



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Capacidad de unión al ARN genómico viral de  
mutantes de la proteína nucleocápside del virus  
de inmunodeficiencia de felinos**

**Nº 174**

**María Luisa Raudí**

**Tutores: José L. Affranchino - Silvia A. González**

Departamento de Investigación  
Junio 2005



## Agradecimientos

Al Dr. José L. Affranchino y a la Dra. Silvia A. González por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

A Mariana Manrique, Julieta Manrique y Cecilia Celma por toda su ayuda.

A mi familia.



## Indice

Resumen .....	7
Abreviaturas .....	7
I. – Familia Retroviridae .....	8
I.1 – Organización genómica .....	8
I.2 – Ciclo de replicación .....	9
II. – Lentivirus .....	11
II.1 – Clasificación .....	11
II.2 – Organización genómica .....	11
II.3 – Estructura del virión .....	11
II.4 – El dominio matriz (MA) de Gag .....	13
II.5 – El dominio cápside (CA) de Gag .....	13
II.6 – El dominio nucleocápside (NC) de Gag .....	13
III. – Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) .....	13
I. – Amplificación de la región codificante para la proteína NC de FIV y clonado en el vector pGEX-2T .....	14
II. – Mutagénesis dirigida de la región codificante para la proteína NC de FIV .....	15
III. – Clonado de los productos de la mutagénesis dirigida en el vector pGEX-2T .....	17
IV. – Transformación de bacterias Escherichia coli competentes .....	17
V. – Purificación del ADN plasmídico .....	17
VI. – Secuenciación por el método de Sanger .....	17
VII. – Expresión de las proteínas NC de FIV en bacterias .....	18
VIII. – Electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas denitrocelulosa .....	18
IX. – Amplificación y clonado de la región 5' del genoma de FIV .....	18
X. – Transcripción in vitro .....	19
XI. – Northwestern Blot .....	19
I. – Mutagénesis dirigida de la NC de FIV .....	19
II. – Identificación de clones recombinantes .....	21
III. – Secuenciación de los genes NC mutados .....	22
IV. – Análisis de la expresión en E. coli de las proteínas NC mutantes .....	24
V. – Efecto de las mutaciones K15G, P17A, P17E, L20S y K15G/P17E/L20S sobre la unión de la NC al ARN genómico viral de FIV .....	24
Bibliografía .....	27



El virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV), perteneciente al género lentivirus de la familia *Retroviridae*, induce en felinos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA de humanos. Esta propiedad de FIV hace que el sistema FIV–gato doméstico sea un buen modelo para el estudio de la patogénesis del virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV) y para el desarrollo de vacunas y de terapias antivirales.

La proteína nucleocápside (NC) de los lentivirus, originada por el procesamiento del precursor Gag, contiene dos copias del motivo aminoacídico denominado «dedo de zinc» o motivo Cis–His, que median la incorporación del ARN genómico viral a los viriones. Además, la proteína NC interviene en la transcripción reversa del genoma retroviral y en el ensamblado de las partículas virales.

Dado que la proteína NC es reconocida como un blanco potencial para intervenciones terapéuticas, y que se desconocía el rol de esta proteína en el ciclo de vida de los lentivirus de animales no primates, nuestro laboratorio comenzó con la identificación y caracterización de los dominios funcionales de la NC de FIV. Hemos demostrado que el motivo «dedo de zinc» amino terminal es más importante, tanto para el ensamblado de viriones como para el empaquetamiento del ARN genómico, que el motivo «dedo de zinc» carboxilo terminal (Manrique *et al.*, 2004). Dada la relevancia del motivo «dedo de zinc» amino terminal de la NC de FIV en el ciclo viral, se propuso en este trabajo de tesis profundizar el estudio de este motivo aminoacídico; en particular, investigar la participación en la unión al ARN genómico viral de los aminoácidos que son específicos de la NC de FIV y que no son compartidos por los motivos «dedo de zinc» de la NC de lentivirus de primates.

Para ello, se sustituyeron los aminoácidos en las posiciones 15, 17 y 20 de la NC de FIV por aquéllos presentes en el «dedo de zinc» de la NC del virus de inmunodeficiencia de simios (SIV). Los genes mutados de la NC de FIV se expresaron como proteínas de fusión con la glutatión-S-transferasa, las cuales fueron luego utilizadas en ensayos de Northwestern para estudiar el efecto de las mutaciones introducidas en la NC de FIV sobre su capacidad de unir al ARN genómico.

Las mutaciones P17E, L20S y la triple sustitución K15G/P17E/L20S inhibieron significativamente la capacidad de unión de la NC al ARN genómico de FIV en comparación con la actividad exhibida por la proteína NC salvaje. Estos resultados sugieren que los aminoácidos específicos del motivo «dedo de zinc» amino terminal de la NC de FIV son necesarios para la función de la proteína en el empaquetamiento del ARN genómico viral y que no pueden ser reemplazados por los aminoácidos presentes en la NC de un lentivirus relacionado como SIV.

## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BIV: virus de inmunodeficiencia de bovinos

CA: proteína cápside

Cis–His: motivo aminoacídico cisteína–X<sub>2</sub>–cisteína–X<sub>4</sub>–histidina–X<sub>4</sub>–cisteína

DTT: ditioneitol

E: señal de encapsidación

EDTA: ácido etiléndiaminotetraacético

EIAV: virus de la anemia infecciosa equina

Env: glicoproteína viral de envoltura

*et al.*: y colaboradores

FIV: virus de inmunodeficiencia de felinos

GST: glutatión–S–transferasa

HIV: virus de inmunodeficiencia de humanos

IN: proteína integrasa

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

LB: Luria–Bertani

LTR: repetición terminal larga

MA: proteína matriz

NC: proteína nucleocápside

nt: nucleótido

NW: northwestern

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
 PR: proteasa  
 SD: sitio donador de «splicing»  
 SDS: dodecil sulfato de sodio  
 SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
 SIV: virus de inmunodeficiencia de simios  
 SU: subunidad de superficie de la proteína Env  
 TM: subunidad transmembrana de la proteína Env  
 TR: transcriptasa reversa  
 5' UTR: región 5' no traducida

## I. – Familia *Retroviridae*

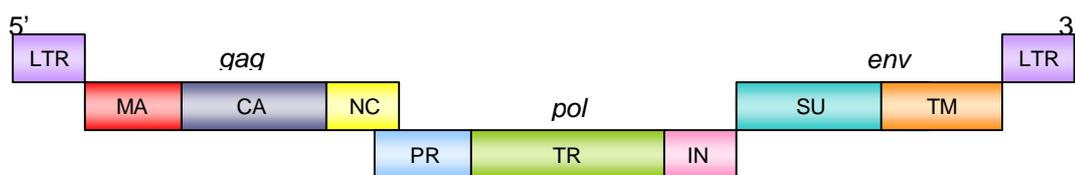
La familia *Retroviridae* comprende a un grupo de virus con envoltura lipídica, la cual deriva de la membrana plasmática de la célula infectada, y con un genoma compuesto por dos moléculas de ARN simple cadena de polaridad positiva (Coffin, 1996).

Esta familia de virus se distingue del resto por exhibir una estrategia replicativa que incluye la transcripción reversa del genoma de ARN a ADN doble cadena y la posterior integración de este ADN al genoma de la célula hospedadora. Al genoma viral integrado se lo denomina provirus.

### I.1 – Organización genómica

Todos los retrovirus poseen tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. Estos genes se organizan en el genoma viral invariablemente en el orden que se muestra en la figura 1.

LTR  
 MA  
 CA  
 NC  
 PR  
 TR  
 IN  
 SU  
 TM  
 LTR  
 gag  
 pol  
 env



**Figura 1:** Organización genómica de los retrovirus. Las repeticiones terminales largas (LTR) contienen secuencias que regulan la transcripción del genoma viral. El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales del virión: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). El gen *pol* codifica para las enzimas virales: proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN). El gen *env* codifica para la glicoproteína viral de envoltura, que está formada por las subunidades de superficie (SU) y transmembrana (TM). Adaptado de Coffin (1996).

En los extremos del ADN proviral se encuentran las repeticiones terminales largas (LTR), secuencias repetidas e idénticas que se forman durante el proceso de transcripción reversa (Figura 1). Las LTR poseen tres elementos: U3, R y U5. El sitio de iniciación de la transcripción se localiza entre las secuencias U3 y R en la LTR 5', mientras que el sitio de poliadenilación está ubicado entre los elementos R y U5 en la LTR 3'. El elemento U3 posee la mayoría de las secuencias reguladoras de la transcripción que incluyen un promotor y secuencias «enhancer», o moduladoras del nivel de transcripción, que responden a proteínas transactivadoras celulares y virales (Coffin, 1996).

El gen *gag* codifica para el precursor poliproteico Gag que origina, a través del clivaje proteolítico por la PR viral, las proteínas maduras del virión: MA, CA y NC (Coffin, 1996). En algunos retrovirus, el clivaje genera productos adicionales en la forma de péptidos de bajo peso molecular.

El precursor Gag se sintetiza en los polirribosomas libres del citoplasma de la célula hospedadora y luego es transportado a la membrana celular a través de un mecanismo que aún no ha sido dilucidado (Göttlinger, 2001). Una vez en la membrana, Gag dirige el ensamblado de las partículas virales. La importancia de la poliproteína Gag en este proceso queda demostrada por el hecho de que la expresión de Gag de distintos retrovirus, en ausencia de otras proteínas virales, es suficiente para dirigir la formación y brotación de partículas pseudovirales (Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Manrique *et al.*, 2001).

La región *pol* se transcribe generalmente como un mensajero único junto con *gag*. El precursor poliproteico generado a partir del mensajero *gag-pol* es procesado en una etapa tardía del ensamblado generando las enzimas PR, TR e IN. La PR es la responsable del clivaje de los precursores Gag y Gag-Pol. Este procesamiento hace que las partículas retrovirales adquieran la morfología madura que caracteriza a cada género retroviral y la capacidad de infectar nuevas células (Göttlinger *et al.*, 1989; Kohl *et al.*, 1988).

Las enzimas TR e IN intervienen en las primeras etapas de la infección. La TR sintetiza el ADN copia (ADNc) a partir del ARN genómico viral y la IN media la integración del ADNc al genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1996).

El gen *env* codifica para la glicoproteína viral de envoltura (Env). A diferencia de lo que ocurre con Gag y Gag-Pol, Env es sintetizada a nivel de retículo endoplasmático donde se ancla a la membrana del mismo a través de un segmento hidrofóbico cercano al extremo carboxilo (Hunter & Swanstrom, 1990). Durante el tránsito a través del aparato de Golgi, Env es glicosilada y luego clivada por una proteasa celular en las subunidades SU y TM (Hunter & Swanstrom, 1990). La subunidad SU se une a receptores celulares específicos, determinando el tropismo del virus, mientras que la TM media la fusión de la membrana viral con la celular, permitiendo así el ingreso del virus a la célula (Coffin *et al.*, 1997).

## 1.2 – Ciclo de replicación

El ciclo replicativo de los retrovirus (Figura 2) se inicia con la unión de la subunidad SU de Env a un receptor específico presente en la superficie de la célula blanco. Esta interacción promueve cambios en la conformación de Env que activan el potencial fusogénico de la subunidad TM. Un segmento hidrofóbico del extremo amino de la subunidad TM, así como su porción transmembrana, intervendrían en la fusión de las membranas viral y celular, proceso que permite la entrada del «core» viral al citoplasma de la célula (Coffin *et al.*, 1997).

El proceso de transcripción reversa se activa con la entrada de la partícula viral al citoplasma de la célula blanco. Las dos cadenas de ARN genómico de polaridad positiva se encuentran en el citoplasma celular como parte de un complejo ribonucleoproteico, similar al «core» de un virión extracelular, que contiene las enzimas TR e IN y productos maduros del precursor Gag que difieren según el retrovirus (Bowerman *et al.*, 1989). La síntesis del ADNc retroviral depende de las dos actividades enzimáticas de la TR: su actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN o ADN y su actividad de ribonucleasa H, que hidroliza cadenas de ARN cuando éstas se encuentran formando híbridos con ADN. Utilizando un ARN de transferencia celular como iniciador, la enzima TR genera primero una cadena de ADN de polaridad negativa utilizando como molde al ARN genómico viral. La actividad de ribonucleasa H de la TR digiere al ARN molde casi por completo dejando una pequeña región, denominada segmento polipurínico, la cual sirve de iniciadora en la síntesis de la cadena de ADN de polaridad positiva. El ADNc doble cadena lineal generado por el proceso de transcripción reversa es co-lineal al ARN genómico, pero a diferencia de éste, contiene dos duplicaciones terminales, las LTRs. Luego de terminada la síntesis, generalmente cuando el complejo ribonucleoproteico aún se encuentra en el citoplasma, la enzima viral IN elimina dos o tres bases de los extremos 3' del ADNc (Coffin *et al.*, 1997).

Los complejos ribonucleoproteicos conteniendo el ADNc ingresan al núcleo por medio de dos estrategias diferentes dependiendo del género retroviral. En la mayoría de los retrovirus, los complejos ribonucleoproteicos penetran al núcleo cuando se desintegra la membrana nuclear durante el proceso de división celular. En cambio, en el caso de los lentivirus, el ADNc ingresa a través de los poros presentes en la membrana del núcleo interfásico por un mecanismo de transporte que requiere energía (Bukrinsky *et al.*, 1993; Gulizia *et al.*, 1994; Heinzinger *et al.*, 1994; von Schwedler *et al.*, 1994).

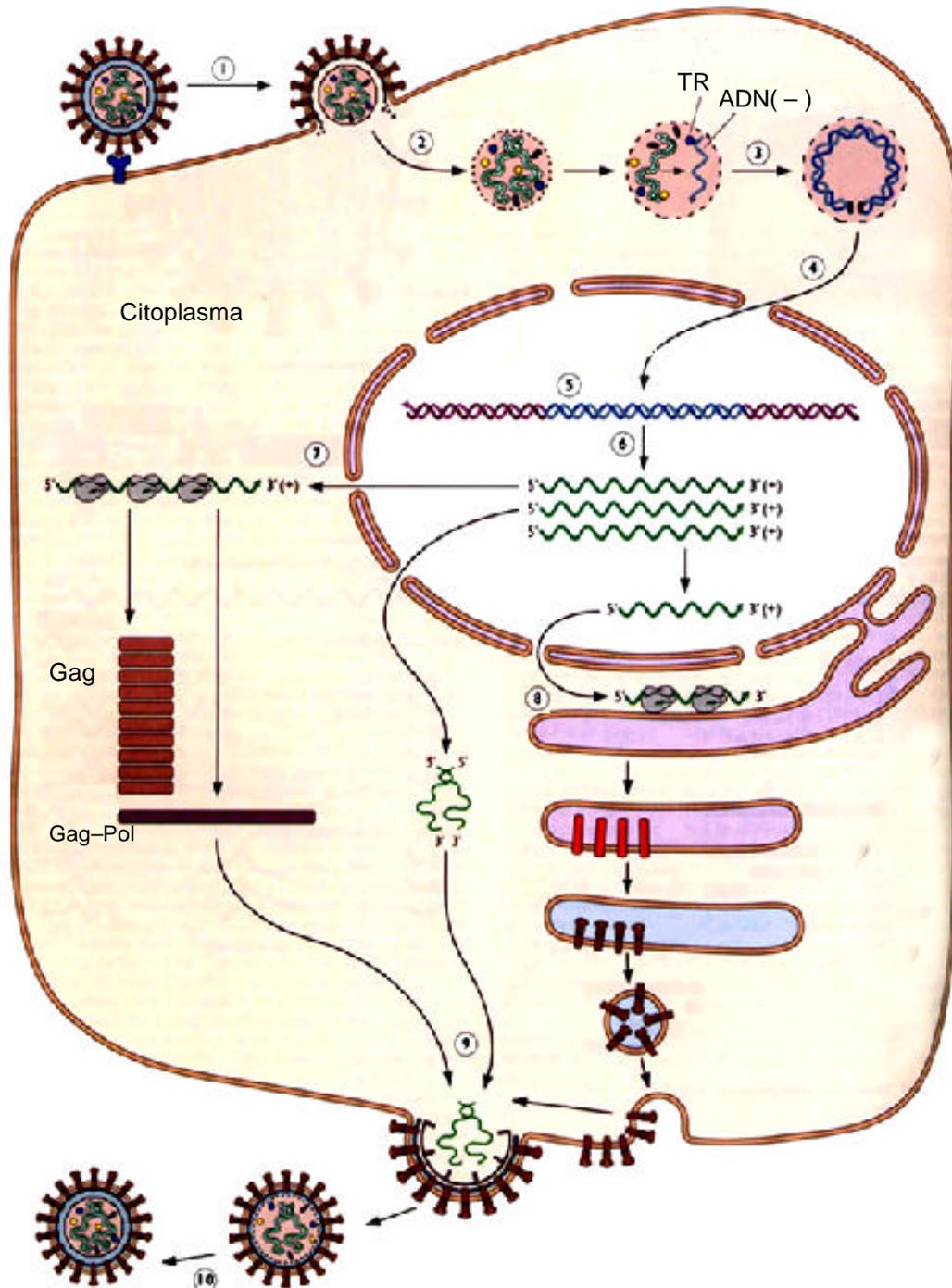
En el núcleo, la enzima viral IN cataliza la integración del ADNc proviral a regiones del ADN celular que se encuentran altamente empaquetadas, como las de los nucleosomas (Pryciak & Varmus, 1992). De esta forma, el ADNc retroviral queda integrado establemente al genoma de la célula formando el provirus.

La expresión del provirus se lleva a cabo a través de la maquinaria celular. La transcripción del ADN proviral genera un ARN mensajero (ARNm) de tamaño genómico a partir del cual se generan ARNm de tamaño subgenómico a través del empalme de exones («splicing»). Las moléculas de ARNm de tamaño tanto completo como subgenómico son traducidas a proteínas (Coffin *et al.*, 1997).

Las poliproteínas Gag y Gag-Pol se sintetizan a partir del ARNm de tamaño genómico; sin embargo, se

hallan en diferentes marcos de lectura. Para generar Gag-Pol, la lectura del ribosoma experimenta un corrimiento de  $-1$  en el marco de lectura de *gag* que lo ubica en el marco de *pol*. El cambio de marco de lectura ocurre cada 10 a 20 eventos de traducción, regulándose así las cantidades relativas de los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol sintetizados (Jacks *et al.*, 1988).

En las últimas etapas del ciclo de replicación, los precursores Gag y Gag-Pol se ensamblan en partículas virales las cuales incorporan al ARN genómico viral y a la glicoproteína Env. Estas partículas son liberadas al medio extracelular por brotación a través de la membrana plasmática (Coffin *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Ciclo de replicación de los retrovirus. Luego de la unión del retrovirus a su receptor en la superficie celular (1), las membranas viral y celular se fusionan, permitiendo así la entrada del «core» viral al citoplasma de la célula (2). La TR viral sintetiza el ADNc (3) que ingresa al núcleo (4) para luego integrarse al genoma celular mediante la acción de la IN (5). La maquinaria transcripcional de la célula genera ARNm virales (6) que son traducidos a proteínas en el citoplasma (7). La proteína Env se sintetiza en el retículo endoplasmático para luego seguir la vía secretoria donde es glicosilada y clivada en las subunidades SU y TM (8). Las proteínas Gag y el genoma viral se ensamblan en partículas en la cara interna de la membrana plasmática (9). Las partículas brotan al medio extracelular para luego madurar como consecuencia del clivaje de Gag y Gag-Pol por la PR viral (10). Adaptado de Flint *et al.* (2000).

## II. – Lentivirus

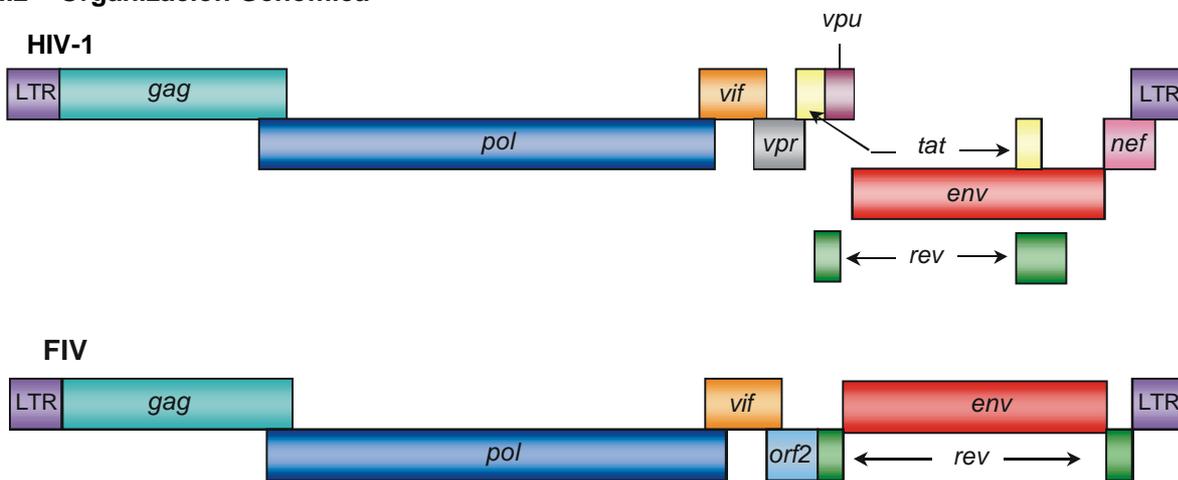
Los lentivirus, un género importante dentro de la familia *Retroviridae*, causan infecciones persistentes y enfermedades degenerativas crónicas. Este grupo de virus cobró importancia con el aislamiento en 1983 del virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV) y el descubrimiento de que se trataba del agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) de humanos.

### II.1 – Clasificación

En base al tropismo celular y a las manifestaciones clínicas de las enfermedades que producen, los lentivirus se pueden dividir en dos grupos (Clements & Wong-Staal, 1992):

- A. Virus que causan enfermedades específicas en distintos órganos mediadas por el sistema inmune. Estos virus infectan predominantemente monocitos y macrófagos y comprenden, entre otros, al virus maedi-visna y al virus de la artritis-encefalitis caprina.
- B. Virus que causan inmunodeficiencia. Este grupo incluye a los virus de primates (HIV-1, HIV-2 y al virus de inmunodeficiencia de simios, SIV), de felinos (FIV) y de bovinos (BIV). Estos virus infectan no sólo a las células de la línea monocitos/macrófagos, sino también a los linfocitos T. El síndrome de inmunodeficiencia es causado principalmente por la pérdida de linfocitos T CD4+.

### II.2 – Organización Genómica



**Figura 3:** Comparación de la organización genómica de HIV-1 y FIV. Se indican los tres genes principales *gag*, *pol* y *env* así como los genes auxiliares en cada genoma viral.

Los lentivirus se caracterizan por poseer en su genoma, además de los genes *gag*, *pol* y *env*, marcos abiertos de lectura adicionales. Estos marcos abiertos de lectura se encuentran entre los genes *pol* y *env* y en el extremo 3' de *env*, y codifican para proteínas auxiliares que regulan el ciclo viral y contribuyen a la patogénesis del virus (Clements & Wong-Staal, 1992).

De los genes auxiliares, caben destacar los que codifican para Tat y Rev. La proteína reguladora Tat estimula la transcripción del genoma viral, mientras que Rev facilita la exportación a citoplasma de ARNm virales de tamaño genómico (*gag-pol*) o con un único empalme de exones (ARNm de *env*) (Clements & Wong-Staal, 1992).

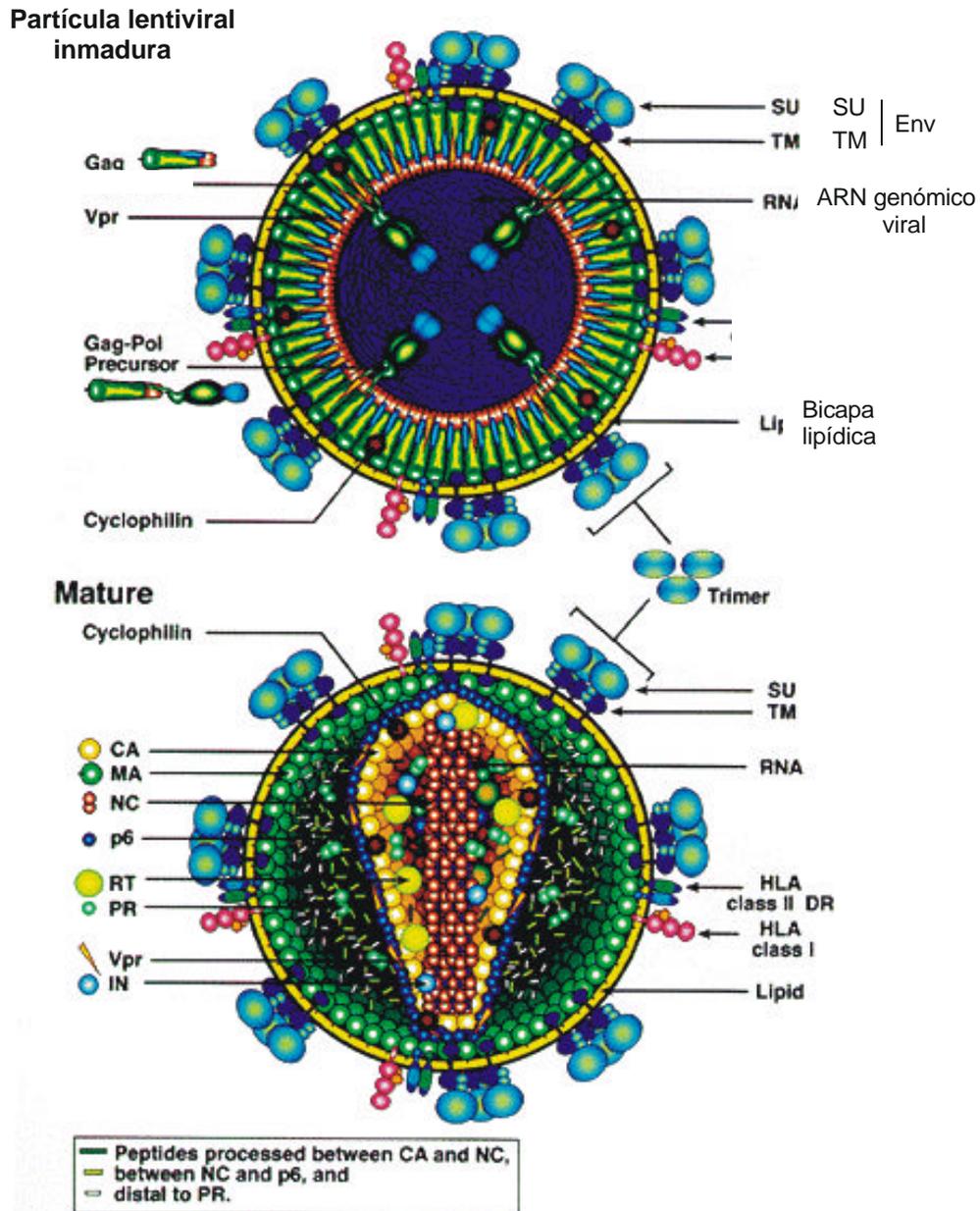
Las demás proteínas auxiliares Nef, Vif, Vpr, Vpu y Vpx se consideran accesorias, ya que no son necesarias para la replicación de los virus en ciertas líneas celulares linfocitarias. Sin embargo, sí son esenciales para la replicación del virus en el animal hospedador (Coffin *et al.*, 1997).

### II.3 – Estructura del virión

En los lentivirus, la acumulación de Gag en la membrana plasmática de la célula infectada lleva al ensamblado de viriones inmaduros que brotan de la superficie celular. Estas partículas virales inmaduras son estructuras esféricas que al ser visualizadas al microscopio electrónico presentan un centro translúcido. El procesamiento proteolítico de Gag por la PR viral durante o inmediatamente después de la brotación induce la maduración del virus, es decir, la reorganización interna de la estructura del virión (Wieggers *et al.*, 1998). Las partículas lentivirales maduras poseen un diámetro de aproximadamente 100 nm y exhiben un

como electródenso que corresponde al «core» viral, formado por las proteínas virales CA, NC y el genoma viral, que distingue a los lentivirus de los otros géneros de retrovirus (Figura 4).

El orden en que se presentan los dominios MA, CA y NC en el precursor poliproteico Gag coincide con la posición relativa que ocupan estas proteínas en la partícula lentiviral luego del clivaje por la PR viral (Hunter, 1994). En efecto, la cubierta proteica externa está formada por la proteína MA que recubre al «core» viral formado por la proteína CA que a su vez encierra al complejo NC-ARN genómico viral (Figura 4).



**Figura 4:** Partículas inmadura y madura de HIV-1 como ejemplo de partícula lentiviral. Se indican las proteínas Gag y Gag-Pol así como sus productos de clivaje. Los subunidades SU y TM de Env se hallan en la superficie de la partícula lentiviral. La ciclofilina es una proteína de la célula hospedadora que se incorpora exclusivamente a los viriones de HIV-1. En la partícula viral madura se puede ver el «core» característico de los lentivirus. Adaptado de Coffin *et al.* (1997).

#### II.4 – El dominio matriz (MA) de Gag

El dominio amino-terminal de la poliproteína Gag de los lentivirus es el que origina la proteína MA como consecuencia del clivaje por la PR viral. En la mayoría de los retrovirus, la poliproteína Gag es modificada cotraduccionalmente, a nivel de la glicina en posición 2, por la adición de ácido mirístico. Esto ocurre una vez que la metionina iniciadora es eliminada y el grupo amino del residuo glicina expuesto. Se ha demostrado que la adición de ácido mirístico a la poliproteína Gag de los lentivirus es esencial para el transporte de Gag a la membrana plasmática (Göttlinger *et al.*, 1989). Además de la modificación por miristilación, existe en el extremo amino de la MA una región rica en aminoácidos básicos que contribuye a la asociación de Gag con la membrana plasmática, estableciendo interacciones electrostáticas con los fosfolípidos ácidos de la cara citoplasmática de la membrana (González *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Estudios de nuestro laboratorio en SIV y de otros grupos en HIV-1 han demostrado que la MA cumple un rol fundamental en el ensamblado (Freed *et al.*, 1994; González *et al.*, 1993; González & Franchino, 1995) y en la incorporación de Env a viriones (Freed & Martin, 1995; González *et al.*, 1996; Manrique *et al.*, 2003; Murakami & Freed, 2000).

#### II.5 – El dominio cápside (CA) de Gag

La proteína CA es el principal componente, en la partícula viral madura, de la cubierta proteica que rodea al complejo ribonucleoproteico formado por el genoma viral y la proteína NC, que se visualiza por microscopía electrónica como un cono electrondenso. El conjunto de la cubierta proteica formada por la CA y el complejo ARN-NC se denomina «core» viral (Gelderblom, 1991).

En HIV-1, la proteína CA posee dos dominios funcionales: una región amino que interviene en la maduración del virión y en la incorporación de la proteína celular ciclofilina A, y una región carboxilo que interviene en las interacciones Gag-Gag necesarias para el ensamblado de partículas virales (Dorfman *et al.*, 1994; Mammano *et al.*, 1994). Se han presentado evidencias que sugieren que la CA mediaría también la interacción entre los precursores Gag y Gag-Pol (Srinivasakumar *et al.*, 1995).

#### II.6 – El dominio nucleocápside (NC) de Gag

La encapsidación selectiva del ARN genómico viral respecto de ARN celulares y de ARNm virales subgenómicos, es una etapa esencial en el ciclo de vida de los retrovirus. Este proceso requiere que la poliproteína Gag reconozca una secuencia específica en el ARN genómico viral llamada señal de encapsidación (E), que se localiza en el extremo 5' del genoma y se extiende en el gen *gag* (Jewell & Mansky, 2000). El dominio NC de Gag es el responsable de mediar la interacción entre el precursor Gag y el ARN genómico viral. Todas las proteínas NC de los retrovirus poseen un alto contenido de aminoácidos básicos y, con excepción de los virus espumosos, contienen una o dos copias de un motivo aminoacídico con la secuencia cisteína-X<sub>2</sub>-cisteína-X<sub>4</sub>-histidina-X<sub>4</sub>-cisteína (motivo Cis-His), capaz de unir al ión zinc. Este motivo es similar al denominado «dedo de zinc» que poseen muchas proteínas con capacidad de asociarse a ácidos nucleicos (Jewell & Mansky, 2000). Se ha demostrado que sustituciones aminoacídicas que afectan los residuos básicos así como los motivos Cis-His interfieren tanto con la capacidad de la NC de interactuar con el ARN genómico *in vitro* (Schmalzbauer *et al.*, 1996) como con la habilidad de Gag de empaquetar el ARN *in vivo* (Aldovini & Young, 1990; Dorfman *et al.*, 1993; Gorelick *et al.*, 1999).

Además de su rol en la encapsidación del genoma viral, la NC de los lentivirus intervendría en las interacciones Gag-Gag que conducen a la oligomerización de esta proteína y, en consecuencia, al ensamblado viral. En efecto, cuando se introducen sustituciones aminoacídicas en ambos motivos Cis-His de la NC de HIV-1 se inhibe significativamente la liberación de viriones al medio extracelular (Dorfman *et al.*, 1993). Un efecto inhibitorio similar sobre la formación de viriones extracelulares se observa al mutar tanto los residuos básicos presentes en el extremo amino de la NC de HIV-1 como aquéllos presentes entre ambos motivos Cis-His (Dawson & Yu, 1998; Sandefur *et al.*, 2000; Zhang & Barklis, 1997).

### III. – Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV)

FIV es un lentivirus que establece en sus hospedadores naturales (gato doméstico y felinos salvajes) una infección persistente de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. Esta infección desencadena una enfermedad inmunológica cuya progresión y sintomatología clínicas son similares a las asociadas al SIDA de humanos (Bendinelli *et al.*, 1995). FIV se asemeja a los lentivirus de primates HIV y SIV en otros aspectos tales como la morfología del virión, la organización y variabilidad genómicas, el ciclo de replicación, el potencial patogénico y la susceptibilidad a drogas antivirales (Bendinelli *et al.*, 1995).

Es por ello que el sistema FIV-gato doméstico se utiliza como modelo de las infecciones causadas por HIV en estudios de patogénesis, de desarrollo de terapias antivirales y vacunas (Bendinelli *et al.*, 1995).

Además, la incapacidad de FIV de producir enfermedad en humanos ha permitido utilizar al genoma de FIV como vector lentiviral en ensayos de terapia génica (Johnston & Power, 1999; Poeschla *et al.*, 1998). Cabe mencionar que los datos obtenidos sobre aspectos estructurales del genoma, como ser el número de genes y árboles filogenéticos basados en las secuencias de *gag* y *pol*, indican que FIV se halla en este sentido más emparentado con los lentivirus de animales no primates, como los virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), de la artritis encefalitis caprina y el maedi-visna, que a los lentivirus de primates HIV y SIV (Bendinelli *et al.*, 1995). Otra diferencia entre FIV y los lentivirus de primates la constituye el tipo de receptor celular utilizado por los virus para ingresar a la célula hospedadora. Los virus HIV y SIV utilizan como receptores al antígeno celular CD4 y a un miembro de la familia de las quimioquinas, como CXCR4 o CCR5 (Feng *et al.*, 1996). En cambio, FIV no utiliza al receptor CD4 en el proceso infeccioso (Norimine *et al.*, 1993), sino que utiliza a CXCR4 (Poeschla & Looney, 1998) y al receptor celular CD134 (Shimojima *et al.*, 2004).

Es interesante destacar que FIV, al igual que los lentivirus de animales no primates, posee una proteína con actividad de dUTPasa. El marco de lectura que codifica para esta enzima se encuentra en el gen *pol*, entre los marcos de lectura de la TR e IN (Figura 5). La enzima dUTPasa actúa disminuyendo la incorporación errónea de dUTP al ADN viral, lo que reduce el porcentaje de mutaciones y aumenta la estabilidad genética del virus (Elder *et al.*, 1992).



**Figura 5:** Marcos abiertos de lectura del gen *pol* de FIV. PR, proteasa; TR, transcriptasa reversa; DU, proteína con actividad dUTPasa; IN, integrasa.

Como se mencionó antes, FIV es un modelo adecuado para el estudio de las infecciones producidas por HIV-1 en humanos. FIV es además un patógeno importante de gatos domésticos en todo el mundo, por lo que su estudio es también relevante desde el punto de vista de la medicina veterinaria.

La proteína NC de FIV es un polipéptido de 84 aminoácidos y 9,1 KDa de peso molecular (Elder *et al.*, 1993) que posee dos motivos Cis-His o «dedos de zinc». Resultados de nuestro laboratorio demuestran que la sustitución de la primer cisteína por serina en el motivo Cis-His amino terminal de la NC interfiere tanto con la capacidad de unión de la NC al ARN genómico como con el ensamblado viral (Manrique *et al.*, 2004). En cambio, una mutación similar en el motivo Cis-His carboxilo terminal no afecta el ensamblado viral ni la interacción de la NC con el ARN genómico (Manrique *et al.*, 2004).

Dada la importancia del primer motivo Cis-His de la NC de FIV en la replicación viral, se propuso:

- Introducir sustituciones aminoacídicas adicionales en el «dedo de zinc» amino terminal de la NC de FIV.
- Estudiar el efecto de las mutaciones introducidas en la NC de FIV sobre su capacidad de unir al ARN genómico viral mediante ensayos de Northwestern.

### I. - Amplificación de la región codificante para la proteína NC de FIV y clonado en el vector pGEX-2T

La región codificante para la NC de FIV (aislamiento Petaluma) fue amplificada utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para luego ser clonada en el vector pGEX-2T (Amersham Biosciences) como hemos descrito recientemente (Manrique *et al.*, 2004).

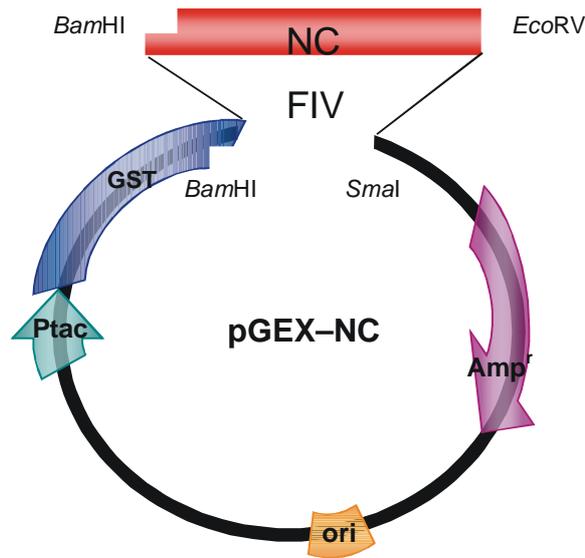
Para ello, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos iniciadores:

Iniciador 5': 5' AAA GGA TCC GTA GTG CAA TCA AAA GGA 3'  
BamHI

Iniciador 3': 5' TTG GAT ATC TAC CTA CTT TAT TAT AAT 3'  
EcoRV

El iniciador 5' hibrida con el extremo 5' de la NC de FIV (nucleótidos [nt] 1717-1743) y agrega un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Bam*HI. El iniciador 3' hibrida con el extremo 3' del gen de la NC (nt 2007-1981) y agrega un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Eco*RV, que deja extremos romos.

El producto de amplificación por PCR se digirió con las endonucleasas *Bam*HI y *Eco*RV y fue ligado al vector pGEX-2T digerido por las enzimas *Bam*HI y *Sma*I (Figura 6). De esta forma, el marco de lectura de la NC de FIV queda en fase con el de la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Así, el plásmido dirige la síntesis de la proteína de fusión GST-NC (FIV).



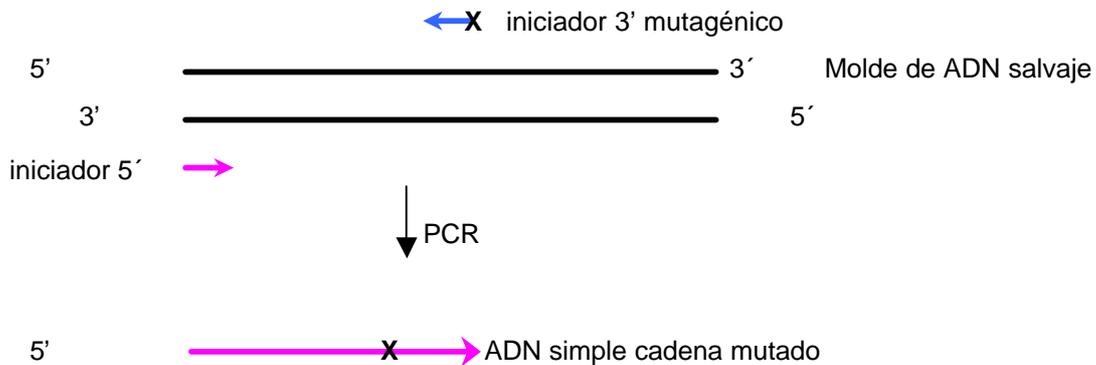
**Figura 6:** Esquema del clon del gen de la NC de FIV en el plásmido pGEX-2T. Se indican el origen de replicación del plásmido (ori), el gen de la β-lactamasa (Amp<sup>r</sup>), el promotor tac (Ptac), el gen de la glutatión-S-transferasa (GST) y el gen de la NC de FIV.

**II. - Mutagénesis dirigida de la región codificante para la proteína NC de FIV**

La mutagénesis dirigida de la NC de FIV se realizó utilizando el método de PCR asimétrica descrito por Perrin y Gilliland (1990) con algunas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio (González *et al.*, 1993). Como molde se utilizó el gen de la NC de FIV clonado en el vector pGEX-2T (Figura 6; Manrique *et al.*, 2004).

El método consta de dos etapas: en la primera etapa se utilizó un iniciador 5' que hibrida con la región 3' del gen de la GST presente en el plásmido pGEX-NC y un oligonucleótido iniciador 3' (antisentido) que lleva la mutación deseada. Como se utilizaron los iniciadores 5' y 3' en una relación molar 50:1, el producto final de esta reacción es una molécula de ADN simple cadena que lleva la mutación deseada.

Representación esquemática de la primera etapa de amplificación:



Los iniciadores para la primera etapa se detallan a continuación, destacándose en color los cambios nucleotídicos introducidos. Se indican además las substituciones aminoacídicas introducidas en la NC de FIV:

Iniciador 5': 5' GTA CTT GAA ATC CAG CAA GTA 3'  
nt 830-851 del plásmido pGEX-NC

**Iniciadores mutagénicos:**

Iniciador 3': 5' G TCC TGG TTT TCC ACA ATT AAA AC 3' Mutación: K15G  
nt 1780-1757 del genoma de FIV

Iniciador 3': 5' GC TAG ATG TCC GGC TTT TTT ACA A 3' Mutación: P17A  
nt 1787-1764 del genoma de FIV

Iniciador 3': 5' GC TAG ATG TCC TTC TTT TTT ACA A 3' Mutación: P17E  
nt 1787-1764 del genoma de FIV

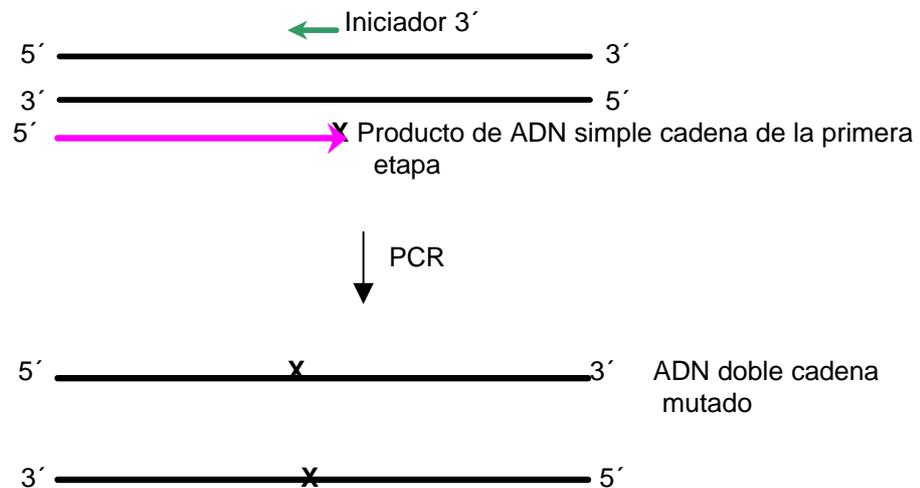
Iniciador 3': 5' ACA TTG TCT TGC TGA ATG TCC TGG 3' Mutación: L20S  
nt 1797-1774 del genoma de FIV

Iniciador 3': 5' TTG TCT TGC TGA ATG TCC TTC TTT TCC ACA ATT AAA ACA CAC 3'  
Mutación: K15G/ P17E /L20S nt 1794-1753 del genoma FIV

La primera reacción de PCR se realizó según el siguiente esquema: primero, 5 minutos a 94° C para desnaturalizar el molde de ADN, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 68 °C. Para las reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa Elongase Mix (Invitrogen), que posee actividad 3' → 5' correctora, en un buffer conteniendo 60 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9,1 a 25 °C), 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1,6 mM MgSO<sub>4</sub>. Las reacciones se realizaron en un ciclador MJ Research.

Para purificar el producto simple cadena de la primera etapa de amplificación se utilizó el método de Tautz y Renz (1983). Primero, se sometió el producto de PCR a electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer 1xTBE (90 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA [pH 8,3]). Luego se cortó la banda de ADN del gel y se incubó durante 30 minutos en una solución de acetato de sodio 0,3 M (pH 7). Se colocó entonces la banda de agarosa en un tubo eppendorf de 500 μl con el fondo perforado y el orificio cubierto con lana de vidrio. El tubo con el fragmento de agarosa se congeló a -80 °C, se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml y el dispositivo se centrifugó 5 minutos a 16.000 xg. La agarosa quedó retenida en la lana de vidrio mientras que la solución de ADN se recogió en el tubo de 1,5 ml. El ADN eluido se precipitó agregando tres volúmenes de etanol absoluto e incubando la solución a -20 °C durante toda la noche. El producto de ADN simple cadena se recuperó por centrifugación a 16.000 xg durante 20 minutos, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua bidestilada.

#### Representación esquemática de la segunda etapa de amplificación:



En esta segunda etapa, se utilizaron como iniciadores 5' los productos de ADN simple cadena llevando la mutación (obtenidos en la primera etapa de la reacción de mutagénesis dirigida) y un iniciador 3' que híbrida en el extremo 3' del gen de la NC. Este último oligonucleótido lleva el sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRV*:

*EcoRV*

Iniciador 3': 5' TTG GAT ATC TAC CTA CTT TAT TAT AAT 3'  
nt 2008-1982 del genoma de FIV

La segunda etapa de PCR se realizó en las mismas condiciones que la primera etapa pero utilizando cantidades equimoleculares del iniciador 5' (producto simple cadena) y del iniciador 3'. El producto obtenido se incubó durante 2 horas a 37 °C con proteinasa K (100 μg/ml) para luego inactivar la enzima incubando 10 minutos a 68 °C. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y el producto se precipitó llevando la solución a una concentración 0,3 M de acetato de sodio (pH 5,2) y agregando dos

volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el ADN se recuperó por centrifugación a 16.000 xg como se describió antes.

### III. – Clonado de los productos de la mutagénesis dirigida en el vector pGEX-2T

Todos los productos de la mutagénesis dirigida generados como se describe en la Sección II de Materiales y Métodos incluyen la región 3' del gen de la GST y versiones mutadas del gen que codifica para la NC de FIV. Estos productos exhiben por lo tanto un sitio de reconocimiento para la enzima *Bam*HI en el extremo 5' del gen de la NC.

Los productos de la mutagénesis dirigida se digirieron entonces con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV y se purificaron a partir de un gel de agarosa por el método descrito en el punto anterior.

Luego, los productos se ligaron al vector pGEX-2T digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sma*I. La ligación se realizó con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen) en el buffer de ligación conteniendo 50mM Tris-HCl (pH 7,6); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 5% polietilenglicol-8000 y 1 mM ATP. La reacción se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l y se incubó a 16<sup>o</sup> C durante toda la noche.

### IV. - Transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes

Los productos de la ligación de los genes NC mutados de FIV en el vector pGEX-2T se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5 $\alpha$  (F'  $\phi$ 80dLacZ «M15 «[lacZ YA-argF]U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 $\theta$  thi-1 gyrA96 relA1; Invitrogen). Las bacterias competentes se prepararon siguiendo el protocolo de Hanahan (1983).

Para la transformación se descongelaron las bacterias competentes a temperatura ambiente y, una vez descongeladas, se las incubó 10 minutos en hielo. Se agregaron entonces 50  $\mu$ l de bacterias competentes a cada mezcla de ligación y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, se incubó la mezcla 90 segundos a 42  $^{\circ}$ C, y en hielo dos minutos.

Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ l de medio LB (1% triptona; 0,5% extracto de levadura; 1% NaCl) y se incubó a 37  $^{\circ}$ C durante 1 hora. Por último, se plaquearon las bacterias en LB – 1,5% agar conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, para seleccionar las bacterias recombinantes, que se dejaron crecer a 37  $^{\circ}$ C durante toda la noche.

### V. - Purificación del ADN plasmídico

De las placas de bacterias transformadas con los productos de la ligación de los genes NC mutados de FIV al vector pGEX-2T se tomaron colonias que fueron crecidas en 2 ml de medio LB conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.

El ADN plasmídico de los cultivos bacterianos se purificó utilizando un método basado en el de la lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981) pero con modificaciones. Se centrifugaron las bacterias a 16.000 xg durante 3 minutos y se resuspendió el sedimento en 100  $\mu$ l de buffer TELT (50 mM Tris-HCl [pH7,5]; 62,5 mM EDTA; 0,4% Tritón-X-100; 2,5 M LiCl; 100  $\mu$ g/ml lisozima). Para lisar las bacterias se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se hirvieron luego por un minuto y se dejaron en hielo durante dos minutos. Las preparaciones se centrifugaron a 16.000 xg por 20 minutos y se descartó el sedimento correspondiente al ADN cromosomal. Al sobrenadante resultante se le agregó 1 volumen de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico. Luego de 20 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 16.000 xg durante 20 minutos y el ADN plasmídico se resuspendió en agua bidestilada.

Para identificar los clones recombinantes, el ADN plasmídico obtenido se digirió con la endonucleasa de restricción *Pst*I (ver Resultados).

### VI. - Secuenciación por el método de Sanger

La presencia de las mutaciones deseadas en el gen de la NC de FIV se verificó secuenciando los insertos de los clones recombinantes. Para ello se utilizó el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

#### A. Preparación del molde de ADN

El ADN plasmídico que se utilizó como molde para la reacción de Sanger se purificó utilizando el método de la lisis alcalina (Wizard plus SV Minipreps Kit, Promega). Se desnaturalizaron 2  $\mu$ g de ADN plasmídico llevando la solución a una concentración de 0,2 N NaOH e incubándola durante 10 minutos. El ADN desnaturalizado se precipitó por agregado de acetato de sodio (pH 5,2) hasta una concentración final de 0,3 M y dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante 10 minutos a –80  $^{\circ}$ C y luego se centrifugó a 16.000 xg para sedimentar el ADN plasmídico. El ADN recuperado se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua bidestilada.

## B. Reacción de hibridación

Se agregaron al ADN 2  $\mu$ l de buffer de hibridación (300 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 160 mM DTT) y 2  $\mu$ l de una solución 3  $\mu$ M del oligonucleótido iniciador 5' GST (ver secuencia en el punto II de Materiales y Métodos) y la mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos, luego a 37 °C durante 10 minutos y finalmente, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se adicionaron a la mezcla 10  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>35</sup>S] dATP (1000 Ci/mmol, NEN), 3  $\mu$ l de una mezcla 1,5  $\mu$ M de dGTP, dCTP y dTTP y 2 unidades de ADN polimerasa del fago T7 modificada (Sequenase, Amersham Biosciences). La reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

## C. Elongación y terminación de la cadena

Se prepararon 4 tubos de 1,5 ml (rotulados G, A, T, C) conteniendo 2,5  $\mu$ l de las mezclas de terminación (80  $\mu$ M dGTP, 80  $\mu$ M dATP, 80  $\mu$ M dCTP, 80  $\mu$ M dTTP y 8  $\mu$ M ddGTP o ddATP o ddCTP o ddTTP, según corresponda). A cada tubo se le agregaron 4,5  $\mu$ l de la mezcla de la etapa anterior y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 5  $\mu$ l de una solución conteniendo 95% formamida; 20 mM EDTA; 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilen-cianol FF. Las reacciones se resolvieron por electroforesis en gel de 5% poliacrilamida conteniendo 8 M urea en buffer TBE. Los productos de la reacción de secuenciación se visualizaron por autorradiografía del gel con película X-OMAT AR-5 (Eastman KODAK).

## VII. - Expresión de las proteínas NC de FIV en bacterias

Se realizaron cultivos de bacterias *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) transformadas con los distintos clones pGEX-NC en medio LB conteniendo 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y se crecieron durante 16 horas a 37 °C con agitación. Luego se diluyeron los cultivos 1/25 con medio de cultivo fresco y se crecieron a 37 °C durante 150 minutos. Se agregó a cada cultivo isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en concentración final 1 mM para inducir la expresión de las proteínas de fusión GST-NC. A las 5 horas posinducción con IPTG, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 16.000 xg durante 2 minutos y el sedimento se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer Laemmli 1X (62 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 2% SDS; 100 mM DTT; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol) (Laemmli, 1970).

## VIII. - Electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas de fusión GST-NC se analizaron por electroforesis en geles de 0,1% SDS – 10% poliacrilamida. La visualización de las bandas proteicas se realizó por tinción con Safe Stain (Invitrogen).

Geles conteniendo cantidades equivalentes de las proteínas de fusión se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences) utilizando el sistema Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La transferencia se realizó en un buffer conteniendo 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol y se aplicó un voltaje constante de 15 V durante 90 minutos.

## IX. - Amplificación y clonado de la región 5' del genoma de FIV

Para generar la sonda de ARN genómico de FIV para ser utilizada en los ensayos de Northwestern se empleó el plásmido pGEM-RU5 construido por nuestro laboratorio (Manrique *et al.*, 2004) que contiene la señal de encapsidación del genoma de FIV (Kemler *et al.*, 2002). El inserto del plásmido pGEM-RU5 incluye los elementos R y U5 del LTR de FIV y los primeros 320 nucleótidos del gen *gag*.

Para la amplificación de esta región del genoma de FIV se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

Iniciador 5': 5' AAA GGG CCC GGA GTC TCT TTG TTG A 3'  
Apal

Iniciador 3': 5' TAC GTC GAC TCA GCT GCA GCA GCA G 3'  
Sall

El iniciador 5' híbrida con los nucleótidos 216-231 del LTR de FIV y el 3' es complementario a los nucleótidos 947-932 del gen *gag* de FIV. En la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores se incluyeron los sitios de reconocimiento para las endonucleasas Apal y Sall para facilitar el clonado del producto amplificado en el vector. La reacción de PCR se realizó como se describió antes.

El producto de PCR se digirió con Sall y Apal, se clonó en el vector pGEM-5Zf (Promega) previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. De esta forma, el fragmento del genoma de FIV queda bajo el control del promotor T7 localizado en la dirección 5' respecto del sitio Apal de la región de clonado múltiple del plásmido.

### X. - Transcripción *in vitro*

Para generar la sonda de ARN marcada radioactivamente se utilizó como molde el plásmido pGEM–RU5 linealizado con la endonucleasa de restricción *SaI*.

La transcripción *in vitro* se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 20 unidades de ARN polimerasa del fago T7 (Promega), 2  $\mu$ g de molde de ADN; 40 mM Tris-HCl (pH 7,9); 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl; 2 mM espermidina; 10 mM DTT; 40 U del inhibidor de ribonucleasas RNasin (Promega); 0,5 mM de ATP, GTP, CTP; 12,5  $\mu$ M de UTP y 100  $\mu$ Ci de [á-<sup>35</sup>S]UTP (1250 Ci/mmol). Se incubó la reacción a 37 °C durante 1 hora. El molde de ADN fue eliminado incubando a 37° C durante 15 minutos con 1 U de DNasa I (libre de RNasas). Se realizaron luego dos extracciones con una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo. El ARN se precipitó agregando acetato de sodio hasta 0,3 M y 3 volúmenes de etanol absoluto. El ARN se sedimentó por centrifugación a 16.000  $\times$ g y se resuspendió en agua bidestilada.

### XI. - Northwestern Blot

Las proteínas de fusión GST–NC electrotransferidas a nitrocelulosa se renaturalizaron incubando la membrana a 4 °C durante 16 horas en buffer de Northwestern (NW) conteniendo 30 mM Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico)-KOH (pH7,5); 400 mM KCl; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT y 0,5 mg/ml de heparina. Luego se agregaron a las membranas 3-6  $\times$  10<sup>6</sup> cpm de la sonda de ARN genómico de FIV y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas con agitación constante. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces durante 10 minutos con buffer NW con heparina y otras dos veces con buffer NW sin heparina. La unión de la sonda de ARN a las proteínas NC de FIV se visualizó por autorradiografía exponiendo la membrana a una película Biomax MS LE (KODAK) con una pantalla intensificadora Trans Screen Low Energy (KODAK).

### I. - Mutagénesis dirigida de la NC de FIV

Las proteínas NC de los virus HIV-1, SIV y FIV poseen dos motivos Cis–His. Como muestra la figura 7, el motivo más cercano al extremo amino terminal de la NC se halla muy conservado en los tres virus. Sin embargo, el motivo Cis–His de FIV difiere del resto en las posiciones 15, 17 y 20 (Figura 7).

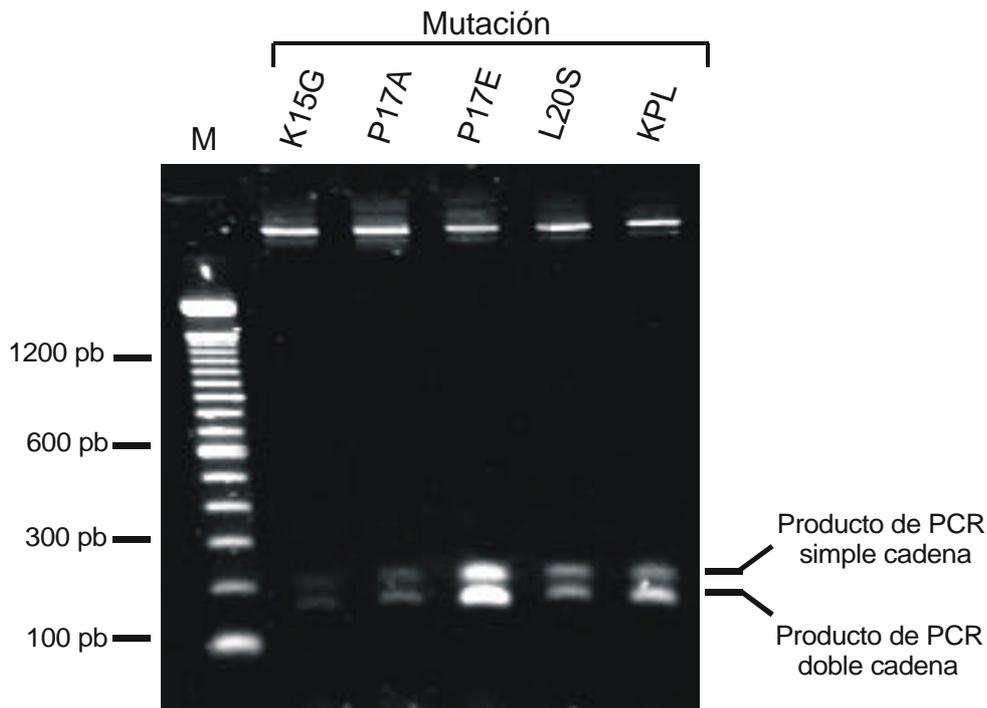
FIV	11	C	F	N	C	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	G	H	<b>L</b>	A	R	Q	C	24
SIV	11	C	W	N	C	G	K	E	G	H	S	A	R	Q	C	24
HIV	15	C	F	N	C	G	K	E	G	H	T	A	R	N	C	28
		C	*	N	C		K		G	H		A	R	*	C	

**Figura 7:** Alineamiento de las secuencias aminoácídicas del motivo Cis–His amino terminal de la proteína NC de FIV (clon molecular FIV-14 del aislamiento Petaluma), SIV (clon molecular PBj1.9) y HIV–1 (clon molecular HXB2). Los aminoácidos idénticos presentes en las tres proteínas se indican debajo del alineamiento, mientras que los aminoácidos similares se denotan con asteriscos. Las posiciones en las que el dominio Cis–His de FIV difiere de los de HIV y SIV se resaltan en letras negritas.

Para estudiar la relevancia funcional de los aminoácidos que son específicos del dominio Cis–His de la NC de FIV, se sustituyeron los mismos en forma individual o conjunta por aquellos presentes en otro dominio Cis–His funcional, el de la NC de SIV. Las mutaciones introducidas en la NC de FIV fueron: K15G, P17E y L20S. La relevancia de la prolina conservada en la posición 17 de la NC de FIV fue estudiada realizando además la sustitución conservativa P17A. Además, se generó una NC mutante de FIV llevando el cambio triple K15G/P17E/L20S. Este último exhibe entonces un dominio Cis–His amino terminal prácticamente idéntico al de la NC de SIV.

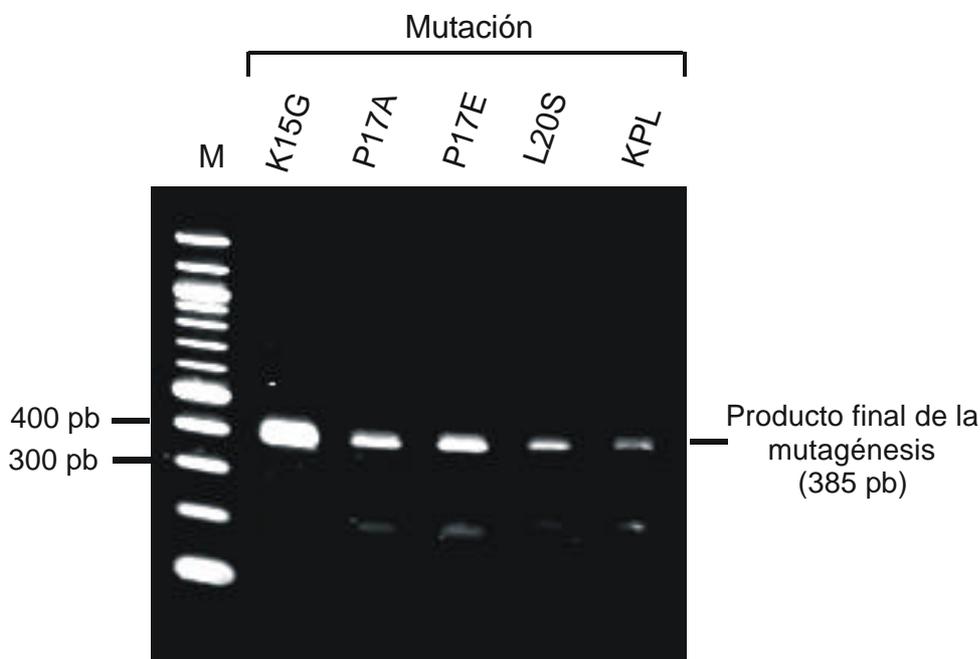
Las mutaciones en el gen NC de FIV se introdujeron mediante la técnica de PCR asimétrica utilizando como templado el gen NC salvaje de FIV clonado en el vector pGEX-2T como se describió en Materiales y Métodos (Sección II).

Al analizar por electroforesis en geles de agarosa los productos de la primera etapa de la reacción de mutagénesis dirigida, se visualizaron productos de ADN tanto simple como doble cadena (Figura 8).



**Figura 8:** Electroforesis en gel 2% agarosa de los productos de la primera etapa de la reacción de mutagénesis dirigida. Se indican las posiciones de los fragmentos de ADN simple y doble cadena así como las de algunas de las bandas del marcador de peso molecular (M, 100 bp ladder, Invitrogen). KPL corresponde a la mutación triple K15G/P17E/L20S.

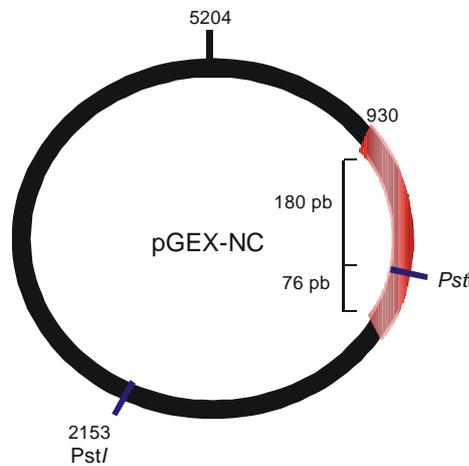
El producto simple cadena purificado como se describió en Materiales y Métodos se utilizó como iniciador 5' en la segunda etapa de la reacción de mutagénesis. Como resultado de esto, se obtuvieron fragmentos de ADN doble cadena de 385 pb que corresponden a los genes NC mutados (Figura 9).



**Figura 9:** Electroforesis en gel 2% agarosa de los productos de la segunda etapa de la mutagénesis dirigida. M, marcador de peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen). KPL corresponde a la mutación K15G/P17E/L20S.

**II. - Identificación de clones recombinantes**

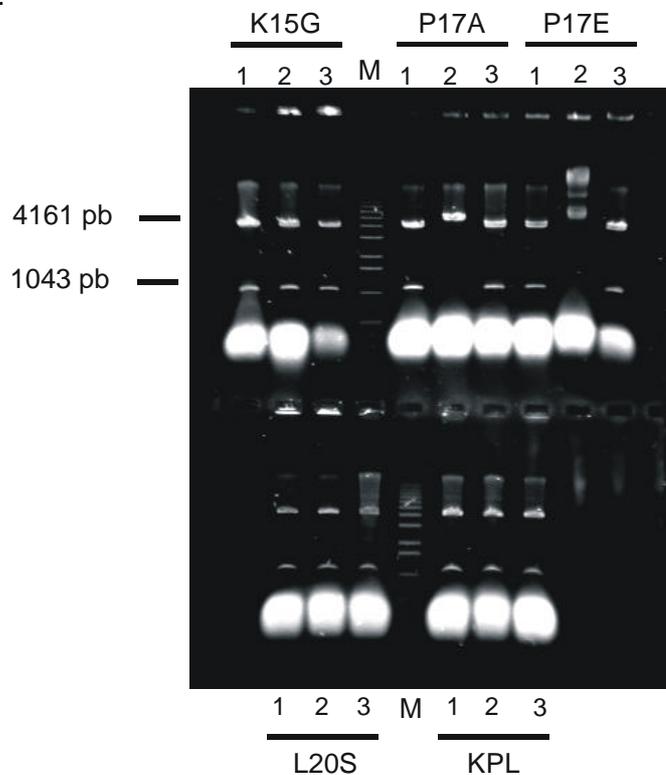
Los productos de ADN doble cadena obtenidos de la mutagénesis dirigida fueron digeridos con *Bam*HI y *Eco*RV y ligados al vector pGEX-2T digerido con *Bam*HI y *Sma*I. Las mezclas de ligación se usaron para transformar bacterias *E. coli* DH5á. Se seleccionaron 3 colonias al azar de cada placa de petri, se purificó el ADN plasmídico y se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción *Pst*I que corta la construcción según el siguiente esquema:



**Figura 10:** Esquema del plásmido pGEX – NC. Se indican los sitios de corte de la enzima *Pst*I en el plásmido y en el gen de la NC (en rojo).

Debido a que la enzima *Pst*I tiene un sitio de corte en el vector y otro en el gen de la NC, los clones positivos para el inserto serán aquellos que exhiban dos bandas de 4161 y 1043 pb. En cambio, los clones negativos presentarán una única banda correspondiente al plásmido linealizado.

Como se muestra en la Figura 11, los tres clones seleccionados de los mutantes K15G, L20S y K15G/P17E/L20S contenían el inserto, mientras que para los mutantes P17A y P17E solamente dos de los tres clones exhibían inserto.



**Figura 11:** Electroforesis en gel de 1% agarosa de las digestiones con *Pst*I de los plásmidos correspondientes a los clones K15G, P17A, P17E, L20S y K15G/P17E/L20S. M, marcador de peso molecular (1 Kb ladder, Invitrogen).

**III. - Secuenciación de los genes NC mutados**

Los clones recombinantes correspondientes a los genes NC K15G, P17A, P17E, L20S y K15G/P17E/L20S fueron secuenciados utilizando el método de Sanger para verificar la presencia de las mutaciones deseadas en las construcciones pGEX-NC. En la figura 12 se muestran las autorradiografías de los gels de secuencia exhibiendo las mutaciones introducidas en el gen de la NC.

**A.**

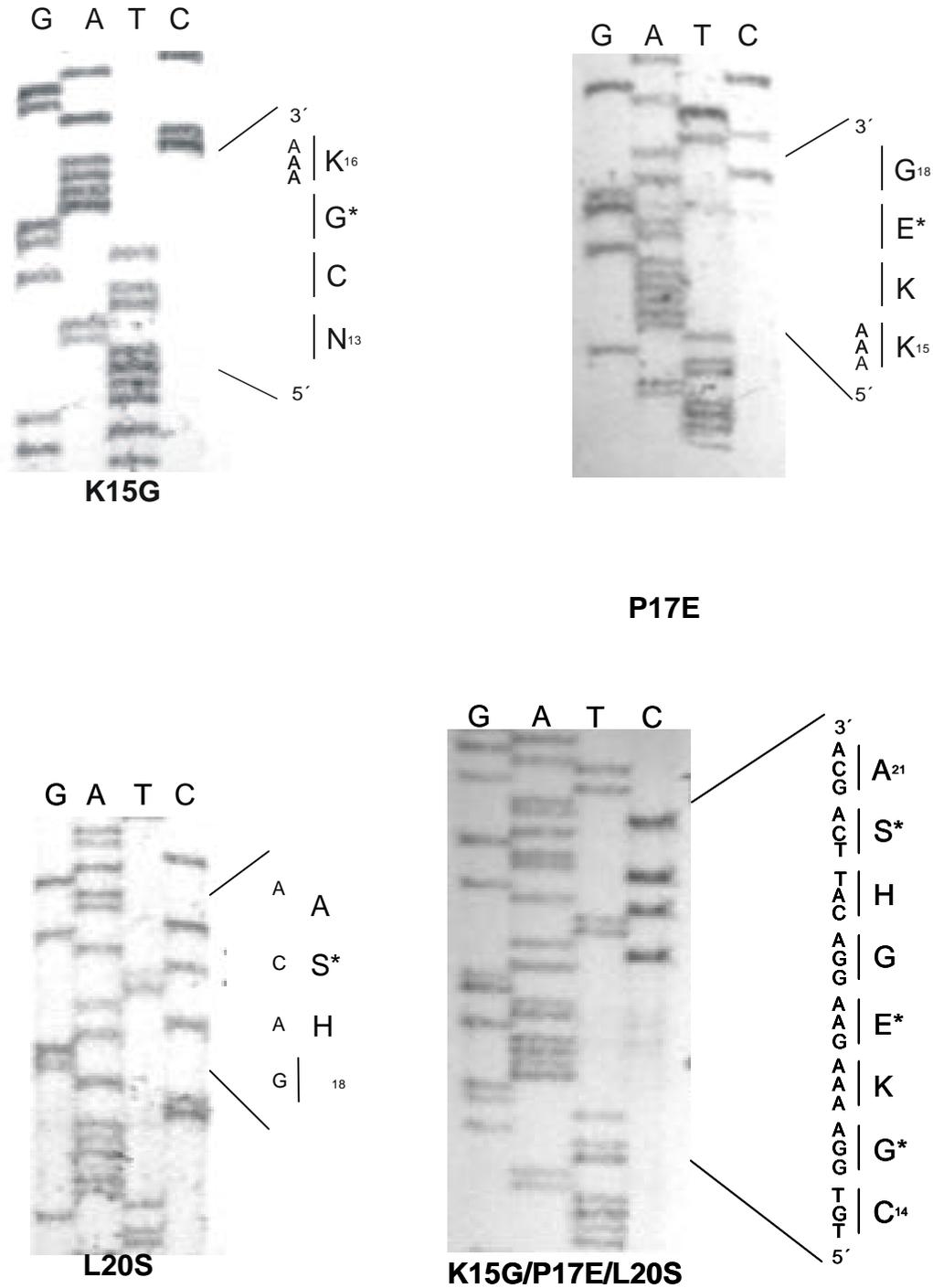
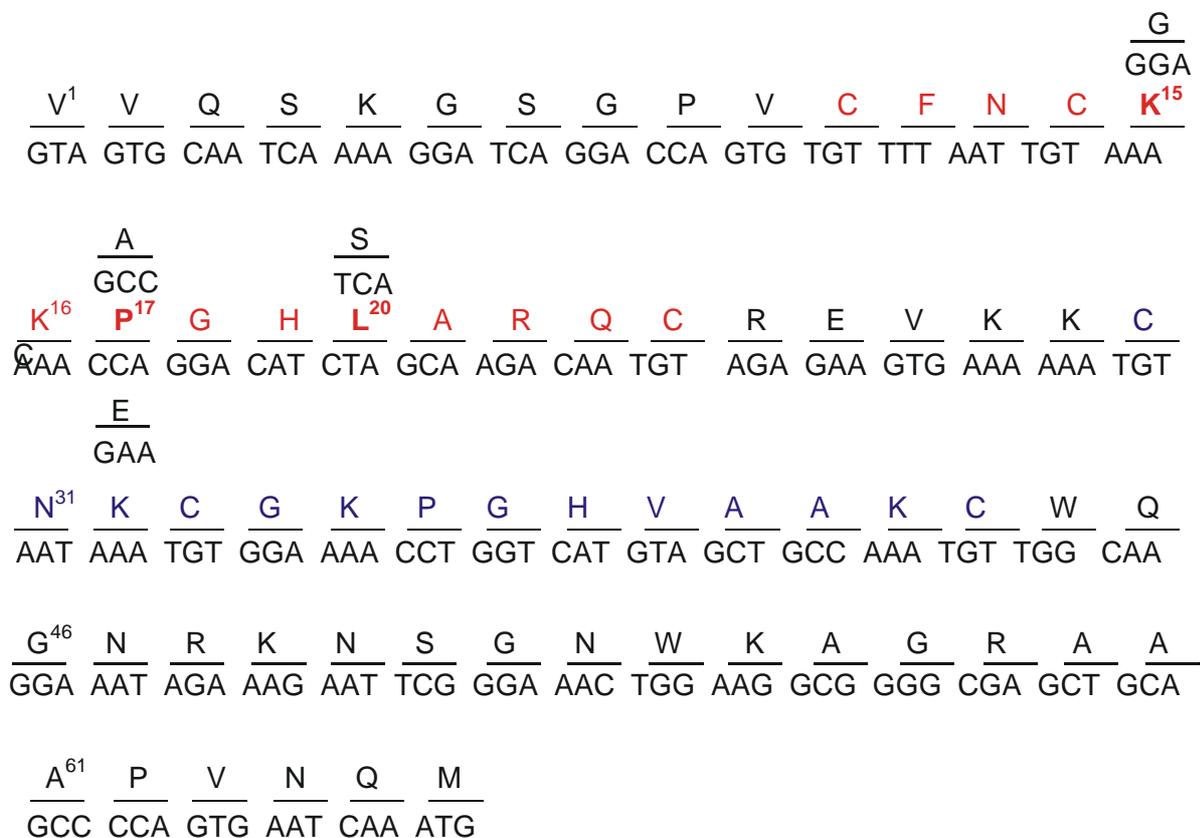


Figura 12: A.

B.

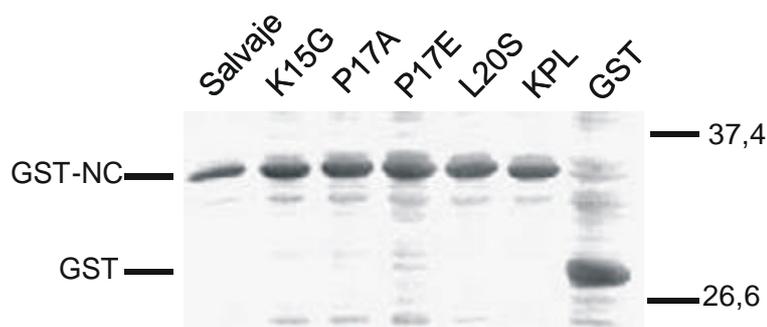


**Figura 12: A.** Productos de la secuenciación por el método de Sanger de los genes de la NC de FIV mutados K15G, P17E, L20S y KPL visualizados por autorradiografía. Al costado de cada autorradiografía se indica la secuencia correspondiente y los aminoácidos que codifica, los aminoácidos marcados con \* corresponden a los cambios introducidos. **B.** Secuencia salvaje de la región NC de *gag* y los aminoácidos que codifica. Se muestran las sustituciones realizadas en las posiciones 15, 17 y 20. Además se muestra en rojo la ubicación del motivo Cis-His amino terminal y en azul la del motivo carboxilo terminal.

#### IV. - Análisis de la expresión en *E. coli* de las proteínas NC mutantes

Como primer paso, se realizó el análisis de la expresión de las proteínas NC salvaje y mutantes de FIV como proteínas de fusión con la GST. Para ello, cultivos de los clones bacterianos llevando el plásmido pGEX-NC<sub>salvaje</sub> o los plásmidos pGEX-NC<sub>K15G</sub>, pGEX-NC<sub>P17A</sub>, pGEX-NC<sub>P17E</sub>, pGEX-NC<sub>L20S</sub> o pGEX-NC<sub>KPL</sub> fueron inducidos con IPTG como se describe en Materiales y Métodos. También se realizó la expresión de la GST utilizando bacterias transformadas con el plásmido pGEX-2T sin inserto. Los lisados bacterianos se analizaron por electroforesis en un gel 0,1% SDS-10% poliacrilamida.

Como muestra la Figura 13, las proteínas de fusión entre GST-NC mutantes se expresaron en niveles similares a los de la GST-NC salvaje. Por otro lado, en todos los casos las movilidades electroforéticas exhibidas por las proteínas de fusión fueron similares a las esperadas.



**Figura 13:** Electroforesis en gel 0,1% SDS – 10% poliacrilamida de los lisados de las bacterias expresando como proteínas de fusión con GST, las proteínas NC salvaje y mutantes (K15G, P17A, P17E, L20S y KPL). Las proteínas se visualizaron por tinción con Safe Stain (Invitrogen). Las movilidades de las proteínas y de los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican al costado de la figura.

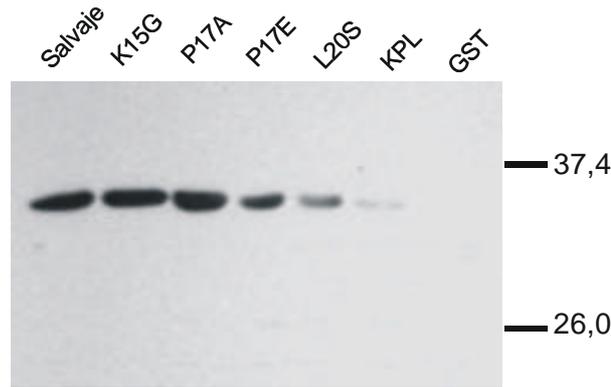
#### V. - Efecto de las mutaciones K15G, P17A, P17E, L20S y K15G/P17E/L20S sobre la unión de la NC al ARN genómico viral de FIV

Se ha demostrado que ARNs conteniendo la señal E del genoma de HIV-1 son capaces de unirse específicamente a proteínas Gag o NC expresadas en bacterias e inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa (Luban & Goff, 1991; Schmalzbauer *et al.*, 1996). Recientemente, hemos utilizado un ensayo similar para analizar la capacidad de unión a ARN genómico de una serie de mutantes de la proteína NC de FIV (Manrique *et al.*, 2004).

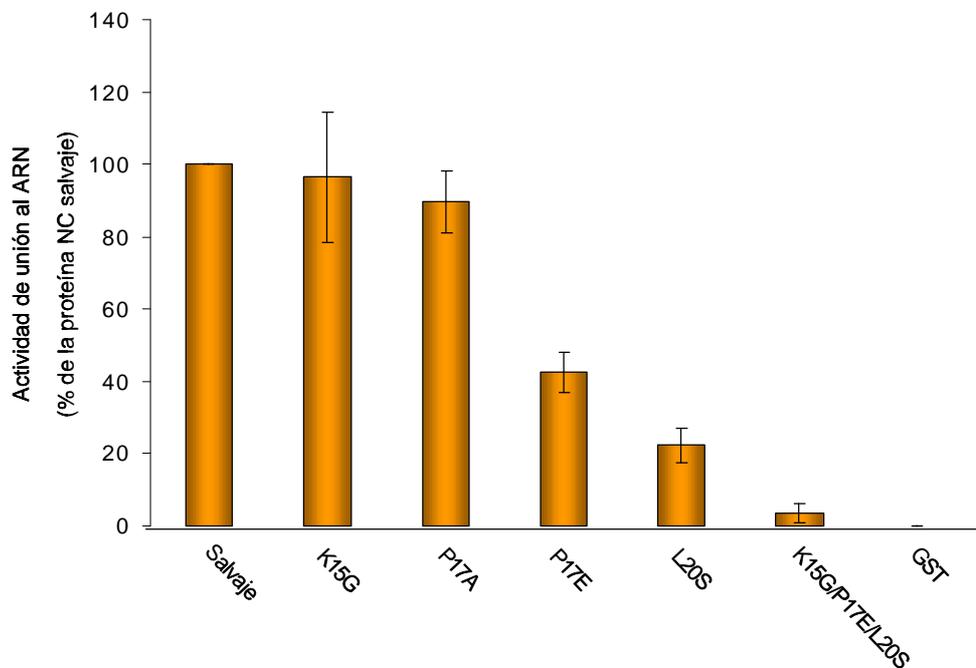
Para estudiar entonces el efecto sobre la capacidad de unión de la NC de FIV al ARN genómico viral de las mutaciones K15G, P17A, P17E, L20S y K15G/P17E/L20S introducidas en la NC se realizaron ensayos de Northwestern como se describe en Materiales y Métodos.

Para ello, las proteínas de fusión GST-NC salvaje y mutadas se resolvieron en geles 0,1% SDS – 10% poliacrilamida y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Como control negativo se incluyó en los geles una muestra de lisados de bacterias expresando la GST. Las membranas se incubaron con una sonda de ARN genómico de FIV que contiene la señal de empaquetamiento descrita por Kemler *et al.* (2002). Como muestra la Figura 14, las proteínas NC mutantes K15G y P17A unen ARN genómico con una eficiencia similar a la de la NC salvaje. En cambio, las mutaciones P17E, L20S y K15G/P17E/L20S interfieren con la capacidad de la NC de unir ARN genómico. Como se esperaba, la proteína GST fue incapaz de unir a la sonda de ARN.

Al cuantificar el grado de asociación del ARN genómico a las NC mutantes con respecto al exhibido por la NC salvaje en tres experimentos independientes, se determinó que las proteínas K15G y P17A exhiben una capacidad de unión de  $96,5 \pm 18,0\%$  y  $89,6 \pm 8,4\%$  respecto de la NC salvaje (Figura 15). En cambio, la NC P17E unió ARN genómico viral con una eficiencia del  $42,5 \pm 5,5\%$  respecto de la NC salvaje (Figura 15). El efecto inhibitorio más drástico sobre la capacidad de unión de la NC de FIV al ARN se observó con las mutaciones L20S y K15G/P17E/L20S. En efecto, las proteínas NC L20S y K15G/P17E/L20S unen la sonda de ARN con eficiencias de solamente un  $22,4 \pm 4,8\%$  y  $3,3 \pm 2,7\%$ , respectivamente (Figura 15).



**Figura 14:** Análisis de la capacidad de unión de las proteínas NC salvaje y mutantes al ARN genómico de FIV. Las proteínas de fusión GST-NC se resolvieron en un gel 0,1% SDS – 10% poliacrilamida y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se hizo reaccionar con la sonda radioactiva correspondiente al extremo 5' del genoma de FIV (ver Materiales y Métodos). Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (en KDa).



**Figura 15:** Efecto de las mutaciones en la NC de FIV sobre su capacidad de unión al ARN genómico viral. El grado de unión de cada proteína a la sonda de ARN fue cuantificado por densitometría de las autorradiografías de las membranas sometidas a ensayo de Northwestern y referido a lo obtenido con la proteína NC salvaje (considerado como 100%). Los valores representan el valor promedio  $\pm$  desviación standard de tres experimentos independientes.

En comparación con la abundante información disponible sobre la proteína NC de HIV-1, es escaso el conocimiento respecto del rol que cumple la proteína NC en el ciclo de vida de los lentivirus de animales no primates. Dado que el sistema FIV–gato doméstico es utilizado como modelo animal de las infecciones causadas por HIV-1, y que las proteínas NC retrovirales son reconocidas como un blanco potencial para intervenciones terapéuticas, resulta entonces importante caracterizar los dominios funcionales de la proteína NC de FIV. Esta información contribuirá no sólo al conocimiento de las funciones desarrolladas por las proteínas virales de los lentivirus, sino también al desarrollo racional de estrategias antivirales dirigidas contra HIV y lentivirus animales.

Recientemente, nuestro laboratorio demostró que el motivo «dedo de zinc» amino terminal de la proteína NC de FIV es más importante que el motivo carboxilo terminal no sólo para la unión del ARN genómico viral, sino también para el ensamblado eficiente de Gag en viriones (Manrique *et al.*, 2004). Esta conclusión motivó el estudio en mayor profundidad del motivo Cis–His amino terminal de la proteína NC de FIV cuyos resultados se presentan en esta Tesis de Licenciatura.

En aquellos retrovirus cuya proteína NC exhibe dos motivos Cis–His, el motivo amino terminal se halla más evolutivamente conservado (Jewell & Mansky, 2000). En efecto, el motivo Cis–His amino terminal de FIV difiere únicamente en tres posiciones aminoacídicas respecto del de la NC de los virus HIV y SIV. Decidimos entonces sustituir los aminoácidos de la NC de FIV presentes en estas posiciones por aquéllos exhibidos por la de SIV en las posiciones equivalentes. Las proteínas NC mutantes de FIV se expresaron como fusión con la GST para luego analizar su capacidad de unión a una sonda radioactiva de ARN genómico viral mediante ensayos de Northwestern.

La sustitución de la lisina en posición 15 por glicina (mutación K15G) no alteró la capacidad de unión de la NC al ARN genómico respecto de la capacidad de la NC salvaje. En cambio, el reemplazo de la prolina en posición 17 por ácido glutámico (mutación P17E) y de la leucina en posición 20 por serina (mutación L20S) redujo la unión de la proteína NC al ARN genómico en aproximadamente un 60% y 80%, respectivamente, en comparación con la actividad exhibida por la proteína NC salvaje. Es interesante destacar que al reemplazar simultáneamente en la NC de FIV los aminoácidos presentes en las posiciones 15, 17 y 20 del motivo Cis–His amino terminal por aquéllos presentes en la NC de SIV, se inhibe casi por completo la capacidad de la NC de unir a la sonda de ARN. Estos resultados indican que aún aquellos aminoácidos que son específicos del motivo Cis–His amino terminal de la NC de FIV y que además no participan en la coordinación del ión zinc, son no obstante necesarios para la función de la NC de FIV en el empaquetamiento del ARN genómico viral. Nuestros estudios indican que el dominio Cis–His amino terminal de la NC de FIV tolera desde el punto de vista funcional solamente el reemplazo de la lisina en posición 15 y una sustitución conservativa en posición 17 (mutación P17A).

Al comparar las propiedades de la NC de FIV con las de HIV-1 surge que en ambos virus el dominio Cis–His amino terminal juega un rol preponderante en el empaquetamiento del ARN genómico viral. En efecto, en HIV-1 el motivo «dedo de zinc» amino terminal es también más sensible a alteraciones de su secuencia aminoacídica, en lo que respecta a la unión al ARN, que el motivo carboxilo terminal (Schwartz *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de lo que mostramos en esta Tesis de Licenciatura para FIV, sustituciones aminoacídicas en los residuos que no coordinan zinc del motivo Cis–His amino terminal de la NC de HIV-1 tienen poco efecto sobre el empaquetamiento del ARN genómico viral (Dorfman *et al.*, 1993).

Las proteínas NC de FIV y HIV-1 difieren además en el rol que desempeñan los motivos Cis–His en el ensamblado viral. Hemos demostrado que el reemplazo en la NC de FIV de la primer cisteína del motivo Cis–His amino terminal por serina es suficiente para inhibir drásticamente el ensamblado de Gag en viriones (Manrique *et al.*, 2004). En cambio, mutaciones que afectan los residuos que coordinan zinc en el motivo Cis–His amino terminal de la NC de HIV-1 no afectan el ensamblado en partículas (Aldovini & Young, 1990; Dorfman *et al.*, 1993). Esto indica que en FIV el proceso de ensamblado es extremadamente sensible a reducciones en la capacidad de unión de la NC al ARN genómico viral. La unión de moléculas de ARN genómico al dominio NC de Gag de FIV podría contribuir a reclutar moléculas de Gag favoreciendo su oligomerización y ensamblado en partículas virales. Este concepto se encuentra apoyado por evidencias experimentales obtenidas con el virus de la leucemia murina de Moloney (Muriaux *et al.*, 2001).

## Bibliografía

- † Aldovini, A. & Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in HIV type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**, 1920–1926.
- † Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Malvadi, G., & Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 87–112.
- † Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M. & Varmus, H.E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev.* **3**, 469–478.
- † Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., & Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666–669.
- † Clements, J.E. & Wong–Staal, F. (1992). Molecular biology of lentiviruses. *Sem. Virol.* **3**, 137–146
- † Coffin, J.M. (1996). Retroviridae and their replication. En: «Virology» (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P. Howley). Raven Press, New York, pp. 1767–1848.
- † Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (1997). «Retroviruses». Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- † Dawson, L. & Yu, X.-F. (1998). The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology* **251**, 141–157.
- † Delchambre, M., Gheysen, D., Thines, D., Thiriart, C., Jacobs, E., Verdin, E., Horth, M., Burny, E., & Bex, F. (1989). The Gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* **8**, 2653–2660.
- † Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Hoglund, S., & Göttlinger, H.G. (1994). Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**, 8180–8187.
- † Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A., & Göttlinger, H.G. (1993). Mapping of functionally important residues of a cysteine – histidine box in human immunodeficiency type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* **67**, 6159–6169.
- † Elder, J.H., Lerner, D.L., Hasselkus-Light, C.S., Fontenot, D.J., Hunter, E., Luciw, P.A., Montelaro, R.C., & Phillips, T.R. (1992). Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J. Virol.* **66**, 1791–1794.
- † Elder, J.H., Schnölzer, M., Hasselkus-Light, C.S., Henson, M., Lerner, D.A., Phillips, T.R., Wagaman, P.C., & Kent, S.B. (1993). Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyproteins of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **67**, 1869–1876.
- † Feng, Y.-X., Broder, C.C., Kennedy, P.E., & Berger E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled cofactor. *Science* **272**, 872–877.
- † Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., & Skalka A.M. (2000). «Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control» (ed. S.J. Flint). ASM Press, Washington D.C. pp. 762–764.
- † Freed, E.O. & Martin, M.A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**, 1984–1989.
- † Freed E.O., Orenstein, J.M., Buckler-White, A.J., & Martin M.A. (1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix block virus particle production. *J. Virol.* **68**, 5311–5320.
- † Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV-1: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617–637.
- † Gheysen, P., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., & De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55Gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**, 103–112.
- † González, S.A. & Affranchino, J.L. (1995). Mutational analysis of the conserved cysteine residues in the simian immunodeficiency virus matrix protein. *Virology* **210**, 501–507.
- † González, S.A., Affranchino, J.L., Gelderblom, H.R., & Burny, A. (1993). Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* **194**, 548–556.
- † González, S.A., Burny, A., & Affranchino, J.L. (1996). Identification of domains in the simian immunodeficiency virus matrix protein essential for assembly and envelope glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **70**, 6384–6389.
- † Gorelick, R.J., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Wiltrout, T.A., Coren, L.V., Chabot, D.J., Lifson, J.D., Henderson, L.E., & Arthur, L.O. (1999). Strict conservation of the retroviral NC protein zinc finger is strongly influenced by its role in viral infection processes: Characterization of HIV-1 particles containing mutant nucleocapsid zinc-coordinating sequences. *Virology* **256**, 92–104.

- † Göttlinger, H.G. (2001). HIV-1 Gag: a molecular machine driving viral particle assembly and release. *AIDS* **15**, 13–20.
- † Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G., & Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5781–5785.
- † Gulizia, J., Dempsey, M.P., Sharova, N., Bukrinsky, M.I., Spitz, L., Goldfarb, D., & Stevenson, M. (1994). Reduced nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes in the presence of a prototypic nuclear targeting signal. *J. Virol.* **68**, 2021–2025.
- † Hanahan, D. (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- † Heinzinger, N.K., Bukrinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., & Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**, 2483–2487.
- † Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193–197.
- † Hunter, E. (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Sem. Virol.* **5**, 71–83.
- † Hunter, E. & Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 187–253.
- † Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., & Varmus, H.E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280–283.
- † Jewell, N.A. & Mansky, L.M. (2000). In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J. Gen. Virol.* **81**, 1889–1899.
- † Johnston, J. & Power, C. (1999). Productive infection of human peripheral blood mononuclear cells by feline immunodeficiency virus: Implication for vector development. *J. Virol.* **73**, 2491–2498.
- † Kemler, I., Barraza, R., & Poeschla, E. (2002). Mapping the encapsidation determinants of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**, 11889–11903.
- † Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., & Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4686–4690.
- † Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- † Luban, J. & Goff, S.P. (1991). Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J. Virol.* **65**, 3203–3212.
- † Mammano, F., Ohagen, A., Hoglund, S., & Göttlinger, H.G. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* **68**, 4927–4936.
- † Manrique, M.L., Celma, C.C.P., González, S.A., & Affranchino, J.L. (2001). Mutational analysis of the feline immunodeficiency virus matrix protein. *Virus Res.* **76**, 103–113.
- † Manrique, J.M., Celma, C.C.P., Hunter, E., Affranchino, J.L., & González, S.A. (2003). Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N-terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein. *J. Virol.* **77**, 10881–10888.
- † Manrique, M.L., Raudí, M.L., González, S.A., & Affranchino J.L. (2004). Functional domains in the feline immunodeficiency virus nucleocapsid protein. *Virology* **327**, 83–92.
- † Murakami, T. & Freed, E. O. (2000). Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **74**, 3548–3554.
- † Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., & Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5246–5251.
- † Norimine, J., Miyazawa, T., Kawaguchi, Y., Tomonaga, K., Shin, Y.S., Toyosaki, T., Kohmoto, M., Niikura, M., Tohya, Y., & Mikami, T. (1993). Feline CD4 molecules expressed on feline non-lymphoid cell lines are not enough for productive infection of highly lymphotropic feline immunodeficiency virus isolates. *Arch. Virol.* **130**, 171–178.
- † Perrin, S. & Gilliland, G. (1990). Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7433–7438.
- † Poeschla, E.M. & Looney, D.J. (1998). CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. *J. Virol.* **72**, 6858–6866.

- † Poeschla, E.M., Wong-Staal, F., & Looney, D.J. (1998). Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* **4**, 354–357.
- † Pryciak, P.M. & Varmus, H.E. (1992). Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* **69**, 769–780.
- † Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V., & Spearman, P. (2000). Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup>. *J. Virol.* **74**, 7238–7249.
- † Sanger, F. Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- † Schmalzbauer, E., Strack, B., Dannull, J., Guehmann, S., & Moelling, K. (1996). Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J. Virol.* **70**, 771–777.
- † Schwartz, M.D., Fiore, D., & Panganiban, A.T. (1997). Distinct functions and requirements for the Cys–His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. *J. Virol.* **71**, 9295–9305.
- † Shimojima, M., Miyazawa, T. Ikeda, Y., McMonagle, E.L., Haining, H. Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M.J., & Willett, B.J. (2004). Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* **303**, 1192–1195.
- † Srinivasakumar, N., Hammarskjöld, M.L., & Rekosh, D. (1995). Characterization of deletion mutants in the capsid region of human immunodeficiency virus type 1 that affect particle formation and Gag-Pol precursor incorporation. *J. Virol.* **69**, 6106–6114.
- † Tautz, D. & Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**, 14–19.
- † Von Schwedler, U., Kornbluth, R.S., & Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6992–6996.
- † Wieggers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., & Kräusslich, H.G. (1998). Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* **72**, 2846–2854.
- † Zhang, Y. & Barklis, E. (1997). Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J. Virol.* **71**, 6765–6776.
- † Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W., & Resh, M.D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**, 2556–2569.





