 y 1000 veces y su propagación en el cultivo celular es fundamentalmente debido a contactos intercelulares y no mediante partículas solubles (Strebel y cols.,1987; Fisher y cols.,1987).

El gen *vpu* tampoco es esencial para la replicación del VIH, pero su ausencia origina una acumulación de proteínas en el citoplasma de la célula infectada y una menor producción de viriones (Strebel y cols.,1988; Klimkatt y cols.,1990).

La Proteasa viral desempeña un papel central en la producción de partículas virales infectivas. Interviene en el procesamiento de los precursores p55 y gp160 producidos por los genes *gag* y *env*. El procesamiento de la gp160 en gp41 y gp120 se produce en el momento final de maduración de las partículas virales, previamente a la gemación y su acción permite constituir una partícula viral madura y de estructura normal (Loeb y cols.,1989; Kohl y

cols.,1988). En ausencia de acción de la Proteasa viral se obtiene una producción de proteínas y ARN viral libre o ensamblado de manera imperfecta en viriones no maduros y que carecen de capacidad infecciosa.

1.6. Latencia y reactivación del VIH.

a. Células diana.

Al igual que la mayoría de los lentivirus y otros virus, el VIH puede permanecer en estado latente en sus células diana y ser susceptible de reactivación en función del estado de activación de la célula infectada (Haase.,1986; Virelizier.,1990). El comportamiento biológico del VIH parece ser diferente según sea el tipo celular infectado. Los linfocitos CD4 tanto de ganglios linfáticos como en sangre periférica se encuentran infectados por el VIH en forma mayoritariamente latente (Harper y cols.,1986; Psalidopoulos y cols.,1989). En linfocitos circulantes se ha demostrado que el ADN proviral puede encontrarse integrado o no integrado siendo este último susceptible de integración si la célula es activada (Bubrinsky y cols.,1991; Zack y cols.,1990, 1992). Por el contrario los macrófagos tisulares replican el VIH "in vivo" (Price y cols.,1988; Koenig y cols.,1986) por lo que se postula que en estas células la latencia viral no existiría y que el VIH tras su integración entraría directamente en fase de replicación activa (Gendelman y cols.,1989; Gartner y cols.,1986). Sin embargo, no puede descartarse que en determinadas poblaciones macrofágicas exista una latencia viral al igual que en linfocitos CD4 (Moses y cols.,1994).

b. El reservorio viral.

Uno de los aspectos de la patogenia de la infección VIH peor comprendidos ha sido el bajo número detectable de células infectadas. Los trabajos iniciales mostraron que apenas 1/1000 linfocitos de sangre periférica se encontraban infectados por el VIH, y de estos menos del 1/100 replicaban activamente el virus (es decir menos de 1/100.000 linfocitos) (Harper y cols.,1986). La aplicación de técnicas de mayor sensibilidad como la PCR permitieron demostrar que la frecuencia de infección de los linfocitos CD4 variaba entre 1/800 en pacientes

asintomáticos a 1-3/100 en pacientes con SIDA (Psallidopoulos y cols.,1989; Schnittman y cols.,1989; 1990; Bubrinsky y cols.,1991). Sin embargo el número de células infectadas parecía anormalmente bajo para explicar la destrucción masiva del sistema inmune originada por el VIH. Recientemente se ha demostrado que la carga viral se encuentra localizada en los ganglios linfáticos que constituyen el 98% de los linfocitos totales del organismo (Embretson y cols.,1993; Pantaleo y cols.,1991). En los órganos linfoides hasta un 40% de los linfocitos CD4 se encuentran infectados desde los primeros estadios de la enfermedad. Existe además una enorme cantidad de virus libre "atrapado" en las prolongaciones interdigitantes de las células dendríticas. Sin embargo, el número de linfocitos que replican activamente el VIH es muy reducido, entre el 0.3 y el 3% de las células infectadas (Embretson y cols.,1993). Estos datos apoyaría la hipótesis según la cual el sistema inmune es destruido directamente por el virus (efecto citopático directo), pero confirman que en la mayoría de los linfocitos CD4 infectados existe un estado de latencia real, al menos en algunos momentos de su evolución.

c. Latencia celular y latencia clínica

La existencia de una latencia real en la infección por el VIH ha sido muy debatida. Basandose en los datos expuestos previamente es importante distinguir entre la latencia virológica a nivel celular y la latencia clínica. La latencia celular es un fenómeno real que ha sido demostrado "in vivo" en linfocitos CD4 (Harper y cols.,1986; Schnittman y cols.,1989; 1990; Bubrinsky y cols.,1991). El entorno celular de los linfocitos T en reposo constituye un contexto biológico especialmente adecuado para la latencia debido a la ausencia de los factores necesarios para la replicación del VIH (Virelizier.,1990). Esto se ve correlacionado por los estudios "in vitro" y "ex vivo" en los que el cultivo de linfocitos de sangre periférica en fase de reposo no permite detectar ningún tipo de producción viral. Sin embargo, la activación de las mismas células mediante mitógenos, presentación antigénica o anticuerpos dirigidos contra el complejo CD3/Ti originan una replicación viral masiva (Barré-Sinoussi y cols. 1983; Popovic y cols.,1984; McDougal y cols.,1985; Folks y cols.,1986, Zack y cols.,1990; Bubrinsky y cols.,1991; Saksela y cols.,1993). Esto es debido a que la activación celular produce en los linfocitos T la inducción de citokinas, receptores de citokinas, factores de transcripción, proto-

oncogenes y moléculas de activación en la superficie celular (Crabtree.,1989). Así como el linfocito T en reposo presenta un ambiente celular adecuado para la latencia, el contexto biológico del linfocito T activado suministra todos los factores necesarios para permitir una replicación masiva del VIH. El linfocito T CD4 representa probablemente el reservorio más importante del VIH al permitir la latencia viral en su estado de reposo y una replicación viral masiva en el curso de los procesos de activación inmune.

Desde el punto de vista clínico es correcto afirmar que la latencia viral no existe al ser posible aislar el VIH en todos los estadios de la enfermedad (Ho y cols.,1989). Esto es debido a que en el organismo se produce la resultante del estado de replicación en todas las células infectadas por el VIH. En cada momento, aunque exista un número mayoritario de células infectadas de forma latente, existen asimismo macrófagos tisulares que soportan la replicación activa del VIH y linfocitos CD4 que están siendo activados y por lo tanto replican el virus. Sin embargo, estos datos no contradicen la existencia a nivel de cada célula individual de un proceso de latencia viral en la infección por el VIH. Es probablemente debido a esta latencia por lo que la enfermedad no presenta un curso fulminante sino un carácter insidioso, crónico y progresivo. La comprensión de los mecanismos moleculares que permiten la latencia y que median la reactivación del VIH representan por lo tanto un problema central en la comprensión de los mecanismos patogénicos responsables del desarrollo del SIDA.

1.7. El factor de transcripción NF-kB.

a. Generalidades.

Aunque la síntesis, procesamiento y transporte del ARNm se encuentra regulada por factores virales, la iniciación de la transcripción del VIH es estrictamente dependiente de factores celulares. Entre los factores capaces de transactivar el LTR del VIH, el principal elemento inducible implicado en la reactivación del VIH a partir de su estado de latencia es el factor de transcripción NF-kB (Nabel y Baltimore.,1987; Lenardo y Baltimore.,1989).

El factor de transcripción NF-kB fue inicialmente descrito como un elemento regulador de la transcripción de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas (Sen y Baltimore.,1986). Posteriormente se describieron consensos NF-kB en los promotores de múltiples genes celulares y virales (Tabla 5). De forma característica, muchos de los genes regulados por NF-kB se encuentran implicados en la regulación de la respuesta inmune y en el desarrollo embrionario (Grilli y cols.,1993; Nolan y Baltimore.,1992). Genes NF-kB dependientes son los correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), citokinas, receptores de citokinas, receptor de la célula T. Esto apunta a que NF-kB es un factor importante en la regulación de la expresión de los genes de respuesta inmune que son inducidas en el curso de los fenómenos de activación celular.

El consenso NF-kB viene definido por la secuencia GGG R(A_T)T YYC C y existen variaciones sobre este consenso en las regiones reguladoras de los diferentes genes (Tabla 5). Estas variaciones parecen implicadas en la regulación diferencial de la expresión de los distintos genes por las diferentes formas moleculares de NF-kB. Así, algunos consensos favorecerían la asociación con determinados complejos proteicos NF-kB y la actividad funcional de los mismos variaría de acuerdo a las secuencias consenso consideradas (Liou y Baltimore.,1993).

Tabla 5. GENES Y VIRUS NF-kB DEPENDIENTES Y SUS CONSENSOS

Gen	Consenso
Cadena kappa de inmunoglobulinas de ratón SV40 VIH-1 (-91) Citomegalovirus	(G)GGGACTTTCC
VIH-1 (-105) VIH-2 Citomegalovirus β_2 -microglobulina Amiloide sérico A	(A)GGGACTTTCC
Cadena kappa de inmunoglobulinas humanas Citomegalovirus Cadena beta del receptor de la célula T Cadena invariante del MHC clase II	GGGGACTTTCC
Interferón β	GGGAAATTCC
Citomegalovirus	GGGACTTTCC
MHC clase II (E α)	GGGACTTCCC
Interleukina 2	GGGATTTCAC
Receptor de interleukina 2 de ratón	GGGGATTCTT
Receptor de interleukina 2 humana	GGGAATCTCC
MHC clase I de ratón (H2-k) MHC clase I humano	GGGATTCCCC
Consenso	C GGGRATYYCC T

b. La familia rel/NF-kB.

El clonaje y caracterización de NF-kB demostró que la actividad "enhancer" descrita corresponde en realidad a una familia de factores de transcripción que guarda homologías con la familia de proto-oncogenes c-rel y dorsal. Tras el clonaje de la subunidad p50 de NF-kB

(Kieran y cols.,1990; Gosh y cols.,1990) se ha realizado la caracterización de otros miembros de la familia rel/NF-kB (Tabla 6). Estas proteínas pueden combinarse entre ellas formando homo o heterodímeros y la capacidad transcripcional de los mismos varía según la composición de los complejos y el consenso al que se unen (Grilli y cols.,1993; Perkins y col.,1992; Fujita y cols.,1992) (Tabla 7). Comparten una región de homología de aproximadamente 300 aminoácidos en la cual tienen alrededor de un 54% de identidad (región de homología Rel). El dominio común Rel confiere muchas de las propiedades de estas proteínas: el reconocimiento del sitio de unión al ADN, la capacidad de dimerización, la localización nuclear y su interacción con las moléculas de tipo IκB (inhibidores de NF-kB) (Nolan y Baltimore.,1992; Liou y Baltimore.,1993).

Tabla 6. LA FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Rel/NF-kB

Nombre común	Proteína	Gen
NF-kB	p50	NF-kB1
	p65	relA
	p105 (precursor de p50)	NF-kB1
Lyt-10 (p100)	p100(precursor de p49/p52)	NF-kB2
	p49/p52	NF-kB2
c-rel	c-Rel	c-rel
relB	RelB	relB
dorsal	Dorsal	dorsal

La proteína p105, precursora de la p50, contienen en su molécula tanto funciones activadoras como inhibitoras: el dominio amino-terminal contiene la p50, una subunidad del factor transcripcional NF-kB, mientras que el dominio carboxi-terminal contiene repeticiones de ankirinas que se encuentran habitualmente en las proteínas de tipo IκB (Henkel y cols.,1992; Inoue y cols.,1992; Liou y cols.,1992; Rice y cols.,1992; Fan y Maniatis.,1991).

El precursor preproteico p100 fue clonado como un oncogen putativo (lyt10) (Neri y cols.,1991) a partir de la translocación cromosómica en un linfoma de células B y tiene una estructura similar a la p105. Su proteolisis da lugar a la proteína p49/p52 (Schmid y cols.,1991; Bours y cols.,1992).

El resto de factores no son procesados por proteolisis a partir de precursores. La subunidad p65 de NF- κ B tiene una región carboxi-terminal rica en residuos acídicos que constituyen un dominio de activación transcripcional (Nolan y cols.,1991; Hansen y cols.,1992; Fujita y cols.,1992).

Tabla 7. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS DISTINTOS COMPLEJOS DE LA FAMILIA Rel/NF- κ B

Complejo	Sitios de unión	Actividad transcripcional*	Complejo	Sitios de unión	Actividad transcripcional*	
p50/p65	IL-2	+	p52/c-rel	IL2R	ND	
	IL2R	+	p65/c-rel	Urokinasa	+(?)	
	IL-6	+		(p50) ₂	Ig/VIH	+
	Urokinasa	+	IL-2		ND	
	Ig/VIH	+	IL2R		ND	
	IFN- β	+	IFN- β		+/-	
P52/P65	H2	+	(p52) ₂	H2	+	
	Ig/VIH	+		Ig/VIH	+/-	
	H2	+/-		H2	+/-	
	IL-2R	+/-		IL2R	ND	
p50/RelB	Palíndromo	+/-	(p65) ₂	Ig/VIH	+	
	Ig/VIH	+		IFN- β	+	
p52/RelB	Palíndromo	+	(c-rel) ₂	IL2R	+	
	Ig/VIH	+		IL6	-	
p52/p50	Palíndromo	+/-		Ig/VIH	ND	
	Ig/VIH	+/-				
p50/c-rel	Ig/VIH	ND				

*Por ensayos de transfección transitoria o transcripción "in vitro":ND: no demostrada; + positiva; - represora, +/- nula

El proto-oncogen c-rel (Nakayama y cols.,1992; Tan y cols.,1992) fue identificado a partir de su oncogén homólogo v-rel que produce linfomas malignos en pollos (Kamens y

cols.,1990). RelB (Ryseck y cols.,1992) fue aislado a partir de una librería de fibroblastos murinos inducidos con suero. Tiene mayor homología con c-rel aunque contiene un dominio "leucine zipper" y un dominio de activación carboxi-terminal.

El gen de *Drosophila* dorsal está implicado en la formación del eje dorso-ventral en la mosca durante el desarrollo embrionario (Rushow y cols.,1989).

c. La familia de proteínas IκB (inhibidores de NF-κB).

Este grupo de proteínas se define por su capacidad funcional para unir elementos de la familia NF-κB (Tabla 8). Está formada por IκB-α, IκB-β, IκB-γ (extremo carboxi-terminal de la p105), el proto-oncogen Bcl3 y el gen de *Drosophila*, cactus (Nolan y Baltimore.,1992; Liou y Baltimore.,1993).

Las proteínas IκB identificadas hasta el momento contienen entre cinco y siete repeticiones de motivos ankirina de 33 aminoácidos. Estas repeticiones ankirina son necesarias para interaccionar con los dominios rel comunes a toda la familia rel/NF-κB, pero la forma exacta de esta interacción no es bien conocida. Las señales de localización nuclear de las proteínas rel/NF-κB son necesarias para interaccionar con los distintos IκB y se verían "enmascaradas" durante este proceso, lo que explicaría la capacidad de las proteínas inhibidoras para retener los complejos rel/NF-κB en el citosol (Beg y cols.,1992).

Existe una cierta especificidad en la interacción de los diferentes IκB con las proteínas de la familia rel/NF-κB: IκB-α interacciona con complejos que contienen entre sus subunidades c-rel o p65 (incluyendo los heterodímeros con p50) (Haskill y cols.,1991; Beg y cols.,1992). Bcl3 e IκB-γ interactúan preferentemente con las proteínas p50 y p52 (Franzoso y cols.,1992; Liou y cols.,1993; Nolan y cols.,1993) (Tabla 8).

El gen de IκB-β no ha sido clonado todavía. El gen que codifica por IκB-α (MAD3) fue clonado a partir de una librería obtenida de macrófagos adherentes como un gen de

activación temprana (Haskill y cols.,1991). La región terminal de la p105 tiene actividad I κ B (Henkel y cols.,1992; Inoue y cols.,1992; Rice y cols.,1992). El proto-oncogen Bcl3 fue identificado en el punto de fractura de una translocación 14:19 en la región IgH- α de una leucemia de células B (Ohno y cols.,1990). El gen de drosophila, cactus, se identificó genéticamente como un regulador negativo de dorsal (Gesler y cols., 1992; Kidd.,1992).

Tabla 8. PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD I κ B

Proteínas	Proteínas a las que se une
I κ B- α (MAD3)	p65, c-rel y sus complejos
I κ B- β	p65 y sus complejos (?)
I κ B- γ	p50, p52
Bcl-3	p50, p52
Cactus	dorsal

d. Regulación de las proteínas de la familia NF- κ B.

La actividad de los factores de la familia rel/NF- κ B es regulada por distintos mecanismos: - regulación de la transcripción

- regulación de la translocación nuclear
- composición de los complejos y variaciones en la secuencia consenso
- interacción con otras proteínas

d.1.Regulación transcripcional.

El control transcripcional es un mecanismo esencial de regulación génica. La expresión diferencial de determinados miembros de la familia rel/NF- κ B e I κ B en distintos tejidos y en diferentes estados de desarrollo condicionará la formación de los diferentes complejos y la activación de distintos genes κ B-dependientes. Aunque algunos complejos de la familia rel/NF- κ B como p50/p65 son detectables en el citosol de todos los tipos celulares estudiados, otros

componentes se inducen por distintos estímulos. Así, la activación linfocitaria y monocitaria origina una inducción transcripcional de p105, p100, c-rel e I κ B- α (Bours y cols.,1992; Payá y cols.,1992; Haskill y cols.,1991; Schmidt y cols.,1991; Baldwin y cols.,1991).

Existe también una regulación en la expresión de los distintos elementos rel/NF- κ B según el estadio de diferenciación. En las células B existe un control complejo de la regulación de las proteínas rel/NF- κ B: en células pre-B, existen complejos p50/p65 en el citosol que pueden ser translocados mediante activación con LPS. Sin embargo en las células B diferenciadas aparece una actividad rel/NF- κ B formada por complejos p50/c-rel (Liou y Baltimore.,1993).

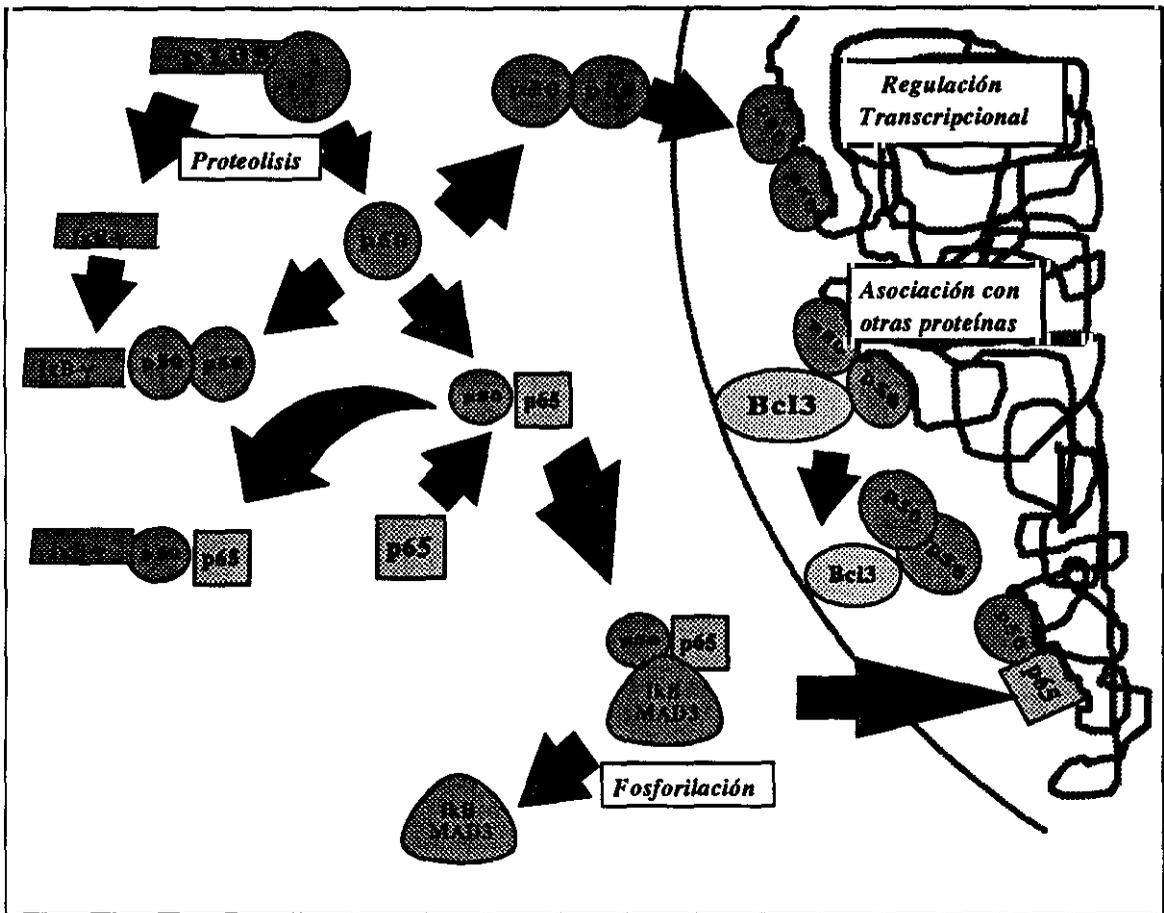
d.2.Regulación de la translocación nuclear.

Se ha descrito la localización nuclear de factores NF- κ B en un número reducido de tipos celulares, esencialmente linfocitos B y células de estirpe mielomonocítica (Liou y Baltimore.,1993; Griffin y cols.,1989). Sin embargo, en todas las células estudiadas hasta el momento se ha detectado la presencia de factores rel/NF- κ B en el citosol. Estos factores pueden ser translocados al núcleo en el curso de los procesos de activación celular donde actúan sobre sus dianas en las regiones reguladoras de los distintos genes κ B-dependientes (Virelizier y cols.,1990, Schutze y cols.,1992; Mathias y cols.,1993). La regulación de los factores rel/NF- κ B se produce esencialmente mediante el secuestro de los mismos en el compartimento citoplásmico de la célula (Figura 7) debido a su unión con las proteínas de la serie I κ B (Tabla 8).

La regulación de la translocación de NF- κ B se realiza por dos mecanismos: proteólisis y fosforilación. Las moléculas de p50 y p49 son sintetizadas como precursores de 105 y 100kD de peso molecular respectivamente y tienen una localización citosólica. La proteólisis de los precursores permite que las señales de localización nuclear (NLS) transloquen las subunidades p50 y p49 al núcleo celular (Henkel y cols.,1992; Neumann y cols.,1992; Inoue y cols.,1992; Liou y cols.,1992; Rice y cols.,1992).

El segundo mecanismo es el de fosforilación. Las proteínas p50, p49 y c-rel pueden formar heterodímeros con la subunidad p65. Esta a su vez puede interactuar con proteínas I κ B (I κ B α , I κ B β) que retienen el complejo en el citosol celular. Esta unión I κ B-p50/p65 puede ser rota mediante la fosforilación de I κ B. In vitro se ha demostrado que tanto proteín kinasas C, A, ζ y caseín kinasas II pueden mediar este proceso (Ghosh y Baltimore., 1990; Link y cols.,1992; Diaz-Meco y cols.,1993). La activación de dichas kinasas se produce en el curso de los procesos de activación celular, especialmente durante los fenómenos de reconocimiento inmune y los inducidos por citocinas (Tong-Starsken y cols.,1989; Hazan y cols.1990; Osborn y cols.,1991; Schutze y cols.,1992; Mathias y cols.,1993; Diaz-Meco y cols.,1993; Arenzana-Seisdedos y cols.,1993; Beggy cols.,1993). La fosforilación de I κ B y la consiguiente translocación de NF- κ B puede representar un elemento común a la regulación de los mecanismos de activación inmunológico y a la reactivación del VIH.

Figura 7. REGULACIÓN DE NF- κ B



d.3. Composición de los complejos y variaciones en el consenso.

La especificidad en la activación de diferentes genes puede ser función de la composición de los complejos de la familia rel/NF- κ B. Aunque agrupados en la misma familia, cada proteína individual rel/NF- κ B o cada complejo heterodimérico puede diferir de los demás en cuanto a su afinidad de unión a diferentes consensos, interacción con otras proteínas o actividad transcripcional en un consenso κ B determinado. Son estas diferencias entre los distintos consensos y complejos proteicos las que condicionarían la expresión diferencial de los distintos genes κ B-dependientes en función del tipo celular y del estado de activación (Tabla 7) (Kang y cols.,1992; Hansen y cols.,1992; Fujita y cols.,1992; Khretzschmar y cols.,1992; Nakayama y cols.,1992; Perkins y cols.,1992; Tan y cols.,1992).

Esta hipótesis se ve apoyada por los siguientes datos experimentales: en primer lugar, no existe una asociación aleatoria de todas las combinaciones posibles entre los miembros de la familia rel/NF- κ B. Así, no existen homodímeros de RelB, y esta proteína no puede formar heterodímeros con p65 o c-rel, aunque sí con p50 y p52 (Ryseck y cols.,1992); en segundo lugar, la afinidad respecto a los diferentes consensos es diferente según la composición de los complejos; por último, la actividad transcripcional de un complejo dado varía según sea el consenso al que se une. Ejemplos de esto lo constituyen los homodímeros de p50, que son transcripcionalmente activos sobre el gen de H2 y Ig/VIH, pero no inducen el promotor del interferón β (Fujita y cols.,1992); también los heterodímeros de p50/p65 y p52/p65, que pueden unir prácticamente todos los consensos descritos aunque sólo los heterodímeros p50/p65 son activos sobre los promotores de H2 e IL2R (Perkins y cols.,1992; Schmidt y cols.,1991).

d.4. Interacción con otras proteínas.

Las proteínas rel/NF- κ B interaccionan con otras proteínas no sólo en el caso de su regulación negativa con las proteínas de tipo I κ B sino con otras que pueden actuar como cofactores en la transcripción de los genes κ B-dependientes. Se han descrito interacciones proteína-proteína entre p65 y el factor de transcripción AP1 en la regulación del gen del receptor de interleukina 2 (Stein y cols.,1993); existe una cooperación en la inducción del gen

de interferón β entre p50/p65 y la proteína HMG I(Y) mediante la unión de ésta a la hélice menor del consenso kB (Thanos y Maniatis.,1992); una interacción entre p50 y el factor NF-IL6 ha sido descrita "in vitro" aunque el papel funcional de esta interacción no está completamente explicado (Leclair y cols.,1992).

Un caso muy particular es el de Bcl3. Esta proteína es capaz de interaccionar con homodímeros de p50 e inhibir su unión al ADN. Sin embargo, algunos autores han demostrado que Bcl3 presenta una actividad transcripcional cuando se une a la p50. Según estos resultados, el complejo Bcl3/p50 sería transcripcionalmente activo y en el mismo, al igual que en los complejos heterodiméricos p50/p65, la proteína p50 constituiría el dominio de unión al ADN y Bcl3 el dominio transactivador. Paradójicamente, Bcl3 podría actuar simultáneamente como inhibidor de la unión de p50 al ADN y como activador de la transcripción durante el tiempo en el que el complejo p50/Bcl3 se encuentra unido al ADN (Franzoso y cols.,1992; Hatada y cols.,1992; Kerry cols.,1992; Bours y cols.,1993; Nolan y cols.,1993).

d.5. Conclusion.

Al ser una familia de factores de transcripción que actúan sobre múltiples genes inducibles, las proteínas rel/NF-kB se encuentran sometidas en la célula a una regulación estrecha y compleja que tiene lugar a distintos niveles. Dado que NF-kB es además un elemento esencial en la iniciación de la transcripción del VIH, el estudio de los mecanismos de regulación de la actividad transcripcional de las proteínas de la familia rel/NF-kB tiene una gran importancia en la comprensión de los mecanismos de latencia y reactivación del VIH.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo.

a. La transcripción del VIH es regulada de forma diferente en linfocitos CD4 normales y en líneas linfoblastoides T.

La hipótesis de partida del presente trabajo considera que la iniciación de la transcripción del genoma del VIH se encuentra regulada de forma diferente en linfocitos T normales y en líneas linfoblastoides tumorales. Por lo tanto, los fenómenos de latencia y reactivación viral tendrán requerimientos diferentes según el tipo celular considerado.

Esta hipótesis se basa en los siguientes datos clínicos y experimentales:

1. En el contexto celular de los linfocitos CD4, el VIH permanece mayoritariamente en un estado de latencia. Aunque una gran proporción de linfocitos CD4 (hasta un 30% en los órganos linfoides) se encuentran infectados por el VIH (Embretson y cols.,1993; Pantaleo y cols.,1993), el porcentaje de células en las que existe una replicación detectable es muy reducido (<1%).

2. Esta noción se ve reforzada por los hallazgos "in vitro" que muestran que no es posible detectar ninguna replicación viral en sistemas de infección de PBLs "in vitro" ni en linfocitos aislados de pacientes seropositivos en estado de reposo celular. Sin embargo, la activación de los linfocitos CD4 mediante mitógenos, citokinas o antígenos origina una rápida y masiva transcripción del genoma del VIH y la generación de una progenie viral (Barré-Sinoussi y cols.,1983; Popovic y cols.,1984; McDougal y cols.,1985; Folks y cols.,1986a; Zack y cols.,1990; Bubrinsky y cols.,1991; Saksela y cols.,1992).

3. A diferencia de lo observado en linfocitos CD4 normales, la infección por el VIH de líneas linfoblastoides T origina una intensa replicación viral en ausencia de estímulos de activación celular adicionales (Adachi y cols.,1986; Harrich y cols.,1990).

Por lo tanto, el entorno celular de los linfocitos CD4 permitiría al VIH desarrollar su ciclo biológico en distintas fases: en situación de reposo celular, el VIH permanecería en un estado quiescente y únicamente en el contexto de la activación del linfocito CD4 se produciría la reactivación del genoma del VIH y la replicación viral masiva subsiguiente (Virelizier.,1990). Por el contrario, en líneas linfoblastoides la infección por el VIH no presentaría una fase de latencia sino de replicación continua al existir una activación "basal" de los mecanismos que permiten la transcripción del genoma viral.

b. El factor de transcripción NF-kB es esencial en la transcripción del genoma del VIH en linfocitos CD4 normales pero no en líneas linfoblastoides T..

La segunda hipótesis de trabajo propugna que NF-kB es el principal elemento inducible que regula la transcripción del genoma viral en el contexto celular de los linfocitos CD4, mientras que en las líneas linfoblastoides su papel no sería esencial en la replicación del VIH.

Esta hipótesis se fundamenta en los siguientes datos:

1. La iniciación de la transcripción viral es dependiente de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en el LTR del VIH. Entre los elementos reguladores existentes en el LTR se han descrito dos consensos para el factor de transcripción NF-kB (Jones.,1989; Cullen y Greene.,1989; Gaynor 1992). NF-kB es a su vez uno de los factores de transcripción inducidos en el curso de los procesos de activación linfocitaria T que originan la reactivación del VIH. Por lo tanto, la translocación nuclear de NF-kB en la célula infectada no sólo activaría los genes celulares NF-kB dependientes, sino que actuaría además sobre el "enhancer" del VIH iniciando así la transcripción viral (Israel y cols.,1989; Osborn y cols.,1989; Tong-Starsken y cols.,1989; Hazan y cols.,1990; Beg y cols.,1993).

2. Una vez que se inicia la transcripción del genoma del VIH, la producción de Tat, el transactivador viral autólogo aumenta enormemente la transcripción del genoma viral (Sharp y Marciniak.,1989; Jones.,1993; Cullen.,1993). Dado que se ha descrito una colaboración en la transcripción del VIH entre Tat y factores celulares que se unen al LTR viral, incluyendo NF-kB, este factor podría ser un elemento esencial en la replicación del VIH, no sólo actuando como iniciador de la transcripción, sino como elemento colaborador con la proteína Tat.

En resumen, se ha demostrado que la activación de los linfocitos T y la inducción simultánea de NF-kB modifican radicalmente la permisividad para la replicación del VIH en este tipo celular. La translocación de NF-kB podría representar por lo tanto el mecanismo responsable de la iniciación de la transcripción del genoma viral en el curso de los procesos de activación linfocitaria y el principal elemento regulador de la replicación del VIH a partir de su estado de latencia (Virelizier.,1990).

Sin embargo, el papel de NF-kB como elemento esencial en la regulación de la replicación del VIH es cuestionado a partir de dos hechos experimentales.

a. En líneas linfoblastoides T la inducción del enhancer viral y la replicación del VIH son independientes de la activación celular y de la translocación nuclear de NF-kB.

b. Por otra parte, se ha demostrado que provirus deletados en las secuencias kB en el LTR pueden replicar con intensidad similar a provirus salvajes en blastos linfocitarios infectados "in vitro".

Estos datos contradictorios sobre la importancia de NF-kB en la reactivación del genoma del VIH deben ser clarificados mediante el estudio del funcionamiento del LTR y de la infección viral en modelos celulares relevantes y próximos a la infección viral "in vivo".

En nuestra hipótesis de trabajo, dados los diferentes requerimientos transcripcionales existentes entre linfocitos T normales y líneas linfoblastoides, el análisis molecular de los mecanismos de latencia y reactivación del VIH y el papel de NF- κ B en este proceso debe ser estudiado en el contexto celular de los linfocitos CD4. Este sistema es el único que nos permitirá extraer conclusiones relevantes sobre el comportamiento biológico del VIH "in vivo".

2.2. Objetivos.

El **objetivo global** del presente trabajo es desarrollar un modelo experimental que nos permita estudiar la transcripción del VIH en un contexto celular relevante con el fin de analizar y comparar los requerimientos de transactivación del LTR y de replicación viral existentes en linfocitos CD4 normales y en una línea linfoblastoide T.

Los objetivos concretos son:

1. Analizar el papel del factor de transcripción NF- κ B en la regulación de la transactivación del LTR en linfocitos CD4 normales y en líneas linfoblastoides T.
2. Estudiar el papel de la proteína Tat y su cooperación con NF- κ B en ambos tipos celulares.
3. Analizar los factores de transcripción de la familia rel/NF- κ B existentes en linfocitos CD4 en estado de reposo y tras activación.
4. Definir el papel de NF- κ B en la replicación del VIH en linfocitos CD4.

Los modelos experimentales desarrollados para realizar estos objetivos son:

1. Sistemas de transfección transitoria de linfocitos CD4 en reposo y líneas linfoblastoides T.
2. Sistemas de infección de linfocitos CD4 con provirus mutados en las secuencias NF- κ B.
3. Análisis molecular de los factores de transcripción de la familia NF- κ B mediante el estudio de la interacción ADN-proteínas (retardo en gel) y Western Blot nuclear.

3. MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

3.1. Células.

J-Jhan es un clon celular derivado de la línea Jurkatt (Israel y cols.,1989). Es un linfocito T de fenotipo CD3+, CD4+, DR-.

8E5 es un clon celular derivado de la línea A3.01 que contiene una copia integrada del VIH (Folks et al., 1986b).

Los linfocitos CD4 de sangre periférica fueron obtenidos a partir de la fracción leucocitaria de donantes de sangre sanos.

3.2. Plásmidos.

a. Vectores de expresión y vectores marcadores (Figura 8).

El plásmido LTRWT-Luc y LTR Δ κB-Luc (Bachelierie y cols.,1991) contienen la secuencia de nucleótidos comprendida entre -644/+78 que corresponden a la región U3+R del LTR de la cepa LAI del VIH. En el vector LTR Δ κB-Luc el tandem de elementos NF-κB ha sido deletado y reemplazado por la secuencia de restricción del enzima BclI (Du y cols., 1989). Estas secuencias del LTR fueron clonadas en el sitio HindIII del plásmido pC-Luciferasa (Schwartz y cols., 1990). La proteína Tat del VIH fue expresada a partir de diferentes vectores: Los plásmidos LTRWT-Tat y LTR Δ κB-Tat contienen el cDNA del gen Tat del VIH clonado bajo el control del LTR del VIH en su forma completa o deletada de las secuencias κB respectivamente; el plásmido LTRWT- Δ Tat que es utilizado como control negativo en varios experimentos fue construido clonando bajo el control del LTR completo un cDNA de Tat que codifica por una proteína truncada en los primeros 30 aminoácidos del extremo amino-terminal y que por lo tanto no es funcional; el plásmido CMV-Tat contiene un cDNA funcional de la proteína Tat situado bajo el control del promotor del Citomegalovirus (Hazan y cols.,1990).

El vector TK-Luc (Hazan y cols.,1990) contiene el promotor mínimo de la Timidín Kinasa de Herpes Simplex. El vector ConA-Luc (Arenzana-Seisdedos y cols.,1993) contiene el promotor de la Conalbúmina.

Los vectores RSV-Luc y CMV-Luc (Schwartz y cols.,1990) expresan el gen de la luciferasa bajo el control de los promotores virales heterólogos del Virus del Sarcoma del Rous y del Citomegalovirus humano respectivamente.

El plásmido CMV-p50 (Kieran y cols. 1990) contiene el cDNA (fragmento Xho, 498 aminoácidos) del gen de la subunidad p50 de NF-kB clonado bajo el control del enhancer-promotor de Citomegalovirus (Vector pRC-CMV, Invitrogen).

b. Vectores provirales (Figura 9).

En los experimentos de infección se utilizaron clones provirales salvajes o mutados en el consenso kB, cedidos por el Dr.Richard Gaynor (Division of Molecular Virology, Southwestern Medical Center, University of Texas, Dallas, USA). Las secuencias de dichos provirus se encuentran divididas en dos plásmidos diferentes: El fragmento 5' tanto del provirus salvaje como del mutado en el consenso kB (pUC5'HIVarm) corresponde al LTR5'y los genes gag y pol, y deriva de los clones moleculares SF2 (fragmento BamHI/SphI) y HTLV-IIIB (fragmento SphI/NcoI); el fragmento 3'de ambos provirus (pUC3'HIV-arm) correspondiente a los genes tat, env y LTR3', deriva enteramente del clon SF2. Estos plásmidos no son infecciosos aisladamente pero originan una progenie infecciosa si son digeridos por los enzimas de transfección BglI y NcoI y se co-transfectan con su plásmido complementario. Las mutaciones introducidas en el consenso NF-kB del LTR se describen a continuación (subrayado)

-106

-77

-CTTTAAACTTTCCGCTTTAAACTTTCCAGG

FIGURA 8. PLASMIDOS UTILIZADOS

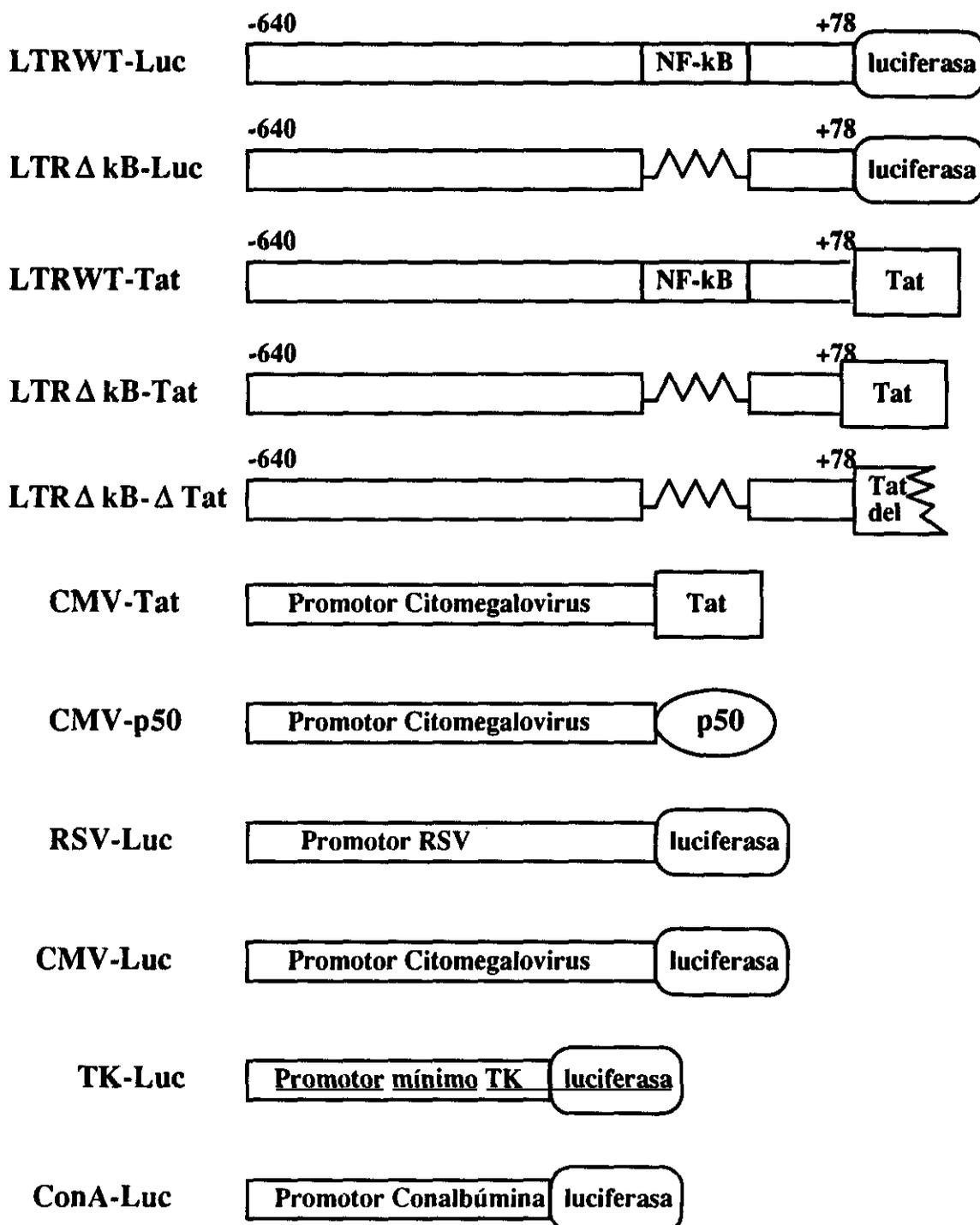
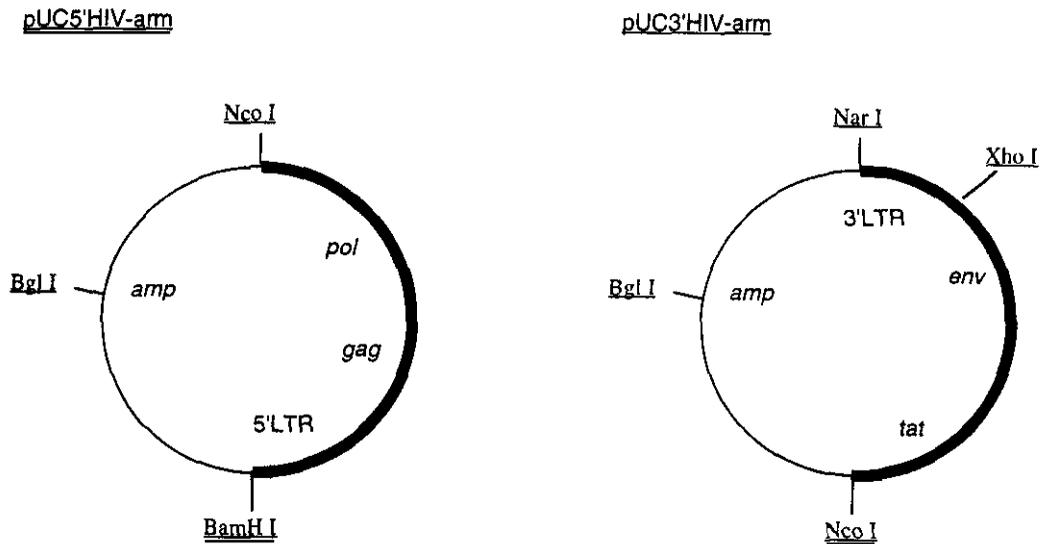


Figura 9. VECTORES PROVIRALES



3.3. Activadores utilizados.

El forbol miristato acetato (PMA, Sigma) se utilizó a dosis de 25 ng/ml. El mitógeno phytohemaglutinina (PHA, Wellcome) se utilizó a una concentración de 5µg/ml. El anticuerpo anti-CD3 (T28) activa los linfocitos T a través del receptor clonotípico CD3-Ti y se utiliza en forma de ascitis a una concentración final de 1/1000. La IL2 recombinante (Proleukin, Cetus) se utilizó a dosis de 60ng/ml.

3.4. Oligonucleótidos y sondas.

Los oligonucleótidos utilizados (Bio-Synthesis) contienen el doble consenso NF-kB tal como se encuentra en el enhancer del VIH. Su secuencia es la siguiente:

```

5'          3'
AGCT TAC AAG GGA CTT TCC GCT GGG GAC TTT CCA GGG A
  ATG TTC CCT GAA AGG CGA CCC CTG AAA GGT CCC TTCGA

```

La sonda LTR utilizada en los experimentos de cuantificación de ADN deriva de un fragmento de 660 bp obtenido por digestión del vector LTRWT-Luc con la enzima de restricción *Ava*I.

3.5. Medio de cultivo.

Los distintos tipos celulares fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI suplementado con glutamina, antibiótico y 10% de Suero de Ternera Fetal (SVF).

MÉTODOS

3.6. Aislamiento de linfocitos CD4 de sangre periférica

La fracción leucocitaria de las bolsas de sangre obtenidas de donantes sanos fue diluída al 50% en buffer fosfato-salino (150mM ClNa, pH 7.2) (PBS), depositada sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque, Sigma) y centrifugada a 800 g. durante 20 minutos a 24 grados. La fase conteniendo la fracción de células mononucleares-linfocitos, monocitos y células natural killer- (PBL) fue lavada cinco veces mediante resuspensión en PBS y centrifugación a 200 g para eliminar al máximo las plaquetas contaminantes. Posteriormente los PBL (aproximadamente 100×10^6 de células por experimento) fueron resuspendidos en PBS e incubados durante una hora a 4°C en agitación continua con anticuerpos dirigidos frente a los epítomos CD8 y CD19 (M740 y M707, Dako), CD16 (Leu-11c, Beckton-Dickinson) y CD14 (My4, Coulter) a una concentración de $0.5 \mu\text{g}/10^6$ de células. Tras realizar un lavado con PBS, las células fueron incubadas en medio RPMI (Ingelheim) durante una hora a 4°C en agitación con esferas magnéticas (Dynabeads, Dynal) conjugadas con un anticuerpo de conejo dirigido frente a inmunoglobulinas de ratón. Las células así marcadas fueron sometidas a separación en un campo magnético obteniéndose por selección negativa la fracción de linfocitos T CD4+. Se desechó la fracción seleccionada

positivamente. La pureza de la población seleccionada negativamente se valoró por Citometría de flujo marcando 10^6 de células con un anticuerpo fluoresceinado dirigido frente al epítipo CD4 (OKT4a-FITC, Beckton-Dickinson).

En los experimentos en que se utilizaron monocitos de sangre periférica, estos fueron aislados mediante adherencia a partir de PBL. 10^6 de PBL fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo y depositadas en placas de 24 pocillos (Nunc). Tras incubarse 45 minutos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 , se retiraron las células no adheridas y se añadió nuevamente medio de cultivo. Tras 45 minutos de incubación en las mismas condiciones se retiraron las células no adherentes obteniéndose así una población homogénea de monocitos.

3.7. Ensayos de transfección.

Los linfocitos CD4 fueron resuspendidos en medio RPMI suplementado con 10% de SVF y transfectados mediante choque eléctrico utilizando un electroporador Celljet (Eurogenetech). Las condiciones de electroporación para las células J-Jhan fueron: 260 V, 1500 μF y resistencia máxima. Para los linfocitos CD4 en reposo las condiciones fueron: 320V, 1500 μF y resistencia máxima. Tras la transfección las células fueron resuspendidas en medio de cultivo, estimuladas o no con los distintos activadores, y recuperadas 24 horas después de la transfección, lavadas en PBS y resuspendidas en tampón de lisis (Tris Fosfato 25mM pH 7.8, Cl_2Mg 8 mM, DTT 1mM, Tritón 100-X 1%, Albúmina bovina (BSA) 1%, glicerol 15%). La actividad luciferasa se midió cuantificando la emisión lumínica en un luminómetro (Lumat LB501, Berthold). Para esto se añadió al lisado celular resuspendido en 100 μl de tampón de lisis, 100 μl de una solución de ATP 5mM (Pharmacia) y luciferina 2mM (Promega) en tampón de lisis. La emisión lumínica se cuantificó durante los cinco segundos siguientes al comienzo de la reacción enzimática. Los datos se expresan en Unidades relativas de luciferasa (RLU), y el cálculo se realizó mediante la fórmula:

$$\text{RLU} = \frac{(\text{emisión lumínica de la muestra} - \text{emisión lumínica del tampón de lisis})}{10^6 \text{ células.}}$$

3.8. Ensayos de unión DNA-proteína.

a. Marcaje de las sondas.

Las dos hebras complementarias (500ng) fueron resuspendidas en solución STE (ClNa 0.1M, Tris pH8 10mM, EDTA 1mM) e hibridadas mediante la exposición sucesiva a 88°C durante 2 minutos, 65°C durante 10 minutos y 5 minutos a temperatura ambiente (TA). El marcaje se realizó mediante la reacción de la polimerasa de Klenow. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l y en la misma se utilizaron 100 ng de la sonda hibridada, 10 μ Ci de α -dCTP P³² (Amersham) con una actividad de 3000 Ci/mmol, 1 μ l de enzima (Boehringer), dATP, dGTP y dTTP a una concentración de 2mM y 1 μ l de tampón de reacción (Cl₂Mg 5mM, Tris-ClH 10mM, ClNa 100mM y 2ME 1mM). La reacción se realizó durante 30 minutos a TA y al final de la misma se cebó añadiendo a la reacción dCTP frío a una concentración de 20mM durante 5 minutos. La sonda marcada fue purificada mediante paso por columna de Sephadex G-10 (Clontech). La actividad específica de marcaje se calculó en un contador beta (LKB).

b. Preparación de los extractos nucleares.

Las células (10-20x10⁶ por punto) fueron lavadas en PBS y resuspendidas en 1ml de tampón A (Tabla 9) durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente fueron centrifugadas a 6500 rpm, 4°C durante 5 minutos y lavadas en tampón B. Tras una nueva centrifugación (6500 rpm, 4°C, 5 minutos) el botón celular fue resuspendido en tampón C. La elución de las proteínas se realizó mediante agitación suave a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se recuperó tras centrifugación a 6500 rpm, 4°C, 15 minutos, y la cantidad de proteína se estimó mediante la reacción de Bradford (Bio-Rad).

TABLA 9. Composición de los tampones de extracción de proteínas nucleares.

Reactivos	Tampón A	Tampón B	Tampón C
Hepes pH 8	10mM	10mM	10mM
NaCl	50mM	50mM	350mM
Sucrosa	0.5M		
EDTA	1mM	1mM	1mM
Spermidina	0.5mM	0.5mM	0.5mM
Spermina	0.15mM	0.15mM	0.15mM
Tritón X-100	0.2%		
Glycerol		25%	25%
PMSF	1mM	1mM	1mM
Leupeptina	0.5µg/ml	0.5µg/ml	0.5µg/ml
Pepstatina	0.5µg/ml	0.5µg/ml	0.5µg/ml
Aprotinina	0.2U/ml	0.2U/ml	0.2U/ml
β-mercaptoetanol	7mM	7mM	7mM

c. Ensayo de unión DNA-proteína.

La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl. Para cada ensayo se utilizaron 3µg de proteína nuclear, 4µg de poly dI-dC (Pharmacia) como inhibidor inespecífico, 3µg de Albúmina Bovina (BSA, Boehringer), y 4µl de tampón 5x (Hepes 37.5mM pH8, ClNa 175mM, Cl₂Mg 5mM., EDTA 0.25mM, DTT 2.5mM y glicerol 37.5%). Tras una incubación de 15 minutos a TA se añadieron 50.000 cpm de sonda marcada. Los complejos se analizaron mediante migración en gel de poliacrilamida al 5% en 0.5X TBE (Tris 25mM, ácido bórico 25mM, EDTA 0.5mM). Tras una electroforesis de dos horas a 150V, el gel fue secado al vacío a 80°C y autoradiografiado.

d. Especificidad de la reacción.

La especificidad de la reacción se valoró mediante competición con oligonucleótido no marcado, anticuerpos específicos frente a la subunidad p50 de NF-kB o I κ B α (MAD3). Los anticuerpos frente a la p50 (Cedidos por el Dr.R.T.Hay, Department of Mycrobiology, University of St.Andrews, UK) se obtuvieron por inmunización de conejos con la proteína recombinante. La proteína MAD3 (I κ B α) se expresó a partir del vector pGEX en forma de una proteína de fusión glutation-S transferasa y fue purificada por cromatografía de afinidad. En los ensayos de competición se utilizaron oligonucleótidos no marcados en un exceso de concentración respecto de la cantidad de sonda utilizada de 40 veces, 1 μ l de anticuerpo anti p50 o 20 ng de I κ B α . El extracto nuclear fue preincubado con los competidores 10 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la reacción de unión ADN-proteína.

3.9. Análisis cuantitativo del ADN de bajo peso molecular.

El ADN de bajo peso molecular en el compartimento nuclear fue purificado por acuerdo al método de Hirt (1967). Este protocolo que fue concebido originalmente para extraer el ADN viral de células infectadas puede ser utilizado para extraer el ADN plasmídico (Bachelerie et al., 1991). Las células transfectadas (CD4 o J-Jhan) se lavaron dos veces en PBS y los nucleos celulares fueron aislados mediante extracción en Tampón A tal como se describe en el punto 3.8.b. Los núcleos fueron resuspendidos en una solución de lisis (Tris 0.1M, EDTA 0.01 M., SDS 0.5%) y la precipitación diferencial del ADN de bajo peso molecular se realizó mediante la adición de C1Na 4M, incubandose a 4°C durante 18 horas. La solución se centrifugó a 12.000 rpm, 4°C, 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante al que se añadió proteinasa K (200 μ g/ml) incubandose durante 12 horas a 37°C. Posteriormente se realizó una extracción en fenol-cloroformo y una doble precipitación en etanol absoluto en presencia de Acetato de Sodio a una concentración final de 0.3M. Tras centrifugar a 12.000 rpm, 4°C, 30 minutos, el precipitado fue resuspendido

en TE (Tris ClH 10mM, EDTA 1mM). Diluciones seriadas del ADN plasmídico se transfirieron a una membrana de nylon (Bio-Rad) utilizando un aparato de Slot-Blot. La membrana fue hibridada con un fragmento de restricción Ava I de 660 pb obtenido a partir del plásmido LTRWT-Luc. Esta sonda fue marcada con α -dCTP P^{32} utilizando la polimerasa de Klenow. Tras hibridación la membrana fue lavada sucesivamente en 2X SSC/SDS 0.1% a TA dos veces 15 minutos, 1X SSC/SDS 0.1% a 65°C, 15 minutos y 0.1X SSC/SDS 0.1% a 65°C, 15 minutos, secada y revelada mediante autoradiografía. El ADN correspondiente a un número similar de células no transfectadas se utilizó como control negativo.

3.10. Sistemas de infección con provirus.

Los plásmidos conteniendo las secuencias complementarias de los provirus HIV completos y mutados en las secuencias kB fueron digeridos con los enzimas de restricción BglII/NcoI y cotransfectados en las células J-Jhan. El sobrenadante de cultivo de las células infectadas fue clarificado mediante centrifugación (800g, 10 minutos). Posteriormente se realizó una ultracentrifugación de dichos sobrenadantes (400.000 g, 10 minutos) utilizando una ultracentrifuga de mesa Beckman TL100 con el fin de precipitar las partículas virales. Los virus así precipitados fueron titulados cuantificando la proteína p24 asociada a partículas virales utilizando un test de ELISA (Coulter).

Linfocitos CD4 no activados obtenidos por selección negativa fueron incubados con los distintos provirus durante 18 horas. Una dosis infecciosa de 150 pg de p24/10⁶ de células fue utilizada. Tras la adsorción viral, las células fueron lavadas dos veces en 50 ml de PBS y cocultivadas en placas de 24 pocillos (Nunc) con macrófagos autólogos previamente aislados por adherencia. Las células fueron estimuladas con PHA (Wellcome) a 5µg/ml o anticuerpos anti-CD3 a una concentración de 1:1000 de ascitis. El cultivo se realizó en 2 ml de medio RPMI por pocillo, suplementado con 20% de SVF y 60ng/ml de Interleukina 2 recombinante (Proleukin, Cetus). El medio se renovó en un 50% dos veces

por semana y semanalmente se añadieron blastos estimulados con PHA para cebar el cultivo. Este se prolongo durante cuatro semanas.

3.11. Detección del ADN proviral y de transcritos de ARNm en las células infectadas.

a. ADN-PCR.

Las células fueron lavadas dos veces en PBS. 5×10^5 linfocitos CD4 fueron incubados en tampón de lisis (Tris-ClH 50mM pH 8, ClK 50mM, Cl_2Mg 2.5mM, Tween 20, 0.45%, NP40 0.45% y proteinasa K 60 $\mu g/ml$) a 56°C durante una hora e inactivados posteriormente a 95°C 10 minutos (Higuchi, 1989). Todas las muestras fueron previamente analizadas con un par de primers (PCO4/GH20) que amplifica una región del gen de la β -globina (Bauer y cols., 1991). Este procedimiento permite evaluar la integridad del DNA, la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa y la eficiencia de la reacción. Para la detección del genoma proviral del VIH se amplificó una región del gen *gag* utilizando los cebadores SK38/SK39 (Cetus). La reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 25 μl de tampón de reacción (Tris-ClH 10mM pH 8.3, ClK 50mM, Cl_2Mg 1.5mM, gelatina 0.01%, dNTPs 0.2mM y 0.5 μl de cada uno de los cebadores) (Ou, y cols., 1991). 1×10^5 células fueron amplificadas en cada reacción. Una vez que la reacción alcanzó los 82°C se añadieron 0.625 U de Taq polimerasa (Promega). Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C durante un minuto y se realizaron 35 ciclos de amplificación de la siguiente manera: desnaturalización, 15 segundos a 95°C, "annealing" y extensión durante un minuto a 60°C. Después del ciclo 35, el tiempo de extensión fue aumentado a 10 minutos. Todos los procedimientos de preparación de las muestras y amplificación incluyeron las medidas convencionales recomendadas para evitar una contaminación entre las muestras o la contaminación de las muestras y reactivos con productos amplificados por PCR o controles positivos (Kwok y Higuchi., 1989). Un número similar de células 8E5 fueron utilizadas como control positivo. Como control negativo se utilizó el mismo número de linfocitos no infectados.

b. ARN-PCR

Para la detección del ARN del VIH, las células fueron lavadas dos veces en PBS, separadas en alícuotas de 10^6 células y almacenadas a -70°C hasta su utilización. La misma cantidad de células 8E5 fue utilizada como control positivo. El ARN fue extraído utilizando el método del RNazol (Chomczynsky and Sacchi., 1987). Tras tratamiento con un exceso de DNasa libre de RNasa (Boehringer), cada muestra fue dividida en dos alícuotas. Sobre una alícuota se realizó transcripción inversa utilizando 7.5 U de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega) y amplificación con los primers SK38/SK39 según se ha descrito previamente. La transcripción inversa (42°C durante 10 minutos) y la amplificación (35 ciclos) fueron realizadas en el mismo paso. La segunda alícuota fue amplificada sin realizar transcripción inversa y fue utilizada como control del procedimiento. Un número similar de células 8E5 fueron utilizadas como control positivo. Como control negativo se utilizó el mismo número de linfocitos no infectados.

c. Detección de los productos de PCR.

Para la detección de los productos de PCR, tras la amplificación, $10\mu\text{l}$ de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados por transiluminación ultravioleta. El ADN fue transferido a una membrana de nylon (Zeta Probe, Bio-Rad) mediante transferencia alcalina (Reed y cols., 1985) e hibridada con 10^6 de cpm de la sonda SK19 marcada con P^{32} , que codifica por un sitio interno del producto de amplificación del gen gag (Kellogg y Kwok., 1990). La hibridación se realizó durante 12 horas a 55°C en tampón de hibridación (5xSSPE, 1x Denhardt's, 1% SDS y 10% sulfato de dextrano). Las membranas fueron lavadas tres veces en 2X SSPE/0.1% SDS a 55°C y autoradiografiadas.

4. RESULTADOS

4.1. Los linfocitos T CD4 en estado de reposo presentan un entorno celular poco permisivo para la actividad transcripcional del VIH.

Por medio de ensayos de transfección transitoria hemos comparado la actividad transcripcional del LTR del VIH en linfocitos CD4 aislados de sangre periférica y en una línea linfoblastoide - J-Jhan- derivada de la línea tumoral Jurkatt.

Para esto hemos transfectado vectores conteniendo las secuencias reguladoras U3+R del LTR del VIH y el gen de la luciferasa como marcador. Mediante este tipo de construcciones, la transcripción del gen de la luciferasa - una proteína no expresada en células de mamíferos- se encuentra bajo el control del LTR del VIH, y la medida de su actividad enzimática refleja la actividad transcripcional del LTR.

En los linfocitos CD4 en reposo obtenidos de sangre periférica, la actividad transcripcional espontánea del vector LTRWT-Luc fue extremadamente baja, situándose en niveles muy próximos al umbral de detección de la actividad luciferasa por luminometría (Figura 10). El nivel de expresión del LTR del VIH en linfocitos CD4 osciló entre 0 y 71 unidades relativas de luciferasa (RLU) por millón de células.

Por el contrario, en la línea celular J-Jhan, el nivel basal de actividad transcripcional del LTR medido por la actividad luciferasa fue extraordinariamente elevado, del orden de 50 a 1.000 veces superior a los niveles encontrados en los linfocitos CD4 en reposo. Como se demuestra en el experimento representativo de la figura 10, esta intensa actividad transcripcional fue independiente de la acción del enhancer NF-kB ya que un vector deletado en las secuencias consenso NF-kB en el LTR mostró niveles de transactivación similares a los del vector salvaje. La intensa actividad transcripcional observada en la línea J-Jhan es por lo tanto debido a factores enhancer-promotor distintos de NF-kB y que interaccionan con otras secuencias reguladoras del LTR o con el complejo transcripcional primario.

En resumen, estos datos muestran una importante diferencia cuantitativa en la actividad basal del LTR del VIH en linfocitos normales y en células tumorales. Así mientras en linfocitos CD4 la actividad transcripcional basal del LTR es muy reducida y cercana al límite de sensibilidad de la técnica, en la línea linfoblásticoide T estudiada existe una intensa actividad transcripcional basal del LTR independiente de las secuencias reguladoras NF- κ B.

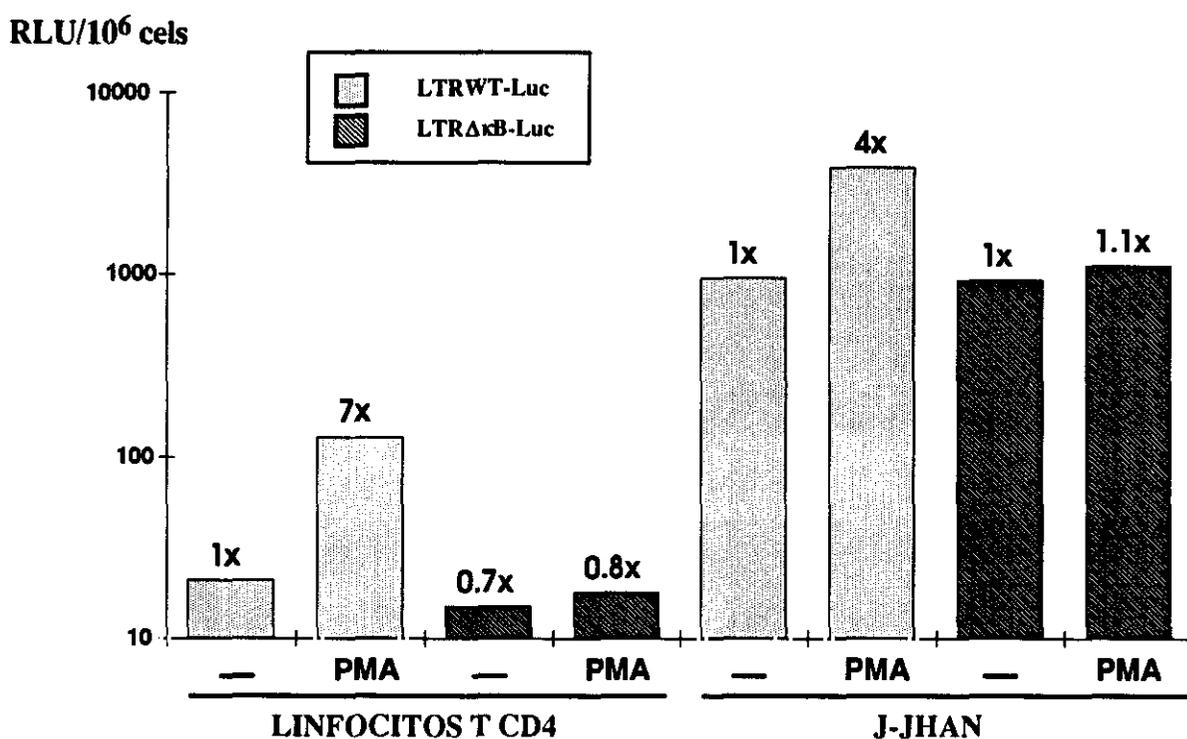


FIGURA 10. Comparación de la expresión basal e inducida del LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y en la línea tumoral J-Jhan.

Un total de 2×10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica o células J-Jhan fueron transfectados por electroporación con $1 \mu\text{g}/10^6$ de células del plásmido indicado. Tras la transfección las células fueron mantenidas sin activación o fueron estimuladas con 25 ng/ml de PMA. Veinticuatro horas después de la transfección se realizó el conteo del número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades relativas de Luciferasa" (RLU) por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel de amplificación de la actividad luciferasa respecto de la actividad del plásmido LTRWT-Luc transfectado en el mismo tipo celular. □ Plásmido LTRWT-Luc; ▨ Plásmido LTR Δ κ B-Luc. Se muestra uno de diez experimentos representativos.

4.2. Diferentes promotores se expresan a bajo nivel en los linfocitos CD4.

Con el fin de estudiar si la débil expresión del LTRWT-Luc en linfocitos CD4 es un caso particular realizamos analizamos la expresión de vectores con diferentes secuencias enhancer-promotor en linfocitos CD4 mediante experimentos de transfección transitoria.

Como se muestra en la figura 11 la expresión de la mayoría de los plásmidos en los que la luciferasa se encuentra bajo el control de promotores débiles, no fue detectable en linfocitos CD4.

Unicamente el vector CMV-Luc alcanzó niveles de luminiscencia elevados sobre el umbral de detección de la técnica. En cualquier caso, los niveles de expresión fueron muy inferiores a los encontrados en la línea linfoblastoide J-Jhan.

Estos resultados muestran que el LTR del VIH no es un caso particular de baja expresión en linfocitos CD4. Es el propio entorno celular de los linfocitos CD4 el que no permite la expresión intensa de estos vectores, probablemente debido a la baja expresión y actividad de la maquinaria transcripcional y a la ausencia de una mayoría de factores de transcripción en las células no activadas.

Asímismo estos datos ilustran la dificultad en obtener buenos niveles de proteínas en linfocitos CD4 a partir de vectores de expresión plasmídicos en los que se han clonado diversos cDNAs. Dado que el mayor nivel de expresión se obtuvo utilizando el promotor de Citomegalovirus (plásmido CMV-Luc) se eligió este promotor para expresar distintas proteínas en los linfocitos CD4.

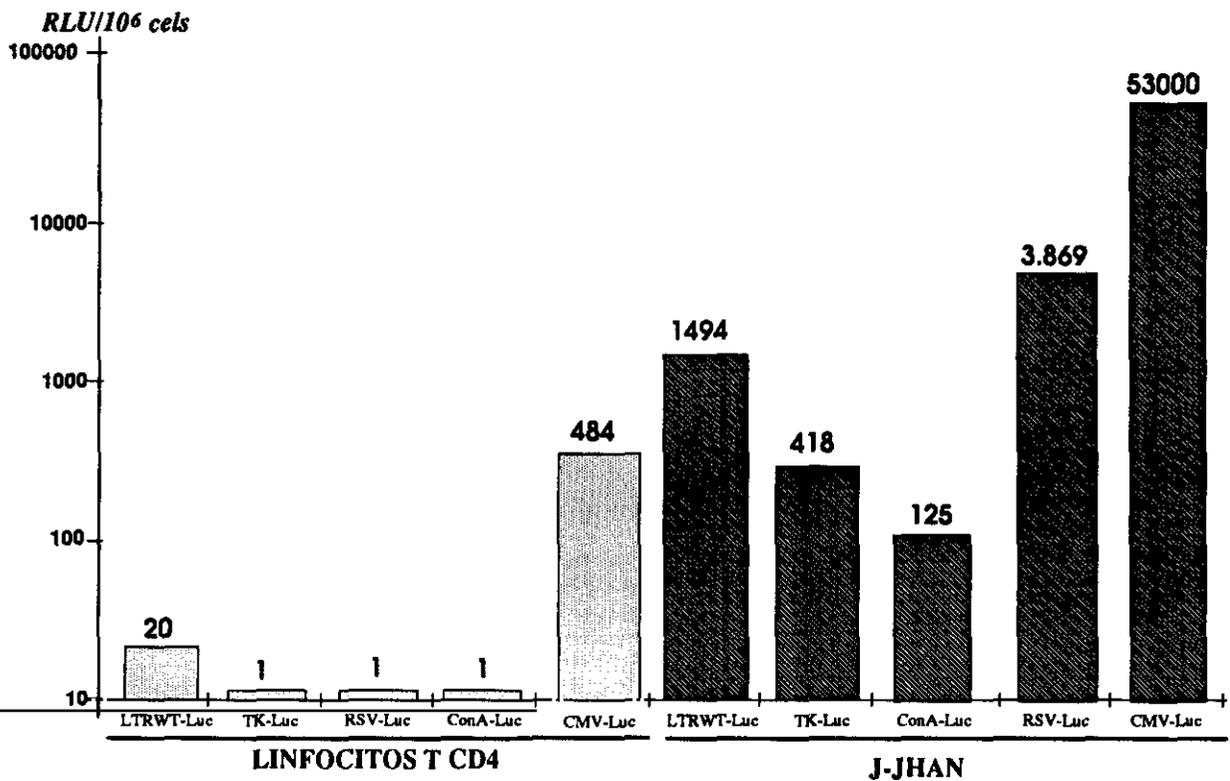


FIGURA 11. Comparación de la expresión basal de diferentes plásmidos en linfocitos CD4 normales y en la línea tumoral J-Jhan utilizando como marcador la luciferasa.

Un total de 2×10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica o células J-Jhan fueron transfectados por electroporación con $1 \mu\text{g}/10^6$ de células del plásmido indicado. Veinticuatro horas después de la transfección se realizó el conteo del número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades relativas de Luciferasa" (RLU) por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel absoluto de unidades luciferasa.  Linfocitos CD4;  J-Jhan.

4.3. La baja expresión del LTR del VIH en linfocitos CD4 no es debido a una baja eficiencia en la transfección de dichas células.

Las diferencias observadas entre linfocitos CD4 y la línea J-Jhan podría ser debidas a motivos puramente técnicos debido a la diferente transfectabilidad de ambos tipos celulares. En efecto, cada célula tiene una mayor o menor resistencia a la transfección que en ocasiones depende del método empleado y en otras es debido a características propias de la célula. Por eso cuando se comparan resultados de actividad transcripcional entre dos tipos celulares es imprescindible verificar que la transfección es igualmente eficaz en las células comparadas. Habitualmente esta comparación se realiza "normalizando" la transfección

mediante la utilización de un plásmido que presenta un actividad transcripcional similar en los tipos celulares estudiados.

Sin embargo, en el caso de los linfocitos CD4, esta estrategia no es válida al existir en estas células una baja expresión de los diferentes promotores estudiados, por lo que ninguno es susceptible de ser utilizado para normalizar las transfecciones (Figura 11). Por este motivo es necesario cuantificar directamente los niveles de plásmido introducidos en dichas células y compararlos con los obtenidos mediante la transfección de la línea celular J-Jhan.

Dado que el ADN plasmídico puede ser incorporado pasivamente en la membrana celular, la cuantificación del ADN transfectado fue realizado en el compartimento nuclear de la célula. De esta manera evitamos un posible sesgo en nuestros resultados y además determinamos de forma precisa la cantidad de plásmido presente en el núcleo, que es el compartimento celular en el que se realiza la transcripción génica.

Como se muestra en la figura 12 la cantidad de ADN plasmídico introducido en ambos tipos celulares fue similar por lo que las diferencias de actividad luciferasa obtenidas no pueden ser achacadas a un defecto técnico en la transfección. En el experimento mostrado en la figura 12 la actividad luciferasa obtenida en 10^6 de linfocitos CD4 no fue detectable, mientras que en la línea J-Jhan, niveles similares de plásmido a los existentes en los linfocitos CD4 originaron una intensa actividad luciferasa (1200 RLU/ 10^6 de células).

En conclusión, el bajo nivel de expresión del LTR observado en linfocitos CD4 no es debido a una transfección ineficaz de dichas células sino a la escasa actividad transcripcional existente en este tipo celular. Asimismo, el alto nivel de actividad luciferasa obtenido en la línea linfoblastoide J-Jhan no es debido a una mejor transfectabilidad de la misma sino a la elevada actividad transcripcional basalmente existente en estas células y que permite la expresión de los plásmidos introducidos en las mismas.

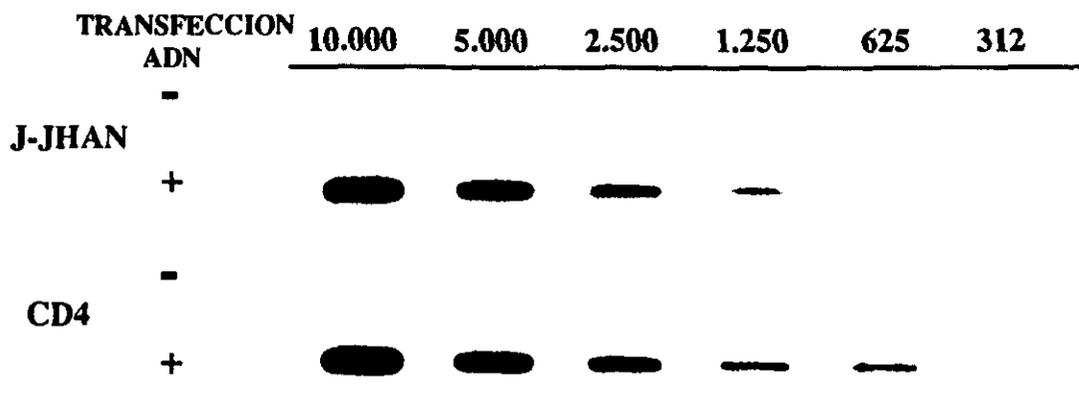


FIGURA 12. Cuantificación del ADN transfectado en linfocitos CD4 en reposo y en células J-Jhan. Linfocitos CD4 o células J-Jhan fueron transfectados con $1\mu\text{g}/10^6$ células del plásmido LTRWT-Luc o fueron dejadas sin transfectar. El ADN plasmídico fue purificado por extracción diferencial del ADN de bajo peso molecular en gradiente de Hirt. Diluciones seriadas del ADN de bajo peso molecular obtenido en cada tipo celular fueron transferidos a una membrana de Nylon utilizando un aparato de Dot-Blot e hibridados con una sonda LTR del VIH marcada con $\alpha\text{-P}^{32}\text{dCTP}$. La autorradiografía mostrada se obtuvo tras seis horas de exposición. Los números en la parte superior de la figura indican el número de células a las cuales corresponde el ADN obtenido. En el experimento mostrado la actividad luciferasa obtenida en 10^6 células fue de 1200 RLU en las células J-Jhan y fue indetectable en los linfocitos CD4.

4.4. La inducibilidad NF-kB dependiente del LTR del VIH es comparable en linfocitos CD4 normales y en células transformadas.

La respuesta del LTR del VIH a la activación celular fue estudiada en células linfoblastoides T y células normales. Como se muestra en la figura 10 en ambos tipos celulares el tratamiento con PMA indujo una clara transactivación del LTR viral. Esta inducción fue debida a la transactivación del "enhancer" NF-kB del VIH. En los dos tipos celulares, la delección de las secuencias consenso para NF-kB (Vector LTR Δ kB-Luc) abolió la capacidad del LTR para responder con un aumento de la transcripción a la activación por PMA. Es importante destacar que la delección del enhancer NF-kB no se tradujo en una alteración sustancial de la actividad basal del LTR en ninguno de los tipos celulares estudiados.

4.5. Estudio del sinergismo entre la activación celular y la expresión de la proteína Tat en la activación del LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y la línea linfoblastoide J-Jhan.

Con el fin de estudiar la colaboración entre la inducción de factores NF- κ B en el curso de la activación celular y la expresión de la proteína transactivadora Tat del VIH en ambos sistemas celulares, realizamos experimentos de transfección transitoria utilizando un vector que coloca la expresión de la proteína Tat bajo el control del promotor del Citomegalovirus humano (CMV). Este vector fue utilizado al ser el promotor del CMV el que se expresa con mayor intensidad en linfocitos T en reposo (Figura 11). Mediante su utilización se persigue por tanto obtener una expresión suficiente de la proteína Tat en este tipo celular.

Como se muestra en la figura 13 la expresión de la proteína Tat indujo en ambos tipos celulares una transactivación del LTR del VIH de intensidad similar. La activación celular mediante PMA ocasionó asimismo una transactivación del LTR del VIH. Cuando ambos estímulos actuaron conjuntamente se observó un claro efecto sinérgico en la transactivación del LTR del VIH. Aunque los valores absolutos obtenidos fueron muy diferentes dado el alto nivel de expresión del LTR en la línea linfoblastoide J-Jhan, los valores relativos obtenidos en la inducción del LTR del VIH fueron del mismo orden cuando se calcularon los niveles de amplificación de los diferentes estímulos respecto del nivel de expresión basal del LTR en cada tipo celular (Figura 13).

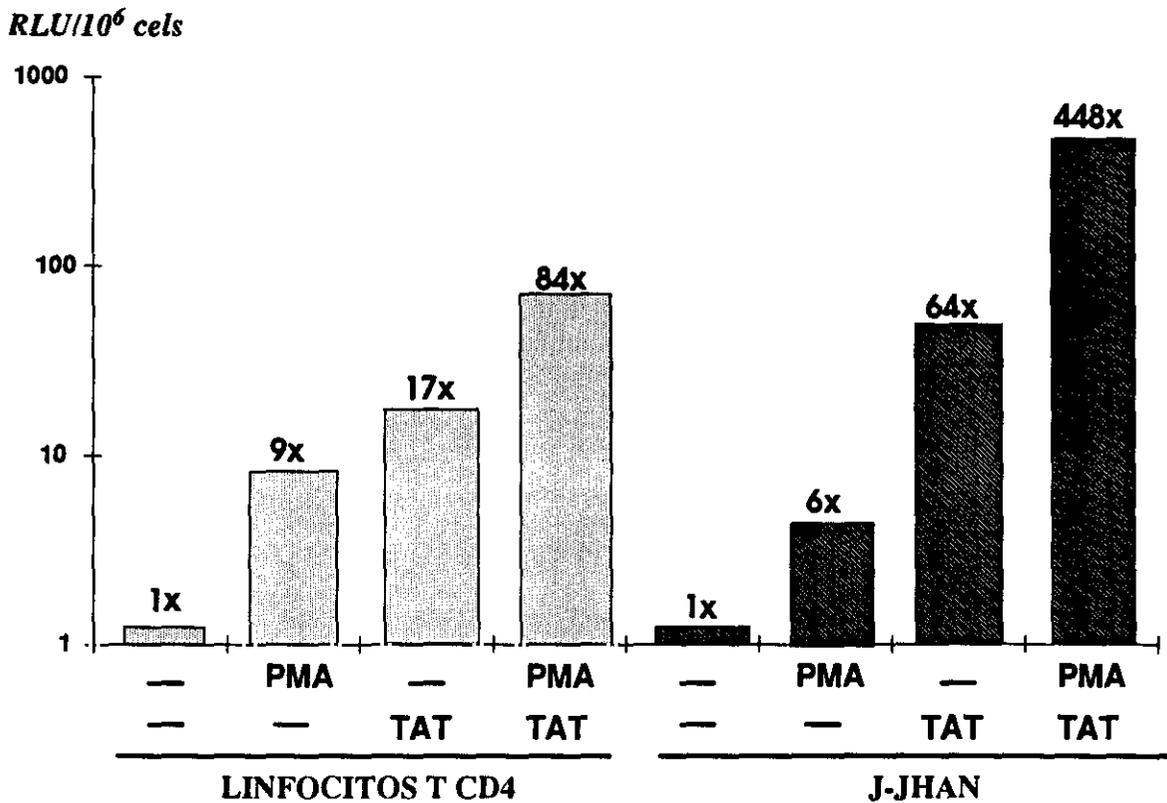


FIGURA 13. *Transactivación del LTR del VIH en linfocitos CD4 y en la línea linfoblastoide J-Jhan mediante activación celular y expresión de la proteína Tat.* Un total de 10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica o células J-Jhan fueron transfectadas con $1\mu\text{g}/10^6$ de células o LTRWT-Luc de forma aislada o cotransfectadas con el $0.5\mu\text{g}/10^6$ de células del plásmido CMV-Tat. Después de la transfección las células fueron mantenidas sin activar en medio de cultivo o fueron activadas con $25\text{ng}/\text{ml}$ de PMA. Veinticuatro horas después de la transfección se cuantificó el número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades Relativas de Luciferasa" por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel de amplificación de la actividad luciferasa respecto de la actividad del plásmido LTRWT-Luc transfectado en el mismo tipo celular. □ Linfocitos CD4. ■ Células J-Jhan. Se muestra uno de siete experimentos representativos.

4.6. Papel de las secuencias consenso NF-kB en la transactivación inducida por Tat sobre el LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y en la línea linfoblastoide J-Jhan.

La participación de las secuencias enhancer NF-kB del VIH-LTR en la transactivación mediada por Tat fueron analizadas en linfocitos CD4 normales y en la línea linfoblastoide J-Jhan. Ambos tipos celulares fueron cotransfectados con un vector LTRWT-Luc o LTR Δ kB-Luc y un vector de expresión de la proteína Tat situado bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV-Tat).

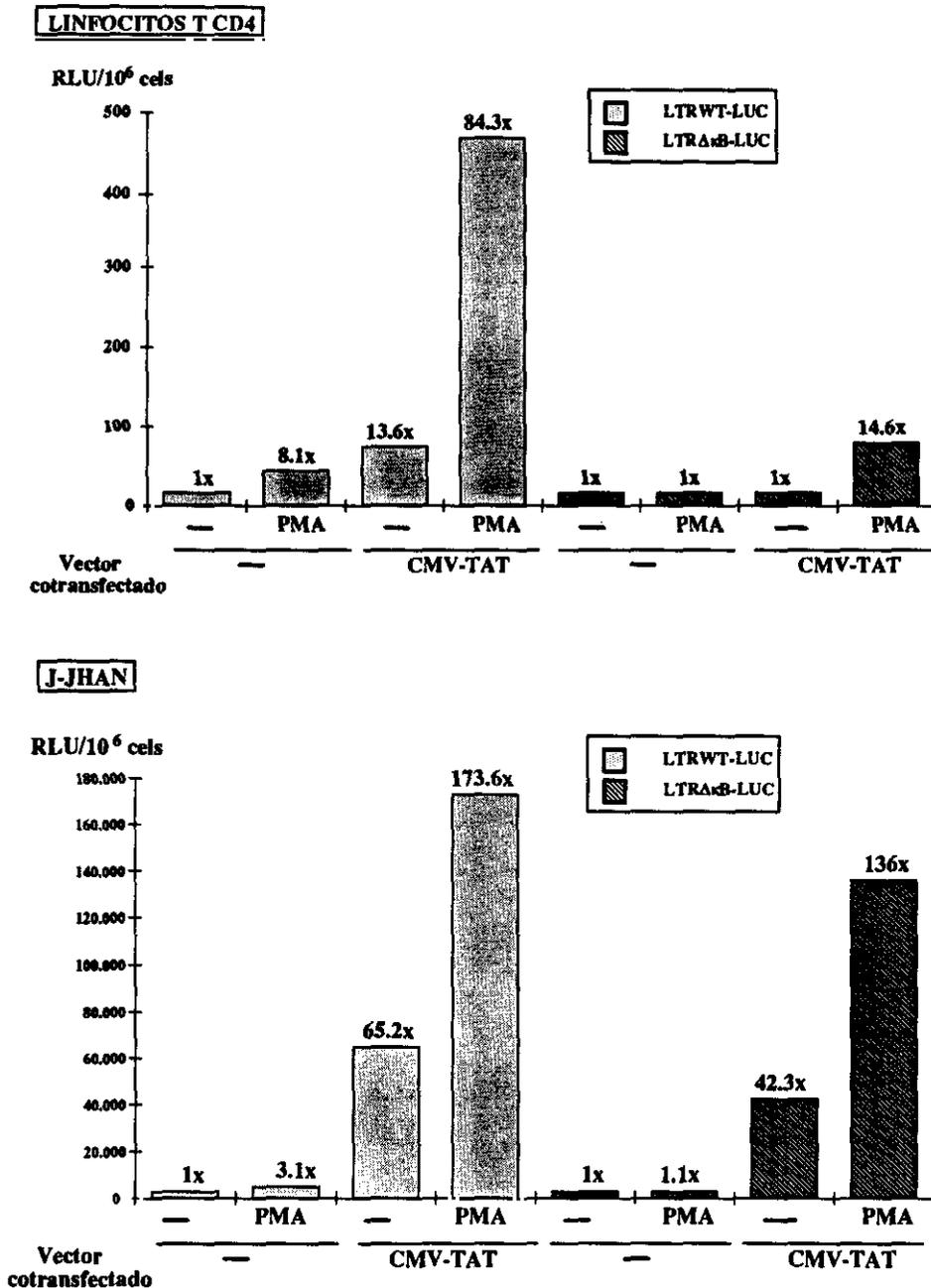


FIGURA 14. Papel de las secuencias consenso NF- κ B en la transactivación inducida por Tat sobre el LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y en la línea linfoblástica J-Jhan. Un total de 10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica o células J-Jhan fueron transfectadas con los plásmidos LTRWT-Luc o LTRΔkB-Luc ($1\mu\text{g}/10^6$ de células) de forma aislada o cotransfectadas con el plásmido CMV-Tat ($0.5\mu\text{g}/10^6$ de células). Tras la transfección las células fueron mantenidas sin activar en medio de cultivo o fueron activadas con 25ng/ml de PMA. Veinticuatro horas después de la transfección se cuantificó el número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades Relativas de Luciferasa" por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel de amplificación de la actividad luciferasa respecto de la actividad del plásmido LTRWT-Luc transfectado en el mismo tipo celular. □ LTRWT-Luc ▨ LTRΔkB-Luc. Se muestra uno de siete experimentos representativos.

Como se ha descrito en la figura 13, en ambos tipos celulares la expresión de Tat conlleva un aumento en la transactivación de un LTR en el que el consenso NF-kB se encuentra conservado, existiendo un efecto sinérgico entre la expresión de Tat y la activación celular.

En la línea linfoblastoide J-Jhan, la delección de las secuencias NF-kB en el LTR no modificó la transactivación mediada por Tat ni alteró significativamente el sinergismo entre la expresión de Tat y la activación celular.

Por el contrario, en linfocitos CD4 normales la delección del consenso NF-kB en el LTR origina una abolición completa del efecto transactivador de Tat como se muestra por la falta de actividad luciferasa encontrada en dicho tipo celular cuando el vector LTR Δ kB-Luc es cotransfectado con CMV-Tat.

Estos datos muestran una diferencia cualitativa en el funcionamiento del LTR entre linfocitos normales CD4 y una línea linfoblastoide T. El mecanismo de acción de la proteína Tat es independiente del consenso NF-kB en la línea J-Jhan, y sin embargo la presencia de dicho consenso es esencial en los linfocitos CD4 en reposo para obtener un efecto transactivador de Tat.

4.7. En linfocitos CD4 el LTR puede ser inducido por vías alternativas a NF-kB.

En la figura 14 se observa que en condiciones en que el LTR es transactivado simultáneamente mediante la expresión de la proteína Tat bajo el control del promotor del CMV y la activación mediada por PMA, existe una actividad luciferasa débil pero detectable a partir del vector LTR Δ kB-Luc. Esto indica que en determinadas condiciones de activación celular y en presencia del transactivador viral Tat, los linfocitos CD4 podrían experimentar

una activación del LTR independiente del enhancer al igual que ocurre en la línea linfoblastoide J-Jhan.

Es importante señalar que este efecto es siempre considerablemente menor que cuando se utiliza un vector LTR que conserva las secuencias kB y que existen diferencias muy importantes entre los niveles de activación del vector LTR Δ kB-Luc en linfocitos CD4 y la línea J-Jhan.

4.8. Papel de las secuencias consenso NF-kB en la producción de la proteína Tat por el LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y en la línea linfoblastoide J-Jhan.

En las condiciones de infección por el VIH, la producción de las proteínas virales es dependiente de la regulación de la transcripción del genoma viral. Entre las proteínas reguladoras que amplifican enormemente la transcripción del genoma viral se encuentra la proteína Tat. Sin embargo, la producción de esta proteína depende del propio LTR del VIH y de la regulación de la actividad del mismo.

Con el fin de estudiar el papel de las secuencias reguladoras NF-kB en la producción del transactivador viral Tat, hemos analizado la transactivación del LTR del VIH por la proteína Tat cuando la expresión de ésta se encuentra bajo el control del propio LTR viral. Para estudiar el papel de NF-kB en este proceso hemos analizado la transactivación mediada por Tat cuando la secuencia consenso NF-kB se encuentra deletada en el LTR.

Como se muestra en la figura 15, cuando la producción de Tat es regulada por el propio LTR y no por el promotor del CMV, no se detecta en linfocitos CD4 una transactivación del LTR, probablemente debido a la falta de producción de Tat debido al bajo nivel transcripcional del LTR en este tipo celular.

Por el contrario, en la línea J-Jhan existe una transactivación del LTR cuando un vector LTR-Tat es transfectado en este tipo celular independientemente de la presencia o delección del consenso NF-kB en el vector de expresión LTR-Tat.

Estos datos apuntan a que la baja actividad transcripcional del LTR en los linfocitos CD4 conlleva una ausencia en la producción de la proteína Tat y una situación de silencio global del sistema. Sin embargo, en J-Jhan, al encontrarse la transcripción "abierta" debido a la intensa actividad basal del LTR existe una producción espontánea de la proteína Tat que origina una intensa transactivación del LTRWT-Luc cotransfectado en este tipo celular.

La activación mediante PMA origina en linfocitos CD4 una intensa transactivación del LTR cotransfectado con un vector de expresión LTRWT-Tat. Esta transactivación es muy superior a la detectada cuando el LTRWT-Luc es transfectado aisladamente y activado con PMA. Esto sugiere que la activación por PMA actúa sobre los dos vectores - el LTRWT-Luc y el LTRWT-Tat- originando en un primer momento la producción de la proteína Tat y posteriormente un efecto sinérgico de esta proteína con la célula activada de forma similar al observado en la figura 15.

Este efecto es abolido completamente cuando se utiliza un vector de expresión de Tat deletado en las secuencias kB en el LTR. En estas circunstancias, al ser la transactivación del LTR dependiente del enhancer NF-kB, no se produciría la producción de Tat y el único efecto observado es el que origina la activación mediante PMA sobre el LTRWT-Luc.

Sin embargo, la delección del consenso NF-kB no afecta la producción de la proteína Tat por el LTR en la línea linfoblastoide J-Jhan, por lo que el efecto de transactivación se observa independientemente de la presencia del consenso NF-kB en el vector de expresión LTR-Tat.

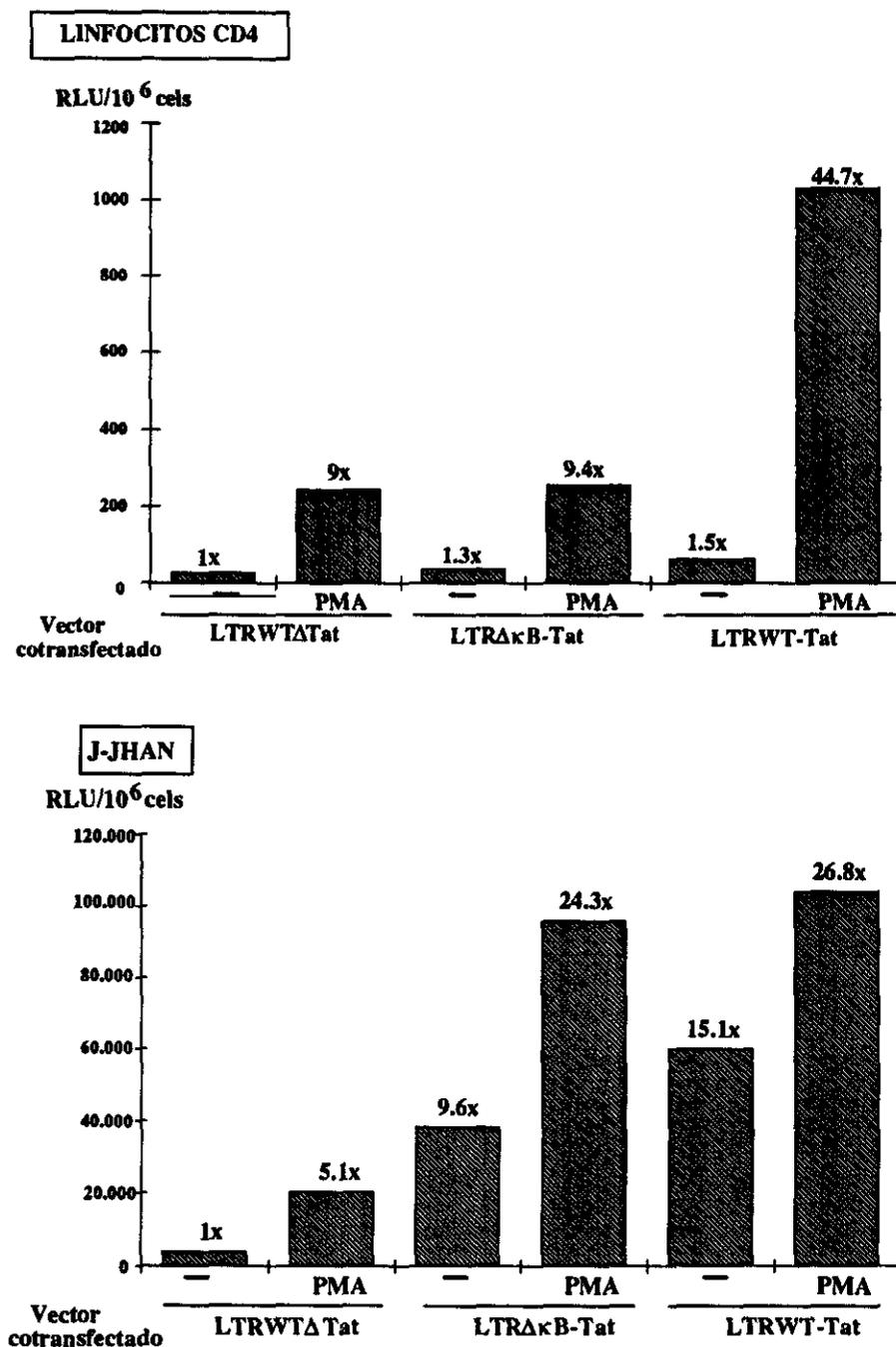


FIGURA 15. Papel de las secuencias consenso NF- κ B en la producción de la proteína Tat por el LTR del VIH en linfocitos CD4 normales y en la línea linfoblástide J-Jhan. Un total de 10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica o células J-Jhan fueron cotransfectadas con el plásmido LTRWT-Luc ($1\mu\text{g}/10^6$ de células) y distintos vectores de expresión de Tat ($0.5\mu\text{g}/10^6$ de células). La producción de Tat se encuentra bajo el control de un LTR completo (LTRWT-Tat) o deletado de las secuencias consenso NF- κ B (LTR $\Delta\kappa$ B-Tat). Un plásmido conteniendo una versión truncada de Tat bajo el control del LTR fue utilizado como control. Tras la transfección las células fueron mantenidas sin activar en medio de cultivo o fueron activadas con 25ng/ml de PMA. Veinticuatro horas después de la transfección se cuantificó el número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades Relativas de Luciferasa" por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel de amplificación de la actividad luciferasa respecto de la actividad del plásmido LTRWT-Luc transfectado en el mismo tipo celular. Se muestra uno de cinco experimentos representativos.

En resumen estos datos muestran que la producción de la proteína Tat a partir del LTR en los linfocitos CD4 es estrechamente dependiente de la activación celular mientras que en la línea linfoblastoide J-Jhan, la producción de Tat es independiente del consenso NF-kB en el LTR.

4.9. Análisis de las proteínas de la familia rel/NF-kB existentes en el núcleo de linfocitos CD4 en fase de reposo y tras activación.

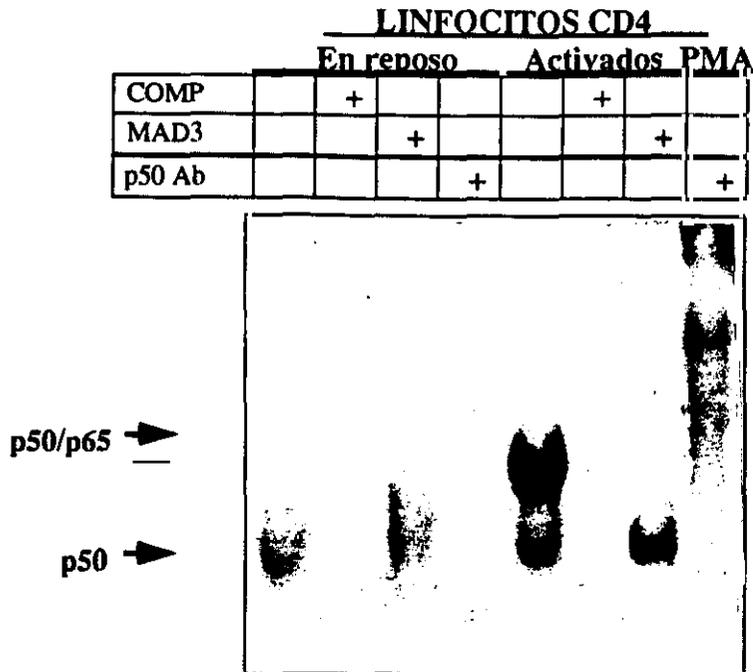
Extractos nucleares de linfocitos CD4 fueron analizados mediante ensayo de retardo en gel utilizando un oligonucleótido marcado conteniendo el doble motivo NF-kB existente en el LTR del VIH. En los linfocitos CD4 en reposo se detectó una proteína(s) capaces de unirse al consenso NF-kB. Estos complejos están compuestos de homodímeros de p50 según se demuestra en la figura 16, ya que anticuerpos dirigidos frente a la p50 de NF-kB inhibieron la unión al ADN de dichos complejos. Asimismo la incubación con I κ B α - una molécula capaz de unirse a los complejos heterodiméricos p50/p65 pero no a los homodímeros p50- no modificó la capacidad de unión al enhancer del VIH. Estos datos demuestran que en el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo existen homodímeros p50 capaces de realizar unión al ADN sin que sea detectable la presencia de heterodímeros p50/p65.

La activación con PMA produce la inducción de complejos con un patrón de migración más lento y cuya unión al ADN se ve inhibida por anticuerpos frente a la p50 y por la proteína I κ B α . Estos datos demuestran que dichos complejos se encuentran formados por heterodímeros p50/p65.

El análisis mediante western blot de las proteínas presentes en linfocitos CD4 confirmó la presencia de grandes cantidades de p50, pero no de p65 en las células en reposo. Tras la inducción con PMA, la p65 es claramente detectable en el núcleo de los linfocitos activados junto con una superinducción de la proteína p50.

Figura 16

a. Retardo en gel



b. Western Blot Nuclear

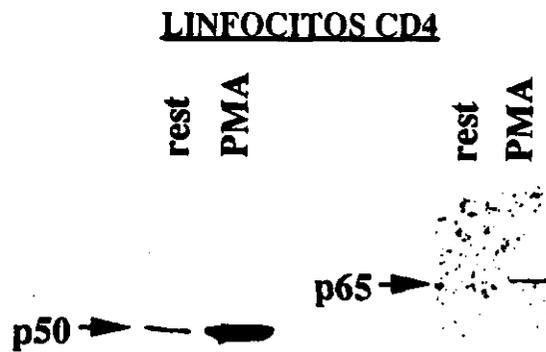


Figura 16 . Análisis de los factores de transcripción nuclear existentes en el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo y tras inducción con PMA. a. Ensayo de retardo en gel. Tres microgramos de proteínas nucleares obtenidas de linfocitos CD4 en reposo o activados 18h con PMA fueron incubados con un oligonucleótido conteniendo los dos consensos NF-kB del LTR del VIH marcado con α -P³²-dCTP. La especificidad de la unión ADN-proteína fue valorada mediante competición con un exceso 40 molar de oligonucleótido no marcado. Los extractos nucleares fueron preincubados con un antisuero dirigido frente a la subunidad p50 de NF-kB y con Ikb α para caracterizar las proteínas que componen los complejos detectados. b. Western blot. Diez microgramos de proteína nuclear son sometidos a electroforesis en gel, transferido a una membrana e hibridado e hibridada con anticuerpos dirigidos frente a la p50 y la p65. La interacción antígeno-anticuerpo fue revelada mediante la utilización de un kit de detección de quimioluminiscencia (Amersham).

4.10. La sobre expresión de la proteína p50 induce una colaboración con Tat en la transactivación del LTR del VIH.

Dado que en linfocitos CD4 en reposo celular existe una presencia constitutiva de la subunidad p50 de NF- κ B en el núcleo y que la presencia del consenso κ B en el LTR conlleva un aumento en la expresión basal de Tat cuando esta proteína es expresada a partir de un vector CMV-Tat (Fig.4), es posible que la proteína p50 cumpla un papel cooperador con Tat. En este supuesto, aunque la presencia de p50 nuclear no se traduce en nuestro sistema experimental en ninguna transcripción detectable, la ocupación del sitio κ B en el LTR permitiría una cooperación con otros factores entre los cuales se encontraría la proteína Tat del VIH. Esto explicaría las diferencias de expresión basal encontradas cuando un vector CMV-Tat es cotransfectado con un LTRWT-Luc o un LTR Δ κ B-Luc. Para apoyar esta hipótesis cotransfectamos un vector de expresión de p50 junto a un vector de expresión de Tat con el fin de analizar el sinergismo Tat-p50.

En la figura 17 se muestra que aunque la transfección de un vector de expresión de p50 no permitió inducir el LTR sobre sus niveles basales, la coexpresión de la proteína Tat y p50 originó un aumento en la expresión del LTR respecto a la transfección de Tat aisladamente.

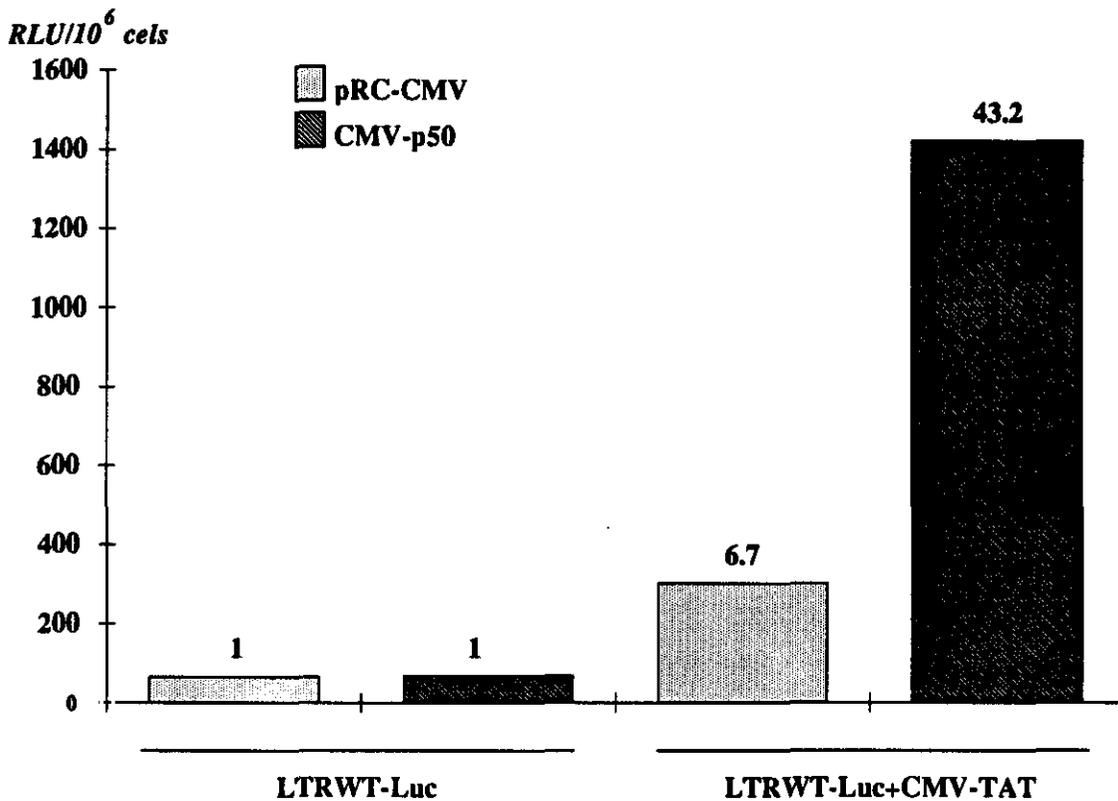


FIGURA 17. Sinergia de p50 y la proteína Tat en linfocitos CD4 normales. Un total de 10^7 linfocitos CD4 aislados de sangre periférica fueron cotransfectados con el plásmido LTRWT-Luc ($1\mu\text{g}/10^6$ de células) CMV-Tat ($0.5\mu\text{g}/10^6$ de células) y un vector de expresión de p50 o un vector vacío (pRCCMV). Tras la transfección las células fueron mantenidas sin activar en medio de cultivo. Veinticuatro horas después de la transfección se cuantificó el número de células viables y se midió la actividad luciferasa por luminometría. Los resultados se expresan en "Unidades Relativas de Luciferasa" por millón de células. El número situado sobre las barras indica el nivel de amplificación de la actividad luciferasa respecto de la actividad del plásmido LTRWT-Luc transfectado en el mismo tipo celular. □ Cotransfección del vector control pRCCMV junto con CMV-Tat. ■ Cotransfección de CMVp50 y CMV-Tat. Se muestra uno de cinco experimentos representativos.

4.11. Estudio de la replicación de provirus con mutaciones en el consenso NF-kB en linfocitos CD4.

Con el fin de estudiar la importancia del enhancer NF-kB en la replicación de un virus completo, infectamos linfocitos CD4 con provirus salvajes o mutados en el enhancer kB del LTR. Dado que la baja dosis infectiva utilizada no nos permitió detectar la replicación viral mediante ensayo de transcriptasa inversa o detección de la proteína p24 del VIH, la transcripción viral fue estudiada mediante la detección de ARN por retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).

Como se demuestra en la figura 18 las células infectadas con el provirus salvaje o mutado contenían un número similar de copias provirales al inicio de la infección (5 días), lo que demuestra que la infectividad del virus y los procesos precoces de infección (retrotranscripción) no se vieron afectados por la mutación en las secuencias NF- κ B.

Cuatro semanas después del inicio de la infección no se detectaron copias de ADN proviral en las células que habían sido infectadas con el virus mutado, mientras que en las infectadas con el virus salvaje la detección de ADN proviral fue constante a lo largo de la infección. El ARN viral fue detectado únicamente en las células infectadas con la cepa salvaje y no fue posible detectar transcripción de la cepa mutada a pesar de utilizar un método de alta sensibilidad como la PCR.

Estos experimentos demuestran que la iniciación y persistencia de la transcripción del VIH en linfocitos CD4 depende de forma absoluta de la presencia del consenso NF- κ B en el LTR. Dichas secuencias representan pues un elemento esencial para permitir la transactivación del LTR y la transcripción del genoma viral.

Figura 18.

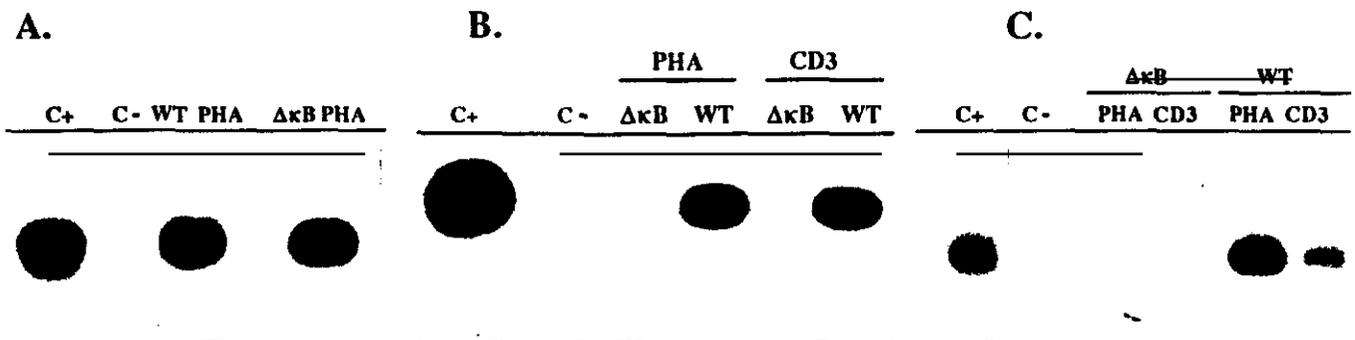


Figura 18. Estudio de la replicación de provirus con mutaciones en el consenso NF- κ B en linfocitos CD4. Linfocitos CD4 purificados fueron infectados con un provirus salvaje (WT) o mutado en el enhancer κ B ($\Delta\kappa$ B). Tras la infección las células fueron estimuladas con PHA o anticuerpos antiCD3 en presencia de macrófagos autólogos. Utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección del ADN proviral fue evaluada cinco días tras la infección (A). Asimismo se realizó la detección del ADN proviral (B) y de transcritos de ARN viral (C) al finalizar el cultivo (4 semanas). Una secuencia de 115 pares de bases del gen *gag* fue amplificada e hibridada con una sonda interna al fragmento amplificado. El ADN y el ARN de las células 8E5 (infectadas por el VIH de forma crónica) fueron utilizadas como control positivo (C+). Linfocitos no infectados fueron utilizados como control negativo (C-).

5. DISCUSIÓN

5.1. La baja actividad transcripcional del LTR del VIH en linfocitos CD4 como mecanismo de latencia viral.

Los datos contradictorios existentes en la literatura, especialmente los referentes al diferente comportamiento biológico del VIH en linfocitos CD4 normales y en líneas linfoblastoides T en cuanto a replicación, nos han llevado a analizar los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno.

Dado que en linfocitos CD4 en estado de reposo celular el VIH permanece en un estado de latencia absoluta, sin replicación viral detectable, y que los mecanismos reguladores de la iniciación de la transcripción actúan sobre las secuencias localizadas en el LTR del VIH, hemos estudiado el comportamiento del LTR viral en linfocitos CD4 y en una línea linfoblastoide T (J-Jhan).

a. Aspectos técnicos.

Para conseguir estos objetivos hemos puesto a punto técnicas de aislamiento y transfección transitoria de linfocitos CD4 en reposo y construido vectores que nos permitan estudiar el papel regulador de NF- κ B en este contexto celular.

Las técnicas de aislamiento de poblaciones linfocitarias altamente purificadas es un paso esencial para poder estudiar el comportamiento del LTR en una de sus dianas naturales, los linfocitos CD4. El aislamiento de poblaciones altamente purificadas de linfocitos CD4 nos permite por una parte transfectar y analizar el funcionamiento del LTR en este tipo celular determinado, y por otra evitar la activación originada a consecuencia de la producción espontánea de citocinas por otras poblaciones celulares. Es conocido que la adherencia de los monocitos de sangre periférica induce la síntesis y liberación al medio de interleukina 1, Tumor necrosis factor e interleukina 6 entre otros factores. Si queremos analizar el funcionamiento del LTR en células no activadas, la separación de poblaciones

purificadas es por lo tanto una condición experimental necesaria. El método de aislamiento escogido realiza una selección negativa de los linfocitos CD4 de sangre periférica mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las demás poblaciones celulares de sangre periférica y la separación con esferas magnéticas recubiertas con anticuerpos policlonales frente a inmunoglobulinas de ratón. Este método nos permite obtener poblaciones altamente purificadas de linfocitos CD4 (por encima del 90% en la mayoría de los experimentos) y no interaccionar con las moléculas de transducción de señal de esta subpoblación con el fin de obtener células en estado de reposo. Especialmente importante es no realizar selección positiva de la subpoblación "Helper", ya que la proteína CD4 que caracteriza a esta población es una molécula de transducción de señal, y la interacción con determinados anticuerpos provoca una activación de dichos mecanismos.

La técnica de transfección transitoria escogida es la electroporación. El motivo es que es la que presenta mayor eficacia de transfección de este tipo celular y es altamente reproducible. Los parámetros de transfección fueron optimizados en experimentos previos mediante la transfección de distintos vectores de expresión de luciferasa: LTR del VIH, promotor del Virus del Sarcoma de Rous y Citomegalovirus humano. Sin embargo, a excepción del promotor de Citomegalovirus, el resto de vectores presentó de forma constante un nivel de expresión muy bajo, cercano al nivel umbral de detección de la técnica.

Para evaluar de forma más precisa el grado de transfección de los linfocitos CD4 realizamos una cuantificación del ADN plasmídico utilizado mediante extracción en gradiente de Hirt (Hirt, 1967). Esta técnica, descrita inicialmente para purificar el ADN viral de células infectadas, había sido puesta previamente a punto en el laboratorio para normalizar la transfección entre diferentes líneas celulares o entre células infectadas o no de la misma línea celular (Bachelerie y cols., 1991). Aunque habitualmente la normalización de las transfecciones se hace incluyendo un vector cuya expresión se detecta por otro medio (Cloranfenicol Acetil Transferasa p.e.) en nuestra experiencia este método no es

suficientemente preciso cuando se consideran líneas celulares diferentes que pueden expresar con distinta intensidad el vector utilizado en la normalización. Esto es especialmente importante en el caso de los linfocitos CD4 en que los diferentes vectores se expresan a un nivel muy bajo (Figura 11).

En experimentos preliminares observamos que existe una unión pasiva del ADN plasmídico a la membrana plasmática celular, incluso en ausencia de electroporación. Esto hace que la cuantificación del ADN plasmídico por gradiente de Hirt en células totales se vea sometido a sesgos debido a la captura "pasiva" del ADN. Sin embargo, si separamos mediante lisis en detergente el núcleo del citosol y membrana plasmática observamos que el ADN cuantificado corresponde efectivamente a material transfectado y no absorbido pasivamente. Por ese motivo elegimos la cuantificación del ADN plasmídico en el compartimento nuclear de la célula como el parámetro que de manera más precisa nos permitía cuantificar la transfección de nuestros vectores.

Para analizar el papel de NF- κ B en la transactivación del LTR viral clonamos el LTR del VIH (regiones U3+R) en dos versiones, completa o deletada en el consenso NF- κ B, en vectores conteniendo el gen de la luciferasa como marcador. El motivo para seleccionar este marcador es su mayor sensibilidad respecto de otros (Schwartz y cols.,1989).

b. La actividad transcripcional del VIH del LTR es apenas detectable en linfocitos

CD4 en reposo.

Una vez que conseguimos condiciones de electroporación comparables en cuanto a eficacia en linfocitos CD4 y la línea J-Jhan, analizamos el nivel de expresión del LTR del VIH en ambos tipos celulares. Como puede observarse en la figura 10, en la línea linfoblastoide J-Jhan el LTR presenta valores elevados de transactivación (entre 600 y 15.000 RLU/10⁶ de células en diferentes experimentos). Dicha expresión no fue debido a la transactivación del LTR a través del "enhancer" del VIH, ya que un vector deletado en el consenso NF- κ B se transactivó a niveles similares a los obtenidos con el vector "salvaje".

Este dato apunta a que en las células linfoblastoides existe una transcripción "abierta" del LTR que es independiente de la regulación a través del enhancer NF-kB. Nuestro diseño experimental y los plásmidos utilizados no nos permiten definir las secuencias responsables de esta actividad transcripcional en células linfoblastoides, pero los diferentes datos de la literatura apuntan a la importancia de las secuencias Sp1 y TATA en el nivel basal de actividad transcripcional existente en líneas tumorales (Jones.,1989; García y cols.,1989; Harrich y cols.,1990; Berkhout y Jeang 1992; Gaynor.,1992; Olsen y cols.,1992).

Sin embargo en linfocitos CD4 normales en estado de reposo celular el LTR del VIH se encuentra en una situación de "silencio" transcripcional. Nuestros resultados permiten afirmar que el bajo nivel de transactivación del LTR observado en linfocitos CD4 (Figura 10) no es debido a una baja eficiencia en la transfección de este tipo celular (Figura 12) sino a una baja permisividad de su entorno celular para la iniciación de la transcripción del genoma del VIH. A diferencia de lo observado en líneas tumorales, las regiones Sp1 y TATA son incapaces de inducir una fuerte actividad basal del LTR del VIH en linfocitos CD4.

El LTR del VIH no parece ser un caso particular ya que otros vectores que presentan un nivel basal elevado en líneas linfoblastoides no tienen actividad transcripcional detectable cuando se transfectan en linfocitos CD4 (Figura 11). El entorno celular de los linfocitos CD4 es por lo tanto esencialmente "inerte" en ausencia de activación. Esta ausencia de actividad transcripcional basal, secundaria probablemente a la ausencia de factores de transcripción activos, constituye una condición especialmente adecuada para permitir situaciones de latencia viral.

Esta baja actividad transcripcional ocasiona dificultades técnicas importantes ya que para calcular los niveles de transactivación inducidos por los diferentes estímulos es necesario obtener niveles de actividad luciferasa por encima del umbral de detección para permitir

cálculos fiables. Para superar este obstáculo técnico nos hemos visto obligados a trabajar con grandes cantidades de células con el fin de obtener niveles de actividad luciferasa detectables. Así, mientras 50.000 células J-Jhan bastan para obtener niveles de actividad luciferasa detectables, es preciso realizar la medición en al menos 5 millones de linfocitos CD4 transfectados en reposo para detectar actividad transcripcional cuando se transfecta un vector LTR aislado.

c. La activación celular origina la transactivación del LTR viral a través de las secuencias "enhancer".

La activación de ambos tipos celulares mediante ésteres de forbol origina una repuesta de activación del LTR viral por encima de los niveles basales. Como se observa en la figura 10 la transactivación obtenida sobre los niveles basales en cada tipo celular es debido a la inducción del "enhancer" viral, ya que vectores deletados en el consenso NF-kB no son transactivados por el PMA.

NF-kB colabora en la actividad transcripcional como elemento "inducible" en el curso de los procesos de activación celular. Sin embargo aunque cuantitativamente la transactivación del "enhancer" viral aporta niveles de transactivación similares en linfocitos CD4 y células linfoblastoides la importancia de este fenómeno es cualitativamente muy diferente según el tipo celular considerado: en la línea J-Jhan la activación del enhancer aumenta una transcripción basalmente elevada; por el contrario en los linfocitos CD4, la transactivación del enhancer NF-kB condiciona un fenómeno de tipo "todo o nada".

La activación por PMA de los linfocitos CD4 permite que el LTR del VIH pase de una situación de silencio transcripcional a otra de transcripción activa. La importancia de la activación es por lo tanto mucho mayor en linfocitos CD4 que en líneas linfoblastoides, ya que en los primeros la dependencia de la activación celular para iniciar la transcripción viral es absoluta, mientras que en células linfoblastoides la activación se limita a aumentar la transcripción basal existente.

d. El problema de la latencia en la infección por el VIH.

El concepto de latencia en el curso de la infección VIH es un fenómeno controvertido. Una serie de autores niegan que la latencia exista realmente y basan sus argumentos en que en cualquier momento de la infección por el VIH es posible detectar una elevada carga viral en la sangre de los pacientes seropositivos.

Sin embargo es preciso diferenciar claramente la latencia a nivel celular de la latencia a nivel de relación global entre el VIH y el huésped infectado.

Desde el punto de vista clínico es correcto afirmar que la latencia viral no existe al ser posible aislar el VIH en todos los estadios de la enfermedad (Ho y cols.,1989). Esto es debido a que en el organismo se produce la resultante del estado de replicación en todas las células infectadas por el VIH. En cada momento, aunque exista un número mayoritario de células infectadas de forma latente, existen asimismo macrófagos tisulares que soportan la replicación activa del VIH y linfocitos CD4 que están siendo activados y por lo tanto replican el virus. Sin embargo, estos datos no contradicen la existencia a nivel de cada célula individual de un proceso de latencia viral en la infección por el VIH.

Recientemente se ha demostrado que la carga viral se encuentra localizada en los ganglios linfáticos que constituyen el 98% de los linfocitos totales del organismo (Embretson y cols.,1993; Pantaleo y cols.,1991). En los órganos linfoides hasta un 40% de los linfocitos CD4 se encuentran infectados desde los primeros estadios de la enfermedad. Existe además una enorme cantidad de virus libre "atrapado" en las prolongaciones interdigitantes de las células dendríticas. Sin embargo, el número de linfocitos que replican activamente el VIH es muy reducido, entre el 0.3 y el 3% de las células infectadas (Embretson y cols.,1993). Estos datos apoyaría la hipótesis según la cual el sistema inmune es destruido directamente por el virus (efecto citopático directo), pero confirman que en la mayoría de los linfocitos CD4 infectados existe un estado de latencia real, al menos en algunos momentos de su evolución.

La latencia celular es por lo tanto un fenómeno real que ha sido demostrado "in vivo" en linfocitos CD4 (Harper y cols.,1986; Schnittman y cols.,1989; 1990; Bubrinsky y cols.,1991). Esto se ve correlacionado por los estudios "in vitro" y "ex vivo" en los que el cultivo de linfocitos de sangre periférica en fase de reposo no permite detectar ningún tipo de producción viral. Sin embargo, la activación de las mismas células mediante mitógenos, presentación antigénica o anticuerpos dirigidos contra el complejo CD3/Ti originan una replicación viral masiva (Barré-Sinoussi y cols. 1983; Popovic y cols.,1984; McDougal y cols.,1985; Folks y cols.,1986, Zacky cols.,1990; Bubrinsky y cols.,1991; Saksela y cols.,1993).

e. La ausencia de actividad transcripcional en linfocitos CD4 en reposo como mecanismo molecular para explicar la latencia viral en este tipo celular.

El entorno celular de los linfocitos T en reposo constituye un contexto biológico especialmente adecuado para la latencia debido a la ausencia de los factores necesarios para la replicación del VIH (Virelizier.,1990). Sin embargo, así como el linfocito T en reposo presenta un ambiente celular adecuado para la latencia, el contexto biológico del linfocito T activado suministra todos los factores necesarios para permitir una replicación masiva del VIH. Esto es debido a que la activación celular produce en los linfocitos T la inducción de citokinas, receptores de citokinas, factores de transcripción, proto-oncogenes y moléculas de activación en la superficie celular (Crabtree.,1989).

El linfocito T CD4 representa probablemente el reservorio más importante del VIH al permitir la latencia viral en su estado de reposo y una replicación viral masiva en el curso de los procesos de activación inmune. El silencio transcripcional existente en la célula en reposo y la activación NF-kB dependiente de la transcripción constituyen probablemente las bases moleculares de la latencia y reactivación en la principal diana de infección del VIH.

5.2. Diferentes requerimientos y modo de actuación de la proteína Tat en linfocitos CD4 y en líneas linfoblastoides T.

La proteína transactivadora Tat del VIH constituye un elemento central en la regulación de la replicación viral. La presencia de la proteína Tat origina un aumento en la transcripción del genoma viral del orden de 10^3 - 10^4 (Sodroski y cols.,1985; Goh y cols.,1986; Arya y cols.,1986; Hauber y cols.,1987; Jones.,1993; 3). La diana de Tat es la secuencia TAR, situada en la región +1/+64, es decir inmediatamente después del sitio de iniciación de la transcripción. Los primeros 59 nucleótidos de los transcritos del VIH configuran una estructura del ARN que permite la interacción con la proteína Tat. El transactivador del VIH es por lo tanto un "enhancer" ARN (Rosen y cols.,1985; Hauber y cols.,1988; Sharp y Marciniak.,1989; Cullen.,1993). El mecanismo de acción de Tat no se encuentra completamente dilucidado y probablemente actúe a distintos niveles. Inicialmente se demostró que Tat aumentaba la tasa de transcripción del genoma del VIH y que dicho efecto era debido a una mayor elongación de los transcritos de ARNm. En ausencia de Tat se produce una elongación incompleta del ARNm y la presencia de Tat permite que su síntesis alcance la longitud correspondiente a todo el genoma viral (Cullen y cols.,1986; Peterlin y cols.,1986; Rosen y cols.,1986; Kao y cols.,1987; Selby y cols.,1989; Braddock y cols., 1989). Junto a un efecto "elongador" de Tat, muchos datos experimentales apuntan a que Tat probablemente actúa asimismo a nivel de iniciación de la transcripción (Hauber y cols.,1987; Rice y cols.,1988; Cullen.,1991;1993).

Los datos obtenidos muestran que Tat es un elemento esencial en la regulación de la transcripción en linfocitos CD4, pero que sus requerimientos tanto de producción como de actividad son muy diferentes a los existentes en líneas linfoblastoides T. Mientras en células linfoblastoides Tat se expresa y actúa de forma enhancer independiente, en los linfocitos CD4, la función de Tat es absolutamente dependiente de NF-kB.

a. El efecto transactivador de Tat en linfocitos CD4 es dependiente de la presencia del consenso NF-kB en el LTR.

La expresión de la proteína Tat mediante un vector de expresión origina una transactivación del LTR viral en linfocitos CD4 y células linfoblastoides (Figuras 13 y 14). Se observa asimismo un efecto sinérgico entre la activación celular inducida por el PMA y la expresión de la proteína Tat como ha sido descrito en diferentes sistemas celulares.

En este sentido se ha descrito una cooperación entre Tat y secuencias localizadas en el LTR viral como Sp1 y NF-kB y el sinergismo entre la proteína Tat y factores transcripcionales que se unen a estas secuencias consenso (Berkhout y cols.,1990; Harrich y cols.,1990; Bachelierie y cols.,1991; Liu y cols.,1992; Berkhout y Keang.,1992; Kamine y Chinnadurai.,1992; Taylor.,1992). Todos estos datos apuntan a la existencia de una colaboración a nivel de iniciación de la transcripción entre distintos factores celulares y la proteína transactivadora Tat (Wu y cols.,1991; Sheline y cols.,1991; Gatignol y cols.,1989; Marciniak y cols.,1990; Wu y cols., 1988; Pognonec y Roeder.,1991). En líneas linfoblastoides, aunque se ha descrito una cooperación entre Tat y factores Sp1, NF-kB y TATA, fundamentalmente (Gaynor.,1992), parecen ser las secuencias Sp1 y TATA las más implicadas en esta cooperación (Berkhout y Keang.,1992; Kashanchi y cols.,1994) teniendo NF-kB un papel secundario en este proceso, ya que la delección de las secuencias kB en el LTR no impide la transactivación mediada por Tat.

Sin embargo, en linfocitos CD4, la delección del consenso kB en el LTR abolió completamente la función de la proteína Tat expresada a partir de un vector CMV-Tat. La falta de respuesta obtenida no puede ser achacada a una ausencia en la producción de Tat, ya que el promotor CMV se expresa a un nivel suficiente en linfocitos CD4; por otra parte, la expresión de Tat sí transactiva un LTR completo, por lo que la ausencia de transactivación de un vector deletado en el consenso kB no es debido a una falta de producción de la proteína.

Estos datos muestran una dependencia absoluta del consenso kB en linfocitos CD4 para permitir la transactivación de Tat. A su vez revelan una diferencia cualitativa en cuanto a los requerimientos para la función de Tat en células linfoblastoides y en linfocitos CD4 normales. En la línea J-Jhan, la delección del consenso kB en el LTR disminuyó la transactivación inducida por Tat pero no modificó cualitativamente esta respuesta. Sin embargo en linfocitos CD4, la delección del consenso kB introduce en esta ocasión un fenómeno de "nada o todo".

Nuestros datos apoyan la hipótesis de que mientras que en líneas linfoblastoides la cooperación entre Tat y factores celulares que se unen al LTR se produce esencialmente por interacción con Sp1 y el complejo transcripcional primario, en linfocitos CD4 NF-kB parece ser el factor esencial para mediar esta cooperación. Una vez más es preciso decir que nuestros vectores y experimentos no están diseñados para estudiar la interacción entre Tat y otros factores de transcripción como Sp1. Sin embargo, el hecho de que la delección del consenso kB origine una abolición del efecto transactivador de Tat a pesar de que las secuencias Sp1 no se ven modificadas ni en su presencia ni en su situación espacial, apunta a que estos factores no son importantes en el contexto celular de los linfocitos CD4.

b. En condiciones de fuerte sinergia entre Tat y activación celular, existe una transactivación del LTR independiente de NF-kB.

En condiciones experimentales en que existe una sinergia entre Tat y activación celular, existe una débil pero reproducible transactivación del LTR deletado en las secuencias kB (Figura 14). Aunque este efecto es modesto, apunta la posibilidad de que en determinadas situaciones de activación celular, pueden existir vías alternativas de activación del LTR en linfocitos CD4. Dada la débil expresión del LTR deletado en el consenso kB en esta situación si se compara al efecto obtenido con un LTR completo, la relevancia de este fenómeno es probablemente menor, pero no puede descartarse que pueda ser funcional en situaciones muy precisas.

c. La producción de la proteína Tat a partir del promotor autólogo del VIH, es absolutamente dependiente del consenso NF-kB.

En los experimentos referidos hasta el momento, la producción de Tat es originada por expresión a partir de un promotor heterólogo. Sin embargo, en el curso de la infección por el VIH "in vivo", la producción de Tat es dependiente del propio LTR del VIH. Con el fin de analizar la dependencia de la producción de Tat del consenso kB, clonamos un cDNA de Tat bajo el control de las secuencias reguladoras del LTR, completas o deletadas en el consenso NF-kB.

Como se muestra en la figura 15, la transfección de un vector LTR-Tat en J-Jhan originó una intensa actividad luciferasa, lo que demuestra que la transfección de un vector de expresión de Tat bajo el control del LTR en células linfoblastoides origina una intensa expresión de Tat. Este fenómeno es esperable, ya que al existir una transcripción abierta en este tipo celular, al igual que existe una expresión basal de la actividad luciferasa, es esperable que se produzca una expresión de Tat a partir de las mismas secuencias reguladoras que se encuentran basalmente activadas en este tipo celular. La activación celular originó un efecto sinérgico muy superior al obtenido en ausencia del vector LTR-Tat, lo que demuestra que la activación por PMA induce ambos vectores (LTR-Luc y LTR-Tat) y origina tanto una mayor producción de Tat como una transactivación NF-kB dependiente. Sin embargo, cuando Tat es expresado a partir de un vector LTR deletado en el consenso kB, no existe una disminución significativa de la actividad luciferasa respecto a un vector LTR-Tat. Esto demuestra una vez más que NF-kB es un elemento dispensable en el entorno celular de las células linfoblastoides, ya que los mecanismos kB-independientes permiten una actividad transcripcional suficiente del LTR.

La situación es radicalmente distinta en linfocitos CD4. En estas células, dada la ausencia de transcripción basal, la transfección de un vector LTR-Tat no origina ninguna actividad significativa de la actividad Luciferasa. La activación celular origina un efecto sinérgico ya que inicia la transcripción tanto del vector LTR-Luciferasa como del vector de

expresión de Tat bajo el control del LTR. En presencia del consenso NF-kB, la activación celular origina de nuevo un fenómeno de tipo "todo o nada" que se ve potenciado por el efecto sinérgico existente entre la expresión de Tat y la activación por PMA.

Sin embargo, la delección del consenso kB en el sistema anula completamente el efecto transactivador de Tat. En ausencia del consenso NF-kB no existe producción de Tat a partir de un LTR viral incluso en presencia de activación celular.

En conclusión, los datos obtenidos demuestran que NF-kB no es únicamente el elemento enhancer esencial en la transactivación inducida en el curso de los procesos de activación celular. Además, es un elemento fundamental para permitir tanto la producción de Tat a partir del promotor autólogo del VIH como la función transactivadora de la proteína Tat. La translocación nuclear de NF-kB representa por lo tanto el elemento central en la regulación de la replicación viral en los linfocitos CD4, ya que en su ausencia no existen mecanismos capaces de iniciar la transcripción del VIH.

5.3. Los linfocitos CD4 en reposo presentan en su núcleo complejos homodiméricos de la subunidad p50 de NF-kB que cooperan con la proteína Tat en la transactivación del LTR.

Con el fin de profundizar los mecanismos de regulación de NF-kB en linfocitos CD4, analizamos los factores de la familia rel/NF-kB existentes en el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo y tras activación con PMA.

Como era esperado, la activación celular originó la translocación de complejos heterodiméricos de NF-kB compuestos de las subunidades p50 y p65 como se demostró por la especificidad en la inhibición la unión ADN-proteína mediante anticuerpos anti p-50 e I κ B- α .

Sin embargo, sorprendentemente encontramos en el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo altas concentraciones de proteínas capaces de unirse al consenso NF- κ B y que están constituidas por homodímeros de p50.

¿Cual puede ser la función de estos complejos homodiméricos? Para algunos autores los complejos homodiméricos de p50 cumplirían una función de regulación negativa o de bloqueo transcripcional por ocupación del consenso NF- κ B. En esta hipótesis, la transactivación originada en el curso de los procesos de activación celular requeriría no sólo la translocación nuclear de complejos transcripcionalmente activos (p50/p65 p.e.) sino la liberación activa del consenso κ B ocupado por las proteínas p50 en forma homodimérica. Estos autores proponen que la proteína Bcl3 actuaría "arrancando" del consenso NF- κ B los homodímeros de p50 y permitiendo que los heterodímeros p50/p65 se unan al consenso.

Otros autores (Liou y Baltimore) soportan la teoría contraria según la cual los complejos p50 homodiméricos no serían necesariamente inactivos sino que su actividad transcripcional dependería de modificaciones en el consenso NF- κ B. Estos autores demuestran en experimentos en transcripción "in vitro" que homodímeros de p50 pueden mediar una actividad transcripcional sobre determinados genes κ B-dependientes.

Por otra parte, estos autores mantienen que Bcl3 podría ser un activador transcripcional de p50. Bcl3 contiene en su molécula dos dominios activadores funcionalmente activos. Para estos autores, el hecho de que Bcl3 inhiba el binding de p50 "in vitro" no sería necesariamente contradictorio con una actividad transcripcional del complejo Bcl3/p50 "in vivo" durante el tiempo en que el complejo trimérico ADN-p50-Bcl3 se encuentre unido.

Nuestros resultados no demuestran una actividad transcripcional de los homodímeros de p50 en linfocitos CD4 "per se". Sin embargo no corroboran la teoría según la cual es

necesario inhibir la unión de p50 al ADN para que los heterodímeros p50/p65 transactiven el LTR. Como se muestra en la figura 16, la activación con PMA induce la translocación nuclear de complejos heterodiméricos p50/p65 paralelamente a la activación del LTR, pero no existe una desaparición de la unión de los complejos de p50 al ADN. Por el contrario, la activación mediante PMA conlleva una superinducción de la proteína p50 detectada en técnicas de retardo en gel y mediante Western-Blot nuclear.

El resultado más sorprendente es el que sugiere que los complejos homodiméricos de p50 colaboran con la proteína Tat en la transactivación del LTR del VIH. En efecto, es importante recordar que la delección del consenso kB en el LTR origina una abolición de las función transactivadora de Tat en linfocitos CD4. Este dato sugiere que el consenso "per se" o un factor que se une al mismo media esta cooperación con Tat. Pero en el linfocito CD4 en reposo, el único factor unido al ADN es la subunidad p50 de NF-kB. Esta hipótesis abre la posibilidad de que exista una colaboración entre los factores de transcripción de la familia NF-kB y la proteína transactivadora Tat del VIH.

Una cooperación entre Tat y distintos factores celulares ha sido descrita previamente. De hecho se ha descrito una interacción directa entre Tat y la proteína TFIID del complejo transcripcional primario. Cooperación funcional entre Tat y Sp1 o NF-kB han sido asimismo descritas.

Para estudiar esta posible interacción entre Tat y la subunidad p50 de NF-kB realizamos experimentos de transfección transitoria en los que expresamos simultáneamente ambas proteínas. Como se muestra en la figura 17 existió un claro efecto sinérgico entre Tat y p50 sobre la transactivación del LTR del VIH.

El mecanismo de esta colaboración entre Tat y p50 no puede deducirse de los experimentos realizados aunque existirían dos posibilidades según consideremos el mecanismo de funcionamiento de Tat.

Tat codifica por una proteína de 15 kD cuya diana es la secuencia TAR, situada en la región +1/+64, es decir inmediatamente después del sitio de iniciación de la transcripción. Los primeros 59 nucleótidos de los transcritos del VIH configuran una estructura del ARN que permite la interacción con la proteína *Tat*. El transactivador del VIH es por lo tanto un "enhancer" ARN (Rosen y cols.,1985; Hauber y cols.,1988; Sharp y Marciniak.,1989; Cullen.,1993). El mecanismo de acción de *Tat* no se encuentra completamente dilucidado y probablemente actúe a distintos niveles. Inicialmente se demostró que *Tat* aumentaba la tasa de transcripción del genoma del VIH y que dicho efecto era debido a una mayor elongación de los transcritos de ARNm. En ausencia de *Tat* se produce una elongación incompleta del ARNm y la presencia de *Tat* permite que su síntesis alcance la longitud correspondiente a todo el genoma viral (Cullen y cols.,1986; Peterlin y cols.,1986; Rosen y cols.,1986; Kao y cols.,1987; Selby y cols.,1989; Braddock y cols., 1989). Por este motivo se denominó a esta proteína *Tat* (por Transactivation anti-terminator). Junto a este efecto "elongador" muchos datos experimentales apuntan a que *Tat* probablemente actúa asimismo a nivel de iniciación de la transcripción (Hauber y cols.,1987; Rice y cols.,1988; Cullen.,1991;1993).

En resumen, *Tat* podría actuar como elongador de transcritos cortos o pobremente procesivos o directamente a nivel de iniciación de la transcripción. En el primer caso, si *Tat* es un ARN enhancer y por lo tanto un "elongador", la cooperación con p50 apoyaría la hipótesis que mantiene un efecto transcripcional para los homodímeros p50. En efecto, si *Tat* actúa como elongador, es necesario que exista un nivel de transcripción basal suficiente para iniciar la síntesis del ARNm aunque no consiga que ese ARN se elongue adecuadamente. En este supuesto, p50 realizaría esta función, lo que sería coherente con el hecho de que no se detecte una actividad transcripcional de los homodímeros p50 "per se" suficiente para realizar una transcripción completa, pero permitiría que la proteína viral finalizara el proceso.

En el segundo supuesto, existiría una interacción directa entre *Tat* y los factores que se unen al "enhancer" viral, en este caso NF-kB. En esta alternativa, los homodímeros p50 podrían ser inertes transcripcionalmente, pero permitirían la transactivación inducida por *Tat*.

Existen en la literatura datos a favor de esta hipótesis. Se ha descrito en líneas mielomonocíticas (Harrich y cols.,1989) que Tat puede actuar sobre virus deletados en las secuencias TAR con tal de que exista activación celular y este efecto parece estar mediado a través de NF- κ B. Asimismo se ha descrito que la expresión de la proteína Tat en determinadas líneas gliales (Taylor y cols.,1992) origina la transactivación de vectores deletados en el elemento TAR y este fenómeno es dependiente de NF- κ B.

Nuestros datos no permiten decantarse por ninguna de las dos hipótesis, pero los datos descritos sugieren la existencia de una interacción nueva entre una proteína viral y un factor regulador de la transcripción que se encuentra en el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo. El modelo experimental descrito puede colaborar a dilucidar por una parte el mecanismo de acción de la proteína Tat, y por otra la potencial actividad transcripcional de la subunidad p50 de NF- κ B.

5.4. NF- κ B es un factor esencial para la replicación del VIH en linfocitos CD4.

A pesar de los datos que apoyan la existencia de un fenómeno real de latencia en linfocitos CD4 y que sugieren que NF- κ B es el elemento central en la regulación de la replicación del VIH a partir de su estado de latencia, algunos autores han demostrado que provirus deletados en el consenso NF- κ B replican con la misma intensidad que provirus salvajes en distintos sistemas celulares.

Dado que como hemos visto los requerimientos transcripcionales son muy diferentes en linfocitos CD4 normales y en células transformadas, la replicación de provirus defectivos en el consenso κ B en líneas linfoblastoides podrían explicarse en base a estas diferencias. Sin embargo, se ha demostrado que provirus deletados en NF- κ B replican en blastos linfocitarios T, poniendo en cuestión el papel de NF- κ B como elemento esencial en la transcripción del genoma del VIH (Leonard y cols.,1989).

Por este motivo es esencial demostrar en un sistema de infección viral que NF-kB es un elemento central en la regulación de la transcripción del VIH y que en su ausencia, la replicación viral debe encontrarse muy disminuída.

Nuestros resultados demuestran que NF-kB es un elemento necesario para la replicación del VIH en linfocitos CD4. Provirus mutados en el consenso kB no tienen replicación detectable en linfocitos CD4.

El sistema de infección utilizado difiere en varios puntos con los publicados en la literatura:

1. Las construcciones utilizadas portan mutaciones puntuales en el consenso kB y no deleciones del mismo. Esto puede ser un elemento importante al mantenerse la disposición espacial y las distancias relativas entre los diferentes elementos reguladores del LTR.

2. A diferencia de todos los autores no infectamos blastos linfocitarios previamente activados por mitógenos. En nuestra experiencia, en esta situación existe una inducción de un gran número de factores de transcripción que transactivan el LTR del VIH a niveles muy elevados, por lo que nos encontramos en una situación diferente de la existente en un linfocito CD4 que se encuentra infectado y que circula en estado de reposo celular. La preactivación celular con mitógenos aumenta enormemente la permisividad de los linfocitos CD4 a la infección por el VIH. En nuestro sistema infectamos en estado de reposo celular y realizamos una adsorción viral durante 12 horas al cabo de las cuales se induce una activación con mitógenos. Creemos que este sistema es más adecuado para estudiar los fenómenos de latencia y reactivación en el entorno celular de los linfocitos CD4.

3. Por último utilizamos dosis infecciosas muy inferiores a las descritas en la literatura que se sitúan en el orden de cientos de nanogramos o picogramos de p24. Pensamos que en esta situación las partículas virales arrastran una gran cantidad de factores celulares y virales que potencialmente podrían activar la transcripción del genoma viral. Se ha descrito que la proteína Tat puede ser solubilizada al medio de células infectadas, penetrar en células latentemente infectadas e iniciar la transcripción del genoma viral. Con el fin de evitar esta situación que

unido al punto anterior podría poner al linfocito CD4 en condiciones experimentales en las que se potenciara una vía de activación celular NF- κ B independiente, excepcional en otras situaciones.

En las condiciones descritas no hemos sido capaces de detectar signos de transcripción del genoma viral en linfocitos CD4 infectados con provirus mutados en el consenso NF- κ B.

Debido a las dosis de infección utilizadas, no nos ha sido posible detectar la presencia de proteína p24 en los sobrenadantes de los cultivos en ningún momento, por lo que hemos monitorizado la producción de ARN por Transcripción inversa y posterior amplificación mediante PCR. En la figura 18 se muestra que sólo en las células infectadas con provirus salvajes existe una transcripción del VIH y la transcripción del genoma viral. En los linfocitos infectados con provirus mutados en el consenso NF- κ B no fue posible detectar transcritos de ARN viral.

Con el fin de descartar que la mutación de NF- κ B conllevara un defecto en las fases iniciales de la infección (entrada, desencapsidación y retrotranscripción) estimamos el número de copias provirales existentes en los linfocitos CD4 cinco días después de la infección mediante PCR amplificando un fragmento del gen gag. El plazo transcurrido desde la infección hace improbable que las copias de ADN no se encuentren integradas, aunque este aspecto no ha sido evaluado en nuestro sistema. Los datos de la figura 18 muestran que el nivel de infectividad de ambos provirus fue similar y no justifica las diferencias encontradas en la replicación viral.

En resumen, la mutación en el consenso NF- κ B originó un defecto profundo en la replicación del VIH en linfocitos CD4. Este sistema confirma los datos obtenidos mediante ensayos de transfección transitoria y apoya la hipótesis que postula un papel esencial para NF- κ B en el proceso de reactivación del VIH en linfocitos CD4.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los linfocitos CD4 en estado de reposo presentan un entorno celular poco permisivo para la actividad transcripcional del LTR del VIH. Por el contrario en una línea linfoblastoide T (J-Jhan) la actividad transcripcional basal del LTR del VIH es muy elevada.
2. Tanto en linfocitos CD4 como en células linfoblastoides, la activación celular mediante PMA origina una transactivación del LTR del VIH que es dependiente de la secuencia consenso para el factor nuclear NF-kB.
3. Mientras que en células linfoblastoides, la activación celular conlleva un aumento cuantitativo del elevado nivel transcripcional que basalmente presenta el LTR, en linfocitos CD4 la activación celular origina un fenómeno cualitativo de tipo "todo o nada" en la iniciación de la transcripción del genoma del VIH.
4. Tanto en linfocitos CD4 como en células linfoblastoides existe un efecto sinérgico entre la expresión de la proteína Tat y la activación celular sobre la transactivación del LTR.
5. En linfocitos CD4 la iniciación de la transcripción del genoma del VIH por la proteína Tat es absolutamente dependiente de la presencia del consenso NF-kB en el LTR, mientras que en células linfoblastoides la transactivación inducida por Tat es independiente de NF-kB.
6. En los linfocitos CD4 en estado de reposo celular, la producción de la proteína Tat por el LTR es absolutamente dependiente de la activación del "enhancer" NF-kB. Por el contrario, en células linfoblastoides, existe una producción espontánea de Tat independientemente de la presencia del consenso NF-kB en el LTR.

7. En el núcleo de los linfocitos CD4 en reposo se detectan concentraciones elevadas de complejos homodiméricos formados por la subunidad p50 de NF-kB. La activación celular origina en estas células la translocación de complejos heterodiméricos p50/p65 y una superinducción de la subunidad p50 en el núcleo celular.
8. Los complejos homodiméricos de p50 existentes en el núcleo de linfocitos CD4 en reposo no median actividad transcripcional detectable pero cooperan con la proteína Tat en la iniciación de la transcripción del genoma del VIH. La ausencia de estas proteínas en el LTR origina una abolición de la transactivación mediada por Tat en linfocitos CD4.
9. La presencia del consenso NF-kB en el LTR es esencial para la replicación del VIH. Provirus portadores de mutaciones en el consenso NF-kB del LTR son defectivos para su replicación en linfocitos CD4.
10. Los mecanismos moleculares que regulan la transcripción del VIH son diferentes en linfocitos CD4 y en células linfoblastoides: NF-kB es un elemento regulador esencial en la iniciación de la transcripción en linfocitos CD4, mientras que en células linfoblastoides es un elemento dispensable.
11. Dadas las diferencias existentes entre células normales y transformadas, el estudio de la regulación transcripcional del VIH debe realizarse en modelos celulares próximos a la fisiología con el fin de obtener resultados relevantes para la comprensión del comportamiento biológico del VIH "in vivo".
12. En linfocitos CD4, la inducción de NF-kB modifica radicalmente la permisividad para la replicación del VIH en este tipo celular. Nuestros datos apoyan la hipótesis que propugna que la translocación nuclear de NF-kB es el principal mecanismo responsable de la iniciación de la transcripción del genoma viral en el curso de los procesos de activación linfocitaria y el principal elemento regulador de la replicación del VIH a partir de su estado de latencia.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad N and Venkatesan S. (1988). Nef Protein of HIV-1 Is a Transcriptional Repressor of HIV-1 LTR. Science, 241:1481-1485.

Aldovini A and Young RA. (1990). Mutation of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. J. Virol., 64:1920-1926.

Allan JS, Coligan JE, Lee TH, McLane MF, Kanki PJ, Groopman JE and Essex M. (1985). A new HTLV III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. Science, 230:810-813.

Arenzana-Seisdedos F, Fernández B, Domínguez I, Marcjacqué J, Thomas D, Díaz-Meco MT, Moscat J and Virelizier JL. (1993). Phosphatidylcholine Hydrolysis Activates NF-KB and Increases Human Immunodeficiency Virus Replication in Human Monocytes and T Lymphocytes. Journal of Virology, 67:6596-6604.

Arrigo SJ, Weitsman S, Rosenblatt JD and Chen ISY. (1989). Analysis of rev gene function on human immunodeficiency Virus type 1 replication in lymphoid cells by using a quantitative Polymerase chain reaction. J. Virol., 63:4875-4881.

Arthos J, Deen KC, Chaikin MA, Fornwald JA, Sathe G, Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, McDougal JS, Pietropaolo C, Axel R, Truneh A, Maddon PJ and Sweet RW. (1989). Identification of the Residues in Human CD4 Critical for the Binding of HIV. Cell, 57:469-481.

Arya SK and Gallo RC. (1986). Three novel genes from human T-cell lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from AIDS patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2209-2213.

Bachelier F, Alcamí J, Hazan U, Israel N, Goud B, Arenzana-Seisdedos F and Virelizier JL. (1990). Constitutive expression of human immunodeficiency virus (HIV) nef protein in human astrocytes does not influence basal or induced HIV long terminal repeat activity. J. Virol., 64:3059-3062.

Bachelier F, Alcamí J, Arenzana-Seisdedos F and Virelizier JL. (1991). HIV enhancer activity perpetuated by NF-kB induction on infection of monocytes. Nature, 350:709-712.

Baldwin AS, Azizkhan JC, Jensen DF, Beg AA and Coodly LR. (1991). Induction of NF-KB DNA-Binding Activity during the G0 to G1 Transition in Mouse Fibroblasts. Mol Cell Biol, 11: 4943-4951.

Baltimore D. (1970). Viral RNA dependant DNA polymerase. Nature, 226:1209-1211.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vesinet-Brun F and Rouzioux C. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. Science, 220:868-871.

Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA and Baldwin AS. (1992). IκB interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kB: a mechanism for cytoplasmic retention. Genes & Development, 6:1899-1913.

Berg J. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science, 232:485-487.

- Berkhout B, Silverman RH, and Jeang KT. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. Cell, 59:273-282.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB and Jeang K. (1990). TAR-Independent Activation of the HIV-1 LTR: Evidence That Tat Requires Specific Regions of the Promoter. Cell, 62:757-767.
- Berkhout B and Jeang K. (1992). Functional Roles for the TATA Promoter and Enhancers in Basal and Tat-Induced Expression of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat. Journal of Virology, 66:139-149.
- Bishop JM and Varmus HE. (1984). Function and origins of retroviral transforming genes. in Molecular Biology of Tumor viruses: RNA tumor viruses. R. Weiss y cols., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bours V, Burd PR, Brown K, Villalobos J, Park S, Ryseck R, Bravo R, Kelly K and Siebenlist U. (1992). A Novel Mitogen-Inducible Gene Product Related to p50/p105-NF- κ B Participates in Transactivation through a κ B Site. Mol. Cell. Biol., 12:685-695.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K and Siebenlist U. (1993). The Oncoprotein Bcl-3 Directly Transactivates through κ B Motifs via Association with DNA-Binding p50B Homodimers. Cell, 72:729-739.
- Bowman MR, MacFerrin KD, Schreiber SL and Burakoff SJ. (1990). Identification and structural analysis of residues in the V1 region of CD4 involved in interaction with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 and class II major histocompatibility complex molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9052-9056.
- Braddock M, Chambers A, Wilson W, Esnouf MP, Adams SE, Kingsman AJ and Kingsman SM. (1989). HIV TAT "activates" presynthesized RNA in the nucleus. Cell, 58:269-279.
- Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Barre-Sinoussi F, Klatzmann D, Saimot AG, Rozenbaum W, Montagnier L and Chermann JC. (1984a). Detection of IgG antibodies to lymphadenopathy-associated virus in patients with AIDS or lymphadenopathy syndrome. Lancet, 1:1253-1256.
- Brun-Vezinet F, Rouzioux C and Montagnier L. (1984b). Prevalence of antibodies to lymphadenopathy associated retrovirus in African patients with AIDS. Science, 226:453-456.
- Bubrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP and Stevenson M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. Science, 254:423-427.
- Capon DJ and Ward RH. (1991). The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. Ann. Rev. Immunol., 9:649-678.
- Castro KG, Ward JW, Slutsker L, Buehler J, Jaffe HW, Berkelman RL y Curran JW. (1993). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. CID, 17:802-810.
- Centers for Disease Control. (1981). Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. New York and California. Morbidity and Mortality Weekly Report, 30:305-308.
- Chang DD and Sharp PA. (1990). Messenger RNA transport and HIV rev regulation. Science, 249:614-615.

- Chiu I, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR and Aaronson SA. (1985). **Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses.** *Nature*, 317:366-368.
- Clayton LK, Hussey RE, Steinbrich R, Ramachandran H, Husain Y and Reinherz EL. (1988). **Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding.** *Nature*, 335:363-366.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H and Vogt P. (1986). **What to call the AIDS virus.** *Nature*, 321:10
- Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG and Haseltine WA. (1988). **Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1.** *Nature*, 334:532-534.
- Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG and Haseltine WA. (1990a). **Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein.** *J. Virol.*, 64:3097-3099.
- Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG and Haseltine WA. (1990b). **Identification of HIV-1 vpr product and function.** *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, 3:11-18.
- Comunidad de Madrid. Boletín de Vigilancia Epidemiológica.
- Cooney AJ, Tsai SY and O'Malley BW. (1991). **Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor binds to a negative regulatory region in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat.** *J. Virol.*, 65:2853-2860.
- Cordonnier A, Montagnier L and Emerman M. (1989). **Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding.** *Nature*, 340:571-574.
- Crabtree GR. (1989). **Contingent Genetic Regulatory Events in T Lymphocyte Activation.** *Science*, 243:355-361.
- Cullen BR. (1986). **Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism.** *Cell*, 46:973-982.
- Cullen BR. (1993). **Does HIV-1 Tat Induce a Change in Viral Initiation Rights?** *Cell*, 73:417-420.
- Cullen BR and Greene WC. (1989). **Regulatory pathways governing HIV-1 replication.** *Cell*, 58:423-426.
- Cullen BR, Hauber J, Cambell K, Sodroski JG, Haseltine WA and Rosen CA. (1988). **Sub-cellular location of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product.** *J. Virol.*, 62:2498-2501.
- Curran JW, Lawrence DN, Jaffe HW, Kaplan JE, Zyla LD, Chamberland M, Weinstel R, Lui KJ, Schonberg LB y Spira TJ. (1984) **Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) associated with transfusions.** *N.Eng.J.Med.*, 310:69-75.
- Curran JW, Morgan WM, Hardy AM, Jaffe HW, Darrow WW y Dowdle WR. (1985). **The epidemiology of AIDS: Current status and futur prospects.** *Science*, 229:1352-1357.
- Dagleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF and Weiss RA. (1984). **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** *Nature*, 312:763-767.

Dayton E, Powell D and Dayton A. (1989). **Functional analysis of CAR, the target sequence for the rev protein of HIV-1.** Science, 246:1625-1629.

Diaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Dominguez I, Diaz-Golpe V, Lain de Lera MT, Alcamí J, Paya CV, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier J and Moscat J. (1993). **A Dominant Negative Protein Kinase C α Subspecies Blocks NF- κ B Activation.** Mol. Cell. Biol., 13:4770-4775.

DiMarzo-Veronese F, DeVico A, Copeland T, Oroszlan S, Gallo RC and Sarngadharan M. (1985). **Characterization of gp41 as the transmembrane protein encoded by the HTLV III/LAV envelope gene.** Science, 229:1502-1405.

DiMarzo-Veronese F, Copeland T, DeVico A, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC and Sarngadharan M. (1986). **Characterization of highly immunogenic p66/p55 as the reverse transcriptase of HTLV III/LAV.** Science 1289-1291.

DiMarzo-Veronese F, Copeland T, Oroszlan S, Gallo RC and Sarngadharan M. (1988). **Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24.** J. Virol., 62:795-801.

Dingwall C, Ernberg I and Gait MJ. (1990). **HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure.** EMBO J., 9:4145-4153.

Duesberg PH y Vogt PK. (1970). **Differences between the ribonucleic acids of transforming and non-transforming avian tumor viruses.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 67:1673-1680.

Eiden LE and Lifson JD. (1992). **HIV interactions with CD4: a continuum of conformations and consequences.** Immunology Today, 13:201-210.

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K and Haase AT. (1993). **Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.** Nature, 362:359-362.

Fan C and Maniatis T. (1991). **Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway.** Nature, 354:395-398.

Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, Gallo RC and Wong-Staal F. (1986). **HTLV III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA.** Cell, 46:807-817.

Felber BK, Drysdale CM and Pavlakis GN. (1990). **Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the rev protein.** J. Virol., 64:3764-3741.

Felber BK, Hadzopoulou-Claradas M, Claradas C, Copeland T and Pavlakis GN. (1989). **The rev product of HIV-1 affects the stability and transport of the viral mRNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86:1495-1499.

Feng S and Holland EC. (1988). **HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar.** Nature, 334:165-167.

Fenner F. (1975). **The classification and nomenclature of viruses.** Intervirol., 6:1-12.

- Fisher AG, Ratner L, Mitsuya H, Marselle LM, Harper ME, Broder S, Gallo RC and Wong-Staal F. (1986). **Infectious Mutants of HTLV-III with Changes in the 3' Region and Markedly Reduced Cytopathic Effects.** Science, 233:655-659.
- Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo RC and Wong-Staal F. (1987). **The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro.** Science:888-893.
- Flugel RM. (1991). **Spumaviruses: a group of complex retroviruses.** J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 4:739-750.
- Folks TM, Powell D, Lightfoote M, Koenig S, Fauci AS, Benn S, Rabson A, Daugherty D, Gendelman HE, Hoggan MD, Venkatesan S and Martin MA. (1986). **Biological and Biochemical Characterization of a Cloned Leu-3 Cell Surviving Infection with the Acquired Immune Deficiency Syndrome Retrovirus.** J. Exp. Med., 164:280-290.
- Franza BR, Raucher FJ, and Josephs SF. (1988). **The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1-binding sites.** Science, 239:1150-1153.
- Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kelly K and Siebenlist U. (1992). **The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-KB-mediated inhibition.** Nature, 359:339-342.
- Fujita T, Nolan GP, Ghosh S and Baltimore D. (1992). **Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-KB.** Genes & Development, 6:775-787.
- Gallaher WR. (1987). **Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus.** Cell, 50:327-328.
- Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA and Yoshida M. (1988). **HIV/HTLV gene nomenclature.** Nature, 333:504
- García JA, Wu FK and Mitsuyasu R. (1987). **Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus.** EMBO J., 6:3761-3770.
- Garcia JA, Harrich D, Soutanakis E, Wu F, Mitsuyasu R and Gaynor R. (1989). **Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and Tar region sequences required for transcriptional regulation.** EMBO J., 8:765-778.
- Gartner S, Markovits P, Markovits DM, Kaplan MH, Gallo RC and Popovic M. (1986). **The Role of Mononuclear Phagocytes in HTLV-III/LAV Infection.** Science, 233:215-219.
- Gatignol A, Kumar a and Rabson A. (1989). **Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-responsive TAR element RNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7828-7832.
- Gaynor R. (1992). **Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression.** AIDS, 6:347-363.
- Geisler R, Bergmann A, Hiromi Y and Nusslein-Volhard C. (1992). **Cactus, a Gene Involved in Dorsal-ventral Pattern Formation of Drosophila, is Related to the IKB Gene Family of Vertebrates.** Cell, 71:613-621.

Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC and Meltzer MS. (1989). The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. AIDS, 3:475-495.

Ghosh S and Baltimore D. (1990a). Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. Nature, 344:678-682.

Ghosh S, Gifford AM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP and Baltimore D. (1990b). Cloning of the p50 DNA Binding Subunit of NF- κ B: Homology to rel and dorsal. Cell, 62:1019-1029.

Goh WC, Rosen CA, Sodroski JG, Ho DD and Haseltine WA. (1986). Identification of a protein encoded by the trans-activating gene tat III of the human T-cell lymphotropic retrovirus type III. J. Virol., 59:181-184.

Gorelick R, Nigida Jr SM, Bess Jr JW, Arthur LO, Henderson LE and Rein A. (1990). Non infectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. J. Virol., 64:3207-3211.

Greene WC. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. N. Engl. J. Med., 324:308-317.

Griffin GE, Leung D, Folks TM, Kunkel S and Nabel GY. (1989). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. Nature, 339:70-73.

Grilli M, Chiu J and Lenardo MJ. (1993). NF- κ B and rel-participants in a multiform transcriptional regulatory system. Int.Rev.Cytol., 143:1-62.

Haase AT. (1975). The slow infection caused by visna virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 72:101-156.

Haase AT, Stowring L, Narayan O, Griffin D and Price D. (1977). Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. Science, 195:175-177.

Haase AT. (1986). Pathogenesis of lentivirus infection. Nature, 322:130-136.

Hammes SR, Dixon EP, Malim MH, Cullen BR and Greene WC. (1989). Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: Evidence against its role as a transcriptional inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9549-9553.

Hansen SK, Nerlov C, Zabel U, Verde P, Johnsen M, Baeuerle PA and Blasi F. (1992). A novel complex between the p65 subunit of NF- κ B and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene. EMBO J., 11:205-213.

Harrich D, García J and Wu F. (1989). Role of Sp1 binding domains in "in vivo" transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. J.Virol., 63:2585-2591.

Harrich D, Garcia J, Mitsuyasu R and Gaynor R. (1990). TAR independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester stimulated T lymphocytes. EMBO J., 9:4417-4423.

Haseltine WA. (1988). Replication and pathogenesis of the AIDS virus. J. Acquired Immune Deficiency Syndrome, 1:217-240.

Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson-Johannes A, Mondal K, Ralph P and Baldwin AS. (1991). Characterization of an Immediate-Early Gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. Cell, 65:1281-1289.

Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, Mckeithan TW and Scheidereit C. (1992). **The ankyrin repeat domains of the NF- κ B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF- κ B DNA binding.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2489-2493.

Hauber J, Perkins A, Heimer EP and Cullen BR. (1987). **Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6364-6368.

Hauber J and Cullen BR. (1988). **Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat.** J. Virol., 62:673-679.

Hazan U, Thomas D, Alcamí J, Bachelier F, Israel N, Yssel H, Virelizier JL and Arenzana-Seisdedos F. (1990). **Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF- κ B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7861-7865.

Henkel T, Zabel U, Zee KV, Müller JM, Fanning E and Baeuerle PA. (1992). **Intramolecular Masking of the Nuclear Location Signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- κ B subunit.** Cell, 68:1121-1133.

Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y and Baeuerle PA. (1993). **Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B.** Nature, 365:182-185.

Horvat RT and Wood C. (1989). **HIV Promoter Activity in Primary Antigen-Specific Human T Lymphocytes.** The Journal of Immunology, 132:2745-2751.

Inoue J, Kerr LD, Kakizuka A and Verma IM. (1992). **I κ By, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF- κ B: A new member of the I κ B family.** Cell, 68:1109-1120.

Jacks T, Powers MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ and Varmus HE. (1988). **Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression.** Nature, 331:280-283.

Janeway CA. (1989). **The role of CD4 in T-cell activation: accessory molecule or co-receptor.** Immunology Today, 10:234-238.

Jones JA, Kadonga JT and Luciw PA. (1986). **Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor Sp1.** Science, 232:755-759.

Jones KA, Luciw PA and Duchange N. (1988). **Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader region of the HIV-1 and HIV-2 promoters.** Genes Dev. 2: 1101-1114.

Jones KA. (1989). **HIV trans-activation and transcription control mechanisms.** The New Biologist, 1:127-135.

Jones KA. (1993). **Tat and the HIV-1 promoter.** Curr. Opin. Cell. Biol., 5:461-468.

Kalyanaraman VS, Cabradilla CD, Getchell JP, Narayanan R, Braff EH, Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, Spira TJ and Kaplan J. (1984). **Antibodies to the core protein of lymphadenopathy-associated virus (LAV) in patients with AIDS.** Science, 225:331-333.

Kamens J, Richardson P, Mosialos G, Brent R and Gilmore T. (1990). **Oncogenic transformation by v-rel requires an amino-terminal activation domain.** Mol. Cell. Biol. 10:2840-2847.

- Kamine J, Subramanian T and Chinnadurai G. (1991). Sp-1-dependent activation of a sybthetic promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:8510-8514.
- Kamine J and Chinnadurai G. (1992). Synergistic activation of the Human Immunodeficiency Virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. Journal of Virology, 66:3932-3936.
- Kan NC, Franchini G, Wong-Staal F, Dubois GC, Robey WG, Lautenberger JA and Papas TS. (1986). Identification of HTLV III/LAV sor gene product and detection of antibodies in human sera. Science, 231:1553-1555.
- Kang S, Tran A, Grilli M and Lenardo MJ. (1992). NF-kB Subunit Regulation in Nontransformed CD4+ T Lymphocytes. Science, 256:1452-1456.
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA and Peterlin MB. (1987). Antitermination transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. Nature, 330:489-493.
- Kashanchi F, Piras G, Radonovich MF, Duvall JF, Fattaey A, Chlang C, Roeder RG and Brady JN. (1994). Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator Tat. Nature, 367:295-299.
- Kerr LD, Duckett CS, Wamsley P, Zhang Q, Chiao P, Nabel G, Mckeithan TW, Baeuerle PA and Verma IM. (1992). The proto-oncogene BCL-3 encodes an IkB protein. Genes & Development, 6:2352-2363.
- Kestler III HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD and Desrosiers RC. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. Cell, 65:651-662.
- Kidd S. (1992). Characterization of the Drosophila Cactus locus and analysis of interactions between Cactus and Dorsal proteins. Cell, 71:623-635.
- Kieran M, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le Bail O, Urban MB, Kourilsky P, Baeuerle PA and Israël A. (1990). The DNA binding subunit of NF-kB is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. Cell, 62:1007-1018.
- Kim S, Ikeuchi K, Byrn R, Groopman J and Baltimore D. (1989). Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9544-9548.
- Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC and Chermann JC. (1984a). Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer T-lymphocytes. Science, 225:59-62.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman J and Montagnier L. (1984b). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. Nature, 312:767-768.
- Klimkait T, Strebel K, Hoggan MP, Martin MA and Oreinstein JM. (1990). The human immunodeficiency virus type 1 specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. J.Virol., 64:621-629.

Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM and Sigal IS. (1988). **Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4686-4690.

Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, Dayton A, Rosen C, Haseltine W and Sodroski J. (1987). **Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.** Science, 237:1351-1355.

Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T and Capon DJ. (1987). **Delineation of a region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor.** Cell, 50:975-985.

LeClair KP, Blonar MA and Sharp PA. (1992). **The p50 subunit of NF- κ B associates with the NF-IL6 transcription factor.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:8145-8149.

Lee TH, Coligan JE, Allan JS, McLane MF, Groopman JE and Essex M. (1986). **A new HTLV III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses.** Science, 231:1546-1549.

Leis J, Baltimore D, Bishop JM, Coffin J, Fleissner E, Goff SP, Oroszlan S, Robinson H, Skalka AM, Temin HM and Vogt V. (1988). **Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses.** J. Virol., 62:1808-1809.

Lenardo MJ and Baltimore D. (1989). **NF- κ B: A pleiotropic Mediator of inducible and tissue-specific gene control.** Cell, 58:227-229.

Leonard R, Zagury D, Desportes I, Bernard J, Zagury JF and Gallo RC. (1988). **Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3570-3574.

Leonard J, Parrott C, Buckler-White AJ, Turner W, Ross EK, Martin MA and Rabson AB. (1989). **The NF- κ B Binding Sites in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat Are Not Required for Virus Infectivity.** Journal of Virology, 63:4919-4924.

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM and Oshino LM. (1984). **Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San-Francisco patients with AIDS.** Science, 225:840-842.

Lewin B. (1990). **Commitment and activation at Pol II promoters. A tail of protein-protein interactions.** Cell, 61:1161-1164.

Li C, Chingfeng L, Sigman D and Gaynor RB. (1991). **Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7739-7743.

Lighfoote MM, Coligan JE, Folks TM, Fauci AS, Martin MA and Venkatesan S. (1986). **Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus.** J. Virol., 60:771-775.

Link E, Derr LD, Shreck R, Zabel U, Verma I and Bauerle PA. (1992). **Purified I κ B- β is inactivated upon dephosphorylation.** J. Biol. Chem., 267:239-246.

Liou H, Nolan GP, Ghosh S, Fujita T and Baltimore D. (1992). **The NF- κ B p50 precursor, p105, contains an internal I κ B-like inhibitor that preferentially inhibits p50.** EMBO J., 11:3003-3009.

- Liu J, Perkins ND, Schmid RM and Nabel GJ. (1992). Specific NF- κ B Subunits Act in Concert with Tat To Stimulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. Journal of Virology, 66:3883-3887.
- Loeb DD, Hutchison III CA, Edgell MH, Farmerie WG and Swanström R. (1989). Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. J. Virol., 63:111-121.
- Luciw PA, Cheng-Mayer C and Levy JA. (1987). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: The orf-B region down-regulates virus replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1434-1438.
- Malim MH, Hauber J, Le S, Maizer JV and Cullen BR. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature, 338:254-257.
- Mann DA and Frankel AD. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. EMBO J., 10:1733-1739.
- Marciniak RA, Calnan BJ, Frankel AD and Sharp PA. (1990). HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. Cell, 63:791-802.
- Mathias S, Younes A, Kan C, Orlov IJ and Kolesnick RN. (1993). Activation of the sphingomyelin signalling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 β . Science 259:519-522.
- Matsuda Z, Chou M, Matsuda M, Huang J, Chen YM, Redfield R, Mayer K, Essex M and Lee TH. (1988). Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6968-6972.
- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR and Weissman IL. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of Human Immunodeficiency Virus. Cell, 53:55-67.
- McDougal JS, Kennedy MS, Slich JM, Cort SP, Mawle A and Nicholson JKA. (1986). Binding of HTLV III/LAV to T4+ cells by a complex of the 110 k protein with the T4 molecule. Science, 231:382-385.
- Meisterernst M and Roeder RG. (1991). Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. Cell, 67:557-567.
- Mitchell PJ and Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science, 245:371-378.
- Moore JP, McKeating JA, Norton WA and Sattentau QJ. (1991). Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. J. Virol., 65:1133-1140.
- Moore PA, Ruben SM and Rosen CA. (1993). Conservation of Transcriptional Activation Functions of the NF- κ B p50 and p65 Subunits in Mammalian Cells and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 13:1666-1674.
- Moses AV, Ibañez C, Gaynor R, Ghazal P and Nelson JA. (1994). Differential Role of Long Terminal Repeat Control Elements for the Regulation of Basal and Tat-Mediated Transcription of the

Human Immunodeficiency Virus in Stimulated and Unstimulated Primary Human Macrophages. *Journal of Virology*, 68:298-307.

Muesing MA, Smith DM, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA and Capon DJ. (1985). **Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retroviruses.** *Nature*, 313:450-458.

Nabel G and Baltimore D. (1987). **An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells.** *Nature*, 326:711-713.

Nakayama K, Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S and Yamamoto K. (1992). **A lymphoid cell-specific nuclear factor containing c-Rel-like proteins preferentially interacts with Interleukin-6 kB-related motifs whose activities are repressed in lymphoid cells.** *Mol. Cell. Biol.*, 12:1736-1746.

Neri A, Chang C, Lombardi L, Salina M, Corradini P, Maiolo AT, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1991). **B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kB p50.** *Cell*, 67:1075-1087.

Neumann M, Tesapos T, Scheppeler JA, Ross J and Franza BR. (1992). **Identification of complex formation between two intracellular tyrosin kinase substrates: human c-rel and the p105 precursor of p50 NF-kB.** *Oncogene*, 7:2095-2104.

Nolan GP, Ghosh S, Liou H, Tempst P and Baltimore D. (1991). **DNA Binding and I κ B Inhibition of the Cloned p65 Subunit of NF-kB, a rel-Related Polypeptide.** *Cell*, 64:961-969.

Nolan GP and Baltimore D. (1992). **The inhibitory ankyrin and activator rel proteins.** *Curr. Opin. Gen. Dev.* 2:211-220.

Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou H, Scott ML and Baltimore D. (1993). **The *bcl-3* proto-oncogene encodes a nuclear I κ B-like molecule that preferentially interacts with NF-kB p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner.** *Mol. Cell. Biol.*, 13:3557-3566.

Nusse R y Varmus HE. (1982). **Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome.** *Cell*, 31:99-109.

O'Brien WA, Koyanagi Y, Namazic A, Zhao J, Diagne, Idler K, Zack JA and Chen ISY. (1990). **HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain.** *Nature*, 348:69-73.

Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Ishimoto A and Adachi A. (1989). **Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame.** *J. Virol.*, 63:4110-4114.

Ohno Hm Takimoto G and McKeithan TW. (1990). **The candidate proto-oncogene *Bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell-cycle control.** *Cell*, 60:991-997.

Olsen HS and Rosen CA. (1992). **Contribution of the TATA motif to Tat-mediated transcriptional activation of Human Immunodeficiency Virus gene expression.** *Journal of Virology*, 66:5594-5597.

Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W and Sodroski J. (1990). **Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding.** *J. Virol.*, 64:5701-5707.

- Orchard K, Perkins N and Chapman C. (1990). A novel T-cell protein which recognize a palindromic sequence in the negative regulatory element of the Human Immunodeficiency Virus Long Terminal Repeat. J.Virol., 64:3234-3239.
- Osborn L, Kunkel S and Nabel GJ. (1989). Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2336-2340.
- Panganiban AT and Fiore D. (1988). Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcriptase. Science, 241:1064-1069.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP and Fauci AS. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature, 362:355-358.
- Paya CV, Ten RM, Bessia C, Alcamí J, Hay RT and Virelizier JL. (1992). NF- κ B-dependent induction of the NF- κ B p50 subunit gene promoter underlies self-perpetuation of human immunodeficiency virus transcription in monocytic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7826-7830.
- Perez LG, O'Donnell MA and Stephens EB. (1992). The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor-binding glycoprotein. J. Virol., 66:4134-4143.
- Perkins A, Cochrane A, Rubbens S and Rosen CA. (1989). Structural and functional characterization of the human immunodeficiency rev protein. J. AIDS, 2:256-263.
- Perkins ND, Schmid RM, Duckett CD, Leung K, Rice NR and Nabel GJ. (1992). Distinct combinations of NF- κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1529-1533.
- Perno C, Baseler MW, Broder S and Yarchoan R. (1990). Infection of monocytes by human immunodeficiency virus type 1 blocked by inhibitors of CD4-gp120 binding, even in the presence of enhancing antibodies. J. Exp. Med., 171:1043-1056.
- Peterlin BM, Luciw PA, Barr PJ and Walker MD. (1986). Elevated levels of mRNA can account for the trans-acting of the human immunodeficiency virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9734-9738.
- Piot P, Quinn TC, Taelman H, Feinsod FM, Milangu KB, Wobin O, Mbendi N, Mazebo P, Ndangui K and Stevens W. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. Lancet, ii:65-69.
- Piot P, Plummer FA, Mhalu FS, Lamboray J, Chin J and Mann JM. (1988). AIDS: an international perspective. Science, 239:573-579.
- Pognonek P and Roeder RG. (1991). Recombinant 43KD-USF binds to DNA and activates transcription in a manner indistinguishable from that of natural 43/44 kD USF. Mol. Cell. Biol., 11:5125-5136.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E and Gallo RC. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science, 234:497-500.

- Popovic M and Gartner S. (1987). Isolation of HIV-1 from monocytes but not T lymphocytes. Lancet, ii:916
- Ptashne M. (1988). How transcriptional activators work. Nature, 335:683-689.
- Pugh BF and Tjian R. (1992). Diverse transcriptional function of the multisubunit eukaryotic TFIIID complexes. J.Biol.Chem., 267:679-682.
- Quinn TC, Mann JM, Curran JW and Piot P. (1986). AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm. Science, 224:497-500.
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, Ivanoff L, Petteway SR, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Ghrayeb J, Chang NT, Gallo RC and Wong-Staal F. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature, 313:277-284.
- Ratner L, Starcich B, Josephs SF, Hahn BH, Reddy EP, Livak KJ, Petteway SR, Pearson ML, Haseltine WA, Arya SK and Wong-Staal F. (1985). Polymorphism of the 3' open reading frame of the virus associated with the acquired immune deficiency syndrome, human T-lymphotropic virus type III. Nucleic Acids Res., 13:8219-8229.
- Rice AP and Mathews MB. (1988). Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the tat gene product. Nature, 322:551-555.
- Rice NR, Mackichan ML and Israël A. (1992). The Precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions. Cell, 71:243-253.
- Richardson NE, Brown NR, Hussey RE, Vaid A, Matthews TJ, Bolognesi DP and Reinherz EL. (1988). Binding site for human immunodeficiency virus coat protein gp120 is located in the NH₂-terminal region of T4 (CD4) and requires the intact variable-region-like domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6102-6106.
- Rosen C, Sodroski JG and Haseltine WA. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in the HTLV III/LAV LTR. Cell, 41:813-823.
- Rosen C, Sodroski JG, Goh W, Dayton A, Lippe J and Haseltine WA. (1986). Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-cell lymphotropic virus type III. Nature, 319:555-559.
- Rosen C, Terwilliger E, Dayton A, Sodroski JG and Haseltine WA. (1988). Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2071-2075.
- Roy S, Delling U and Chen CH. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated transactivation. Genes Dev., 4:1365-1373.
- Rushow CA, Han K, Manley J and Levinif M. (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. Cell, 59:1165-1177.
- Ryseck R, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P and Bravo R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- κ B. Mol. Cell. Biol., 12:674-684.

Saksela K, Muchmore E, Girard M, Fultz P and Baltimore D. (1993). **High Viral Load in Lymph Nodes and Latent Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Peripheral Blood Cells of HIV-1-Infected Chimpanzees.** Journal of Virology, 67:7423-7427.

Sanchez-Pescador R, Power MD, Barr PJ, Steimer KS, Stempien MM, Brown-Shimer SL, Gee WW, Renard A, Randolph A and Levy JA. (1985). **Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2).** Science, 227:484-492.

Sattentau QJ, Dalgleish AG, Weiss RA and Beverley PCL. (1986). **Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection.** Science, 234:1120-1123.

Sattentau QJ and Weiss RA. (1988). **The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor.** Cell, 52:631-633.

Schmid RM, Perkins ND, Duckett CS, Andrews PC and Nabel GJ. (1991). **Cloning of an NF- κ B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65.** Nature, 352:733-736.

Schmitz ML and Baeuerle PA. (1991). **The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B.** EMBO J, 10:3805-3817.

Schmitz ML, Henkel T and Baeuerle PA. (1991). **Proteins controlling the nuclear uptake of NF- κ B, Rel and dorsal.** Trends in Cell Biology, 1:130-137.

Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M and Fauci AS. (1990). **Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: Evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6058-6062.

Schutze S, Totthoff K, Matchleidt T, Berkovic D, Wiegmann K and Kronke M. (1992). **A novel complex between the p65 subunit of NF- κ B and c-rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene.** Cell, 71:765-776.

Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyö E and Pavlakis GN. (1990). **Cloning and Functional Analysis of Multiply Spliced mRNA Species of Human Immunodeficiency Virus Type 1.** Journal of Virology, 64:2519-2529.

Schwartz O, Virelizier JL, Montagnier L and Hazan U. (1990). **A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity.** Gene, 88:197-205.

Selby MJ, Brain EJ, Luciw P and Peterlin BM. (1989). **Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat.** Genes Dev, 3:547-558.

Sen R and Baltimore D. (1986). **Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism.** Cell, 47:921-928.

Sharp PA and Marciniak RA. (1989). **HIV tar: An RNA enhancer?** Cell, 59:229-230.

Sheline CT, Milocco LH and Jones KA. (1991). **Do distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the HIV-1 Tar RNA hairpin.** Genes Dev, 5:2508-2520.

Shirakawa F and Mizel SB. (1989). **In Vitro Activation and Nuclear Translocation of NF-kB Catalyzed by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C.** *Mol. Cell. Biol.*, 9:2424-2430.

Smith MR and Greene WC. (1989). **The same 50kD cellular proteins binds to the negative regulatory elements of the interleukin-2 receptor α -chain gene and the Human Immunodeficiency Virus type 1 Long Terminal Repeat.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 86:8526-8530.

Sodroski JG, Patarca R, Rosen CA, Wong-Staal F and Haseltine WA. (1985). **Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III.** *Science*, 229:74-77.

Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E and Haseltine W. (1986a). **A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication.** *Nature*, 321:412-417.

Sodroski JG, Goh WC, Rosen CA, Tartar A, Portetelle D, Burny A and Haseltine WA. (1986b). **Replicative and cytopathic potential of HTLV III/LAV with sor gene deletions.** *Science*, 231:1549-1553.

Southgate CD and Green MR. (1991). **The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function.** *Genes Dev.*, 5:2496-2507.

Steffen D. (1984). **Provirus are adjacent to c-myc in some murine leukemia virus-induced lymphomas.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 81:2097-2101.

Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG and Engleman EG. (1987). **pH independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane.** *Cell*, 49:659-668.

Stein B, Baldwin AS, Ballard DW, Greene WC, Angel P and Herrlich P. (1993). **Cross-coupling of the NF-kB p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function.** *EMBO J.*, 12:3879-3891.

Strebel K, Daugherty D, Clause K, Cohen D, Folks T and Martin MA. (1987). **The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity.** *Nature*. 328:728730.

Strebel K, Klimbait T and Martin MA. (1988). **A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 kilodalton product.** *Science*, 241:1221-1223.

Takeya T y Anafusa H. (1983). **Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus.** *Cell*, 32:881-890.

Tan T, Huang GP, Sica A, Chosh P, Young HA, Longo DL and Rice NR. (1992). **kB-site dependent activation of the interleukin-2 receptor alpha chain gene promoter by human c-rel.** *Mol.Cell.Biol.*, 12:4067-4075.

Taylor JP, Pomerantz R, Bagasra O, Chowdhury M, Rappaport J, Khalili K and Amini S. (1992). **TAR-independent transactivation by Tat in cells derived from the CNS: a novel mechanism of HIV-1 gene regulation.** *EMBO J.*, 11:3395-3403.

Teich N. (1984) **Taxonomy of retroviruses.** in *Molecular Biology of Tumor viruses: RNA tumor viruses*, R.Weiss y cols. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Temin EM and Mizutani S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature, 226:1211-1213.
- Terwilliger E, Sodroski JG, Rosen CA and Haseltine WA. (1986). Effects of mutation within the 3'orf open reading frame region of the human T-cell lymphotropic type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. J. Virol., 60:754-760.
- Terwilliger EF, Cohen EA, Lu Y, Sodroski JG and Haseltine WA. (1989). Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5163-5167.
- Tesmer VM, Rajadhyaksha A, Babin J and Bina M. (1993). NF-IL6-mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7298-7302.
- Thanos D and Maniatis T. (1992). The High Mobility Group Protein HMG I(Y) Is Required for NF-KB-Dependent Virus Induction of the Human IFN-B Gene. Cell, 71:777-789.
- Tong-Starksen SE, Luciw PA and Peterlin BM. (1989). Signalling through T-lymphocytes surface proteins TcR-CD3 and CD28 activates the HIV-1 Long Terminal Repeat. J. Immunol., 142:707-715.
- Varmus HE. (1988). Retroviruses. Science, 240:1427-1435.
- Vaishnav Y and Wong-Staal F. (1992). The biochemistry of AIDS. Annu. Rev. Biochem., 60:578-630.
- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S and Alizon M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. Cell, 40:9-17.
- Watermann ML and Jones KA. (1990). Purification of TCF-1 α , a T-cell specific transcription factor that activates the T-cell receptor gene enhancer in a context-dependent manner. The New Biologist, 2:621-636.
- Watermann ML, Fischer WH and Jones KA. (1991). A thymus specific member of the HMG protein family regulates the human T-cell receptor enhancer. Genes Dev., 5:656-669.
- Wong-Staal F, Chanda P and Chrayeb J. (1987). Human immunodeficiency virus: the eighth gene. AIDS Res., 3:33-39.
- Wu FK, García JA and Harrich D. (1988). Purification of the Human Immunodeficiency Virus type 1 enhancer and TAR-binding proteins EBP-1 and UBP-1. EMBO J., 7:2117-2130.
- Wu FK, García JA and Sigman D. (1991). Tat regulates binding of the Human Immunodeficiency Virus transactivating region RNA-loop binding protein TRP-185. Genes Dev., 5:2128-2140.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A and Chen ISY. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analyses reveals a labile, latent viral structure. Cell, 61:213-222.
- Zack JA, Haislip AM, Krogstad P and Chen ISY. (1992). Incompletely reverse-transcribed Human Immunodeficiency Virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. J. Virol., 66:1717-1725.