

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO
MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DE LAS
PROTEÍNAS ACCESORIAS DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Laura Herrero Romero

Directora

M^a Eugenia González Portal

Madrid, 2015

ISBN: 978-84-606 -9026-9

© Laura Herrero Romero, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**La levadura *Saccharomyces cerevisiae*
como modelo celular para el estudio de
las proteínas accesorias del Virus de la
Inmunodeficiencia Humana tipo 1**

TESIS DOCTORAL

LAURA HERRERO ROMERO
MADRID 2011



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular para el estudio de las proteínas accesorias del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

LAURA HERRERO ROMERO

VºBº DIRECTORA

Dra. Mª Eugenia González Portal

**CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
MADRID 2011**

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Expresión Viral del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), bajo la dirección de la Dra. M^a Eugenia González Portal y ha sido financiado con una beca predoctoral Intramural del ISCIII del Ministerio de Sanidad y Consumo.

La investigadora titular de OPIS, D^a María Eugenia González Portal, perteneciente al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII),

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada "La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular para el estudio de las proteínas accesorias del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1" presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a Laura Herrero Romero para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII, bajo su dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con la normativa vigente, se firma este certificado, autorizando su presentación como directora de la mencionada Tesis Doctoral.

En Madrid, a 05 de Septiembre de 2011.

Fdo: Dra. M^a Eugenia González Portal.

Bueno por fin está. Ahora me gustaría recordar a todas aquellas personas que han influido en este trabajo y que, de una manera u otra, han contribuido a que llegara a buen fin.

En primer lugar, agradecer a la Dra. M^a Eugenia González la oportunidad de desarrollar esta Tesis Doctoral en su laboratorio de Expresión Viral. Gracias por el tiempo empleado en mi formación científica y por enseñarme a trabajar de una manera meticulosa.

Además, me gustaría subrayar la ayuda prestada por el laboratorio del Dr. Luis Carrasco, que nos facilitó el sistema y material necesarios para la realización de este trabajo.

Gracias a mis compañeras y amigas del laboratorio, con las que he reído y llorado. A Noemí, con sus locuras tan divertidas, a Virginia, con esas historias que tanto nos entretenían, y a Elena, con ese carácter fuerte y un trozo de pan en el fondo. A todas os tengo que agradecer muchas cosas, especialmente el haberme rodeado de un ambiente de amistad, alegría y buen humor, que ha hecho que el trabajo fuera más ligero.

A las vecinas de la Unidad de Genética bacteriana: Mayte, M^a José, Toni, Luz y Montse. ¿Cuántas veces os he mareado con mis cosas? Muchas gracias por todos esos ratos que hemos compartido.

Tampoco me puedo olvidar de mis compis de Arbovirus, mi nuevo "labo". A ellas quiero agradecer su apoyo, su interés y su ayuda con esos detalles tontos de última hora. Muchas gracias a todas, Anita, M^a Paz, Anabel, Leti, Eva, Lourdes, Paqui y Lola. Y a mi nuevo jefe, Antonio, siempre pendiente de cómo va mi Tesis, a pesar de las miles de cosas que hay en su cabeza. También a los nuevos vecinos, de Espiroquetas y Patógenos Especiales, muchas gracias por vuestra amabilidad y vuestro interés.

A mi familia, que siempre me ha apoyado y me ha animado a seguir adelante con "esa cosa rara" que se me había metido en la cabeza. Muchas gracias por la paciencia que habéis tenido, especialmente en esos cumpleaños a los que llegaba tarde porque había un experimento que terminar.

Y por último, quiero agradecerle de manera especial a César que siempre haya estado ahí. Me has sufrido en los momentos en que estaba insoportable y has aguantado mi mal carácter cuando estaba nerviosa. ¡La de cervezas que nos hemos tomado cada vez que me daba la angustia! Gracias.

Muchas gracias a todos.

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota.

Madre Teresa de Calcuta

ABREVIATURAS

$\Delta trk1,2$	Delección de los genes <i>trk1</i> y <i>trk2</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico codificante
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN _t	Ácido ribonucleico de transferencia
ARN _t ^{lys}	Ácido ribonucleico de transferencia codificante para lisina
DMA	5-(N,N-dimetil)-amilorida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad óptica a longitud de onda de 600 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
HMA	Hexametilenamilorida
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
LTR	Extremos largos repetidos (<i>Long Terminal Repeat</i>)
ONPG	Orto-nitrofenilgalactopiranosido
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de preintegración nuclear
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEA	Cloruro de tetraethylamonio
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletildiamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
ufc	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia simia
VLPs	Pseudopartículas virales
YNB	Medio mínimo (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPD	Medio rico (<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>)

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	7
1.1.1. La estructura del virión	7
1.1.2. El genoma viral	8
1.1.3. El ciclo de replicación viral	9
1.1.4. Terapia de la infección por el VIH	12
1.2. LAS PROTEÍNAS ACCESORIAS DEL VIH-1	13
1.2.1. La proteína Nef y la proteína Vif.....	13
1.2.2. La proteína Vpr	14
1.2.3. La proteína Vpu.....	16
1.2.3.1. Estructura y funciones de la proteína Vpu.....	17
1.2.3.2. Interacción de la proteína Vpu con factores celulares.....	20
1.3. LA PROTEÍNA VPU FORMA PARTE DE LA FAMILIA DE VIROPORINAS	22
1.4. LA PROTEÍNA VPU COMO POSIBLE DIANA TERAPEÚTICA.....	24
1.5. LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO SISTEMA BIOLOGICO PARA ESTUDIOS DE PROTEÍNAS HETEROLOGAS	25
1.5.1. Utilización de <i>S. cerevisiae</i> en estudios de virología.....	26
1.5.2. <i>S. cerevisiae</i> como modelo para el estudio funcional de canales iónicos	28
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.1.1. Bacterias	39
3.1.2. Levaduras	39
3.2. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS	39
3.2.1. Medios de cultivo	39
3.2.2. Conservación de los microorganismos.....	41

3.3. TRANSFORMACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	41
3.3.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	41
3.3.2. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.4. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE <i>S.CEREVISIAE</i> Y <i>E. COLI</i>	44
3.4.1. Cultivos de bacterias	44
3.4.2. Cultivos de levaduras	44
3.4.2.1. Preparación de inóculos para la inducción con galactosa	44
3.4.2.2. Cinéticas de crecimiento	45
3.4.2.3. Tratamiento con higromicina B.....	45
3.4.2.4. Tratamiento con 5-(N,N-hexametilen)-amilorida.....	45
3.4.2.5. Cultivo de levaduras en medio sólido	46
3.5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	46
3.5.1. Vector plasmídico.....	46
3.5.2. Enzimas	48
3.5.3. Preparación y purificación de las construcciones plasmídicas.....	48
3.5.4. Amplificación de las construcciones plasmídicas.....	50
3.5.5. Electroforesis en geles de agarosa	51
3.6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	52
3.6.1. Obtención de extractos de proteína a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	52
3.6.2. Electroforesis de proteínas.....	52
3.6.3. Electrotransferencia	53
3.6.4. Anticuerpos	54
3.6.5. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western-blot</i>	54
4. RESULTADOS.....	57
4.1. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO MODELO BIOLÓGICO PARA EXPRESAR PROTEÍNAS ACCESORIAS DEL VIH-1.....	59
4.1.1. Expresión inducible de genes accesorios del VIH-1 en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60

4.1.2 La presencia de leucina en el medio de cultivo impide detectar la actividad de las proteínas Vpr y Vpu del VIH-1 en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
4.1.3. El tamaño de la población inicial de células en los cultivos inducidos es crítico para la detección de la actividad de las proteínas Vpu y Vpr del VIH-1	67
4.1.4. El estado de crecimiento del inóculo de levadura en el momento de la inducción afecta la detección de actividad de la proteína retroviral Vpu.....	69
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU DEL VIH-1 UTILIZANDO LA CEPA W303-1B DE LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	72
4.2.1. El efecto de la proteína Vpu del VIH-1 sobre los cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es dependiente del pH del medio de cultivo.....	72
4.2.2. La actividad de la proteína Vpu del VIH-1 sobre los cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es sensible a la concentración de iones K ⁺ en el medio de cultivo	75
4.2.3. La 5-(N,N-hexametilen)-amilorida es capaz de revertir el efecto que produce la proteína Vpu del VIH-1 sobre el crecimiento de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	78
4.2.4. La actividad inhibidora de la proteína Vpu en la cepa silvestre aumenta en condiciones de abundancia de nutrientes.....	80
4.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU DEL VIH-1 UTILIZANDO LA CEPA WΔ3 DE LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	82
4.3.1. La proteína viral Vpu produce la estimulación del crecimiento de los cultivos Δ <i>trk1,2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
4.3.2. El efecto de la proteína Vpu sobre los cultivos Δ <i>trk1,2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es dependiente del pH del medio de cultivo.....	84
4.3.3. La concentración de iones K ⁺ del medio de cultivo afecta a la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en el doble mutante <i>trk1 trk2</i> .	86

4.3.4. La presencia de amonio en el medio de cultivo disminuye la actividad de la proteína Vpu en el mutante <i>trk1 trk2</i>	88
4.3.5. La actividad estimuladora de la proteína Vpu en el mutante <i>trk1 trk2</i> aumenta en condiciones de déficit de nutrientes	90
4.3.6. La proteína Vpu del VIH-1 es menos activa en el mutante de levadura en presencia de HMA.....	91
4.3.7. La actividad de la proteína Vpu protege a las células $\Delta trk1,2$ de la acción tóxica del antibiótico higromicina B.....	93
5. DISCUSIÓN	97
5.1. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE MANIPULACIÓN DE LOS CULTIVOS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> PARA LOGRAR UNA EXPRESIÓN EFICIENTE DE LOS GENES ACCESORIOS RETROVIRALES.	99
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR LA PROTEÍNA VPU EN LA CEPA SILVESTRE Y MUTANTE DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	103
5.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU EN PRESENCIA DE INHIBIDORES.....	110
6. CONCLUSIONES	113
7. BIBLIOGRAFÍA	117

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1: Organización genómica del ADN proviral del VIH-1.....	9
Figura 2: Ciclo biológico del VIH-1	11
Figura 3: Estructura de la proteína Vpr del VIH-1.....	15
Figura 4: Estructura secundaria hipotética de la proteína Vpu del VIH-1	18
Figura 5: Vector plasmídico pEMBLyex4.....	47
Figura 6: Crecimiento de la cepa W303-1B de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , transformada con los plásmidos pEMBLyex4 (control) y pEMBLyex4vpr (Vpr), en medio con glucosa y en medio con galactosa.....	61
Figura 7: Crecimiento de la cepa W303-1B de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , transformada con los plásmidos pEMBLyex4 (control) o pEMBLyex4vpu (Vpu), en medio con glucosa y en medio con galactosa.....	63
Figura 8: Detección de las proteínas Vpr y Vpu en los cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformados con pEMBLyex4, pEMBLyex4vpr o pEMBLyex4vpu.....	64
Figura 9: Influencia de la leucina sobre la actividad de las proteínas Vpr y Vpu del VIH-1 en los cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
Figura 10: Influencia del tamaño de la población celular en el momento de la inducción con galactosa sobre la actividad de la proteína Vpr.....	68
Figura 11: Influencia del tamaño de la población celular en el momento de la inducción con galactosa sobre la actividad de la proteína Vpu.....	69
Figura 12: Comparación del efecto de la proteína Vpu en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes estados de crecimiento.....	71
Figura 13: Influencia del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de levadura.....	73
Figura 14: Síntesis de la proteína Vpu en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> realizados a distintos pHs.....	75
Figura 15: Influencia del ión K ⁺ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de levadura.....	76
Figura 16: Síntesis de la proteína Vpu en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crecidos con distintas cantidades de K ⁺	78

Figura 17: Efecto de la adición de 5-(N,N-hexametilen)-amilorida al medio de cultivo, sobre el crecimiento de la cepa silvestre	79
Figura 18: Influencia de la adenina sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
Figura 19: Crecimiento de la cepa $\Delta trk1,2$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , transformada con los plásmidos pEMBLyex4 (control) o pEMBLyex4vpu (Vpu), en medio con glucosa y en medio con galactosa.....	83
Figura 20: Detección de la proteína Vpu en cultivos la cepa $\Delta trk1,2$, transformada con pEMBLyex4 o pEMBLyex4vpu.....	84
Figura 21: Influencia del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	85
Figura 22: Influencia del ión K^+ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
Figura 23: Efecto del ión NH_4^+ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	89
Figura 24: Influencia de la adenina sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
Figura 25: Efecto de la adición de 5-(N,N-hexametilen)-amilorida al medio de cultivo, sobre el crecimiento de la cepa mutante.	92
Figura 26: Sensibilidad de la cepa mutante a concentraciones crecientes de higromicina B	95
Figura 27: Modelo propuesto para la actividad de la proteína Vpu durante la salida del virus, mediante modificación del transporte de K^+ a través de la membrana de la célula infectada	107

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
Tabla I: Utilidades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en estudios de virología	27
Tabla II: Composición química de los medios empleados para el cultivo de levaduras	40

RESUMEN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) codifica para las proteínas Nef, Vif, Vpr y Vpu, denominadas accesorias, cuya función principal es incrementar la infectividad del virus. Los estudios realizados *in vivo* demuestran que estas proteínas pueden cambiar el curso y severidad de una infección viral. El interés creciente por las proteínas accesorias como dianas terapéuticas, en la lucha frente al VIH, hace necesario aumentar el conocimiento sobre su mecanismo de acción. Un buen modelo biológico para realizar estos estudios es la expresión individualizada de estas proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*. Decidimos expresar en esta levadura dos de las proteínas accesorias del VIH-1, Vpu y Vpr. Seleccionamos la proteína Vpu para estudiar su funcionalidad en este sistema celular. La proteína Vpr fue elegida como control de funcionamiento del sistema de expresión, por ser la proteína accesoria con mayor citopatogenicidad. Para alcanzar este objetivo se utilizaron dos cepas de *S. cerevisiae*, la cepa silvestre W303-1B y el mutante deficiente en el transporte de potasio, W Δ 3, útil para el estudio de canales iónicos.

En este trabajo hemos logrado reproducir, en cultivos de *S. cerevisiae*, la actividad citotóxica de la proteína viral Vpr. La actividad de esta proteína viral provoca un retraso en el crecimiento de los cultivos celulares que es detectable tanto cuantitativa como cualitativamente. También es detectable la actividad de la proteína Vpu, por cambios en el fenotipo de crecimiento de la levadura. Vpu induce crecimiento lento en la cepa silvestre y rápido en la cepa mutante. La proteína Vpu facilita la liberación de las partículas virales mediante un mecanismo molecular aún desconocido. Son varias las hipótesis para explicar este mecanismo: la proteína Vpu podría contrarrestar un factor celular que impide la salida de viriones, podría funcionar como canal iónico o bien podría interaccionar con otros canales iónicos de la célula, lo cual conduciría a la desestabilización de la estructura de la membrana celular permitiendo la salida de viriones. Hemos analizado la funcionalidad de la proteína Vpu modificando las condiciones iónicas, de nutrientes y de pH de los cultivos. En ambas cepas detectamos aumento de la actividad proteica cuando el pH del medio era 7,0.

También detectamos que la concentración de ión K^+ en el medio de cultivo afecta a la actividad de la proteína viral. Cuando su concentración aumenta, la actividad de Vpu disminuye en la cepa silvestre y es más fuerte y persistente en el tiempo en la cepa mutante. Pensamos que la proteína Vpu podría despolarizar la membrana de *S. cerevisiae*. Así, en la cepa silvestre se produciría la pérdida de K^+ intracelular, explicando el retraso del crecimiento celular a concentraciones extracelulares bajas del ión. En la cepa mutante, que tiene la membrana plasmática hiperpolarizada, Vpu podría regenerar el potencial de ésta, facilitando la entrada de K^+ extracelular y produciendo la mejora del crecimiento de los cultivos. Además, observamos que en la cepa silvestre la actividad de la proteína es más evidente en condiciones óptimas, para el crecimiento celular, de concentración de nutrientes. Por el contrario, en la cepa WΔ3 la proteína Vpu es más activa en condiciones deficitarias de nutrientes. El aumento de la entrada de K^+ en la célula, como consecuencia de su transporte por parte de algunas proteínas transportadoras de nutrientes, podría ser la explicación de este comportamiento. Como consecuencia, la actividad de la proteína Vpu resultaría redundante en estas condiciones y por ello no sería detectada.

Hemos comprobado que el HMA, un derivado de la amilorida que actúa como inhibidor de canales iónicos, revierte la actividad de la proteína Vpu en ambas cepas de levadura. Además, observamos que la proteína viral Vpu protege a las células de la cepa WΔ3 de su hipersensibilidad a la higromicina B.

Nuestros resultados muestran que la actividad de la proteína Vpu altera el transporte iónico a través de la membrana de *S. cerevisiae*, disminuyendo, probablemente, el potencial de la membrana citoplasmática. Este mecanismo que nosotros hemos caracterizado en la levadura, podría ser responsable de desestabilizar la estructura de la membrana de la célula infectada, facilitando, finalmente la salida de los viriones. Además, hemos demostrado que la utilización de la levadura, como modelo para expresar la proteína Vpu, es útil para la búsqueda selectiva de inhibidores de esta proteína retroviral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

En 1983 se aisló y caracterizó por primera vez el agente causal del SIDA, un retrovirus al que en un primer momento se denominó Virus Asociado a Linfopatías (LAV) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Este virus, también denominado Virus de la Leucemia Humana de células T tipo III (HTLVIII), finalmente pasó a denominarse Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. La característica principal de esta familia es que la información genética contenida en el interior del virión, en forma de ARN, es copiada a una molécula de ADN mediante el mecanismo de retrotranscripción. Todos los retrovirus incluidos en el género *Lentivirus* producen enfermedades de lenta evolución. Sólo dos especies de *Lentivirus* pueden infectar a humanos, el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2). El VIH-1 es la especie responsable de la pandemia, siendo la especie mayoritaria en Asia, Europa, América y varias regiones de África, mientras que el VIH-2 es endémico de África occidental (Clavel *et al.*, 1986; Schim van der Loeff y Aaby, 1999). Ambos tipos de VIH producen SIDA en las personas infectadas, si bien el VIH-2 produce menor mortalidad ya que tiene menor patogenicidad y transmisibilidad que el VIH-1 (De Cock *et al.*, 1993; Popper *et al.*, 1999).

1.1.1. La estructura del virión

El virión maduro del VIH, de estructura esférica y unos 100 nm de diámetro, posee una envuelta lipídica que deriva de la membrana de la célula hospedadora. Esta envuelta está formada por una bicapa de fosfolípidos de estructura común a todas las membranas biológicas, que tiene asociadas las dos glicoproteínas virales: la proteína transmembrana (TM, gp41) y la proteína de la superficie (SU, gp120). La proteína gp41 forma trímeros y posee una región transmembrana que la ancla a la bicapa lipídica. Los trímeros gp41

interaccionan de manera no covalente con trímeros de proteína gp120 (Ozel *et al.*, 1988; Gelderblom, 1991). La proteína gp120 contiene los determinantes antigénicos más importantes del virus. En la envuelta viral también hay proteínas que provienen de la célula hospedadora, como antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y actina (Arthur *et al.*, 1992; Aloia *et al.*, 1993). Tanto la proteína gp120 como la proteína gp41 están implicadas en el reconocimiento del virus por la célula diana y en la fusión entre la envuelta viral y la membrana celular. Debajo de la envuelta está la matriz viral, formada por la proteína de la matriz (MA, p17). Por debajo de la matriz se localiza la cápsida, de forma cónica, formada por la proteína de la cápsida (CA, p24). En el interior de la cápsida se encuentra el material genético formado por dos cadenas de ARN sencillas de polaridad positiva y con idéntica información genética. Este ARN se encuentra estabilizado en forma de complejo ribonucleoproteico, junto con la proteína de la nucleocápsida (NC, p7) y las tres enzimas virales: proteasa, retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN). Además, interaccionando con el ARN hay moléculas de ARN_t^{Lys} de origen celular. La partícula vírica también empaqueta algunas de las proteínas accesorias del virus como Nef, Vif y Vpr (Turner y Summers, 1999).

1.1.2. El genoma viral

Cada molécula de ARN genómico, de 9,8 Kb, tiene una estructura cap en su extremo 5' y una secuencia poliA en su extremo 3'. El genoma viral contiene tres tipos de genes: estructurales, reguladores y accesorios (Fig. 1). Los genes estructurales son *gag*, *pol*, *env*, y codifican para las proteínas estructurales del virión y para las enzimas víricas. Al igual que en otros retrovirus, los productos de traducción iniciales de estos genes son precursores poliproteicos, los cuales, tras ser procesados por proteasas virales o celulares, dan lugar a las proteínas maduras. El gen *gag* es traducido en un precursor Pr55^{Gag} que es escindido en las proteínas MA, CA, NC y p6. El gen *gagpol* es traducido en una

poliproteína denominada Pr160^{Gag-Pol} que tras ser procesada origina la proteasa, RT e IN. El gen *env* es traducido en la poliproteína Env que es escindida en las proteínas TM y SU. Los genes reguladores, *tat* y *rev*, codifican para unas proteínas esenciales en la replicación viral: Tat y Rev. Los genes accesorios *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* codifican respectivamente para las proteínas Nef, Vif, Vpr y Vpu que condicionan la patogenia de la enfermedad. Parte de la secuencia de estos genes solapa con el final de *pol* y con *env*, pero sus ARNm se traducen en proteínas independientes (Gallo *et al.*, 1988; Greene, 1991).

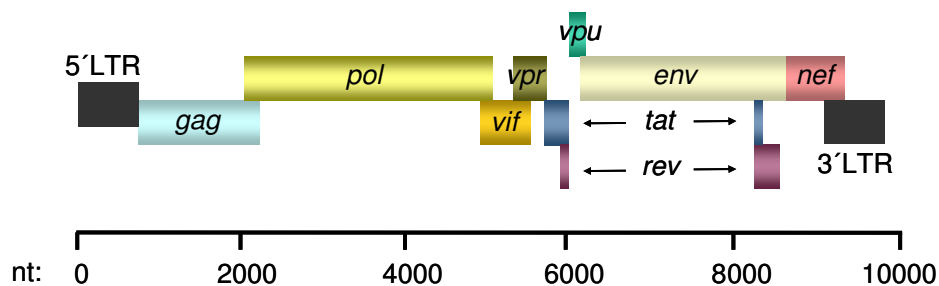


Figura 1: Organización genómica del ADN proviral del VIH-1. En recuadros coloreados se representan las distintas proteínas codificadas en el genoma.

1.1.3. El ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del VIH-1 se puede dividir en dos fases, temprana y tardía (Fig. 2) (González y Alcamí, 2006). La fase temprana comienza con la adsorción de las partículas virales a la célula diana por medio de la interacción entre la proteína viral gp120 y el receptor celular CD4 (Sattentau y Weiss, 1988; Bour *et al.*, 1995). Esto provoca un cambio conformacional en la proteína viral gp120 que induce su interacción con el correceptor celular correspondiente, CXCR4 o CCR5 (Choe *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Como consecuencia, la proteína gp41 sufre un cambio conformacional que conduce a

la fusión entre la envuelta viral y la membrana celular (Freed *et al.*, 1990). Tras esta fusión, la nucleocápsida viral es liberada al citoplasma celular. En el citoplasma, la retrotranscripción del ARN viral produce un ADN bicatenario con las denominadas secuencias LTR (*long terminal repeats*) en cada extremo (Baltimore, 1970). Para este proceso es imprescindible la retrotranscriptasa viral y los ARN^{t_{lys}}, que van empaquetados en la partícula viral y actuarán como cebadores durante el proceso de retrotranscripción. Este ADN bicatenario, junto con la proteína celular HMG I(Y) y las proteínas virales, RT, IN, MA y Vpr, forma un complejo núcleo-proteico denominado complejo de preintegración (PIC) que es transportado al núcleo celular (Farnet y Haseltine, 1991; Farnet y Bushman, 1997; Miller *et al.*, 1997). Una vez en el núcleo, el ADN proviral es integrado por la integrasa viral en el ADN de la célula infectada donde permanece en estado de latencia (Fujiwara y Mizuuchi, 1988; Roth *et al.*, 1989). Determinados factores celulares y virales desencadenan la transcripción del ADN proviral integrado, comenzando así la fase tardía del ciclo biológico del VIH. La transcripción es llevada a cabo por la proteína celular ARN polimerasa II que, junto con las proteínas celulares NF-κB y SP1 y la proteína retroviral Tat, asegura la producción de elevados niveles de ARNm. Inicialmente, en el citoplasma aparecen moléculas de ARNm que han sufrido un procesamiento total y que darán lugar a las proteínas Nef, Tat y Rev. Posteriormente aparecen hebras de ARNm sin procesamiento, o con procesamiento parcial, que necesitan la ayuda de la proteína viral Rev para ser transportadas del núcleo al citoplasma (Neumann *et al.*, 1994). Asimismo, la proteína Rev facilitará la traducción de estos mensajeros dando lugar a las poliproteínas Gag y Gag-Pol y a la poliproteína Env (Perales *et al.*, 2005). Estas proteínas virales sintetizadas en el citoplasma y en el retículo endoplásmico respectivamente, se dirigen hacia la membrana celular y se concentran en su cara interior. El ensamblaje de las proteínas virales en la membrana origina la encapsidación de dos moléculas de ARN sin procesar que contienen el genoma viral. Finalmente la partícula viral sale de la célula por gemación a través de la membrana celular, proceso durante el cual adquiere la envuelta. En el exterior de la célula, la proteasa viral da lugar a la maduración del virión, mediante el procesamiento proteolítico de las poliproteínas Gag y Gag-Pol.

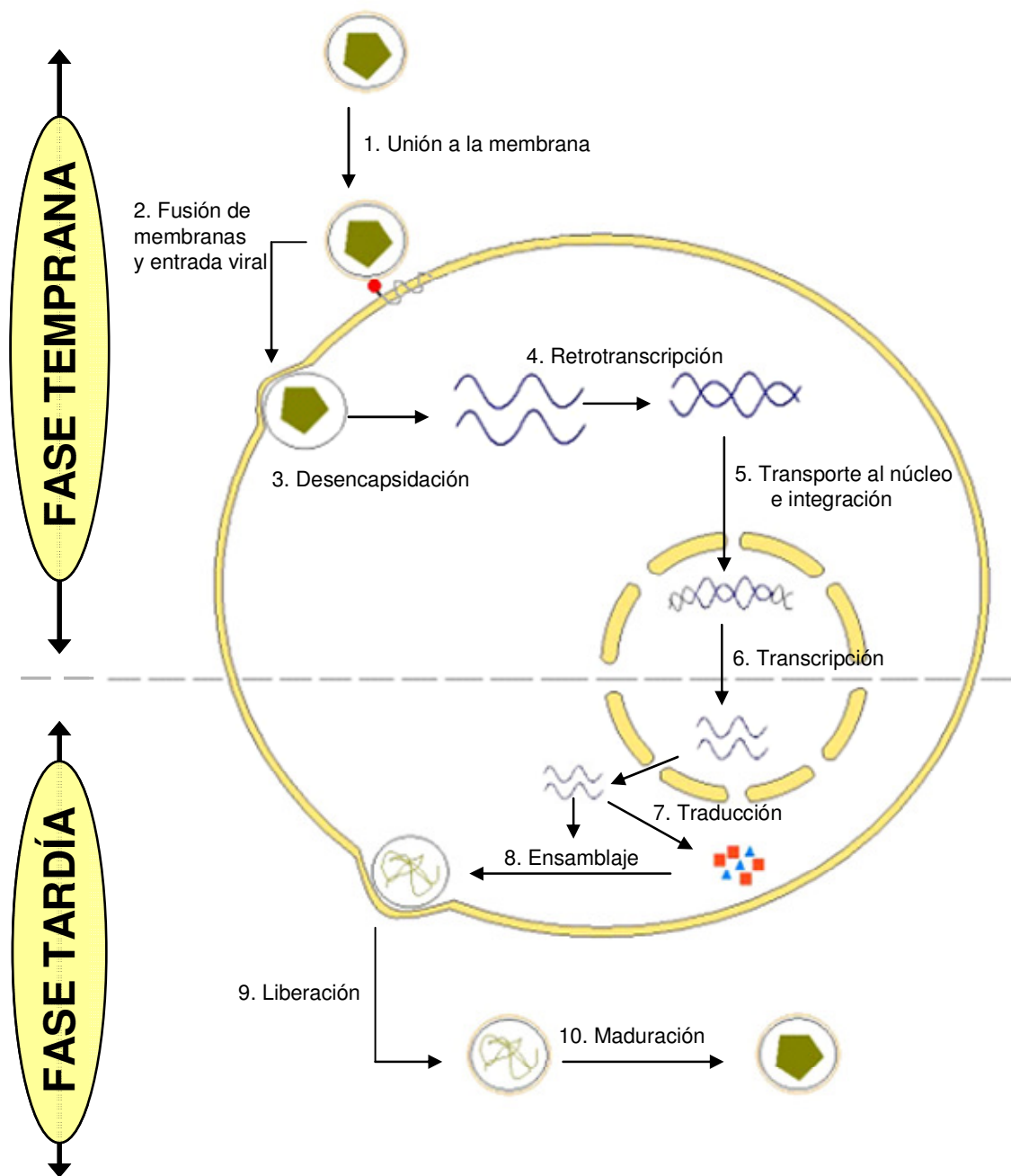


Figura 2: Ciclo biológico del VIH-1.

1.1.4. Terapia de la infección por el VIH

Inmediatamente después del aislamiento e identificación del virus, comenzó la búsqueda de agentes antirretrovirales capaces de controlar la infección por el VIH-1. En 1987 se aprobó el primer compuesto para su uso en humanos, la azidotimidina (AZT), dirigido contra la retrotranscriptasa viral. Diez años más tarde apareció el primer inhibidor de la proteasa viral, el Saquinavir. A principios del año 2000 se aprobó el Enfuvirtide o T-20, primer medicamento dirigido contra el proceso de fusión entre la membrana celular y la envuelta vírica (Fung y Guo, 2004; Manfredi y Sabbatani, 2006). En 2007 la FDA aprobó el raltegravir, primer fármaco dirigido frente a la integrasa viral, (<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm124040.htm>). La actual terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) utiliza combinaciones de fármacos y consigue suprimir al máximo la replicación viral durante un largo periodo de tiempo (Hammer *et al.*, 2006). Sin embargo, con el tiempo aparecen formas resistentes del virus como consecuencia de su elevada tasa de mutación (Wong *et al.*, 1997; Sharkey *et al.*, 2000). Este fracaso terapéutico termina conduciendo a la muerte del paciente.

Actualmente se encuentran en fase de desarrollo una nueva familia de inhibidores dirigidos contra el correceptor CCR5, que impiden su unión a la glicoproteína viral (<http://www.aidsinfo.nih.gov/infoSIDA/>). Estudios realizados *in vivo* han demostrado que las proteínas accesorias pueden cambiar el curso y severidad de una infección viral (Bour y Strebel, 2000). Esto convierte a las proteínas accesorias en posibles dianas terapéuticas y hace más interesante y necesario su estudio.

1.2. LAS PROTEÍNAS ACCESORIAS DEL VIH-1

Las proteínas Nef, Vif, Vpr y Vpu se definieron inicialmente como accesorias o auxiliares porque *in vitro* parecían ser innecesarias para la replicación viral. Actualmente se reconoce la importancia de estas proteínas no sólo en la virulencia de la enfermedad, sino que juegan un importante papel en la interacción entre el virus y la célula hospedadora (Trono, 1998).

1.2.1. La proteína Nef y la proteína Vif

La proteína Nef es una proteína de 206 aminoácidos sintetizada en etapas tempranas del ciclo de vida del virus (Klotman *et al.*, 1991; Munis *et al.*, 1992). Esta proteína viral produce un aumento en la infectividad viral (Chowers *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). Nef interacciona con algunas proteínas de membrana celulares y reduce su presencia en la superficie del linfocito. Interacciona con receptores CD4 (Goldsmith *et al.*, 1995), MHC-I (Schwartz *et al.*, 1996), MHC-II (Schindler *et al.*, 2003), CXCR4 (Hrecka *et al.*, 2005; Venzke *et al.*, 2006), CCR5 (Michel *et al.*, 2005), CD8 (Stove *et al.*, 2005) y CD28 (Swigut *et al.*, 2001). Además, Nef interacciona con serintreoninas y tirosinquinazas celulares, componentes de la cascada de señalización celular en la activación de linfocitos T (Baur *et al.*, 1997) y estimula las etapas de la fase temprana del ciclo viral (Aiken y Trono, 1995; Schwartz *et al.*, 1995).

La proteína Vif, de 192 aminoácidos, es sintetizada en la fase tardía del ciclo viral (Schwartz *et al.*, 1991). La capacidad infectiva del virus depende, en algunos tipos celulares, de esta proteína, (Fisher *et al.*, 1987; Sakai *et al.*, 1993). Los factores celulares APOBEC3G ó APOBEC3F están implicado en su mecanismo de acción (Sheehy *et al.*, 2002; Mbisa JL *et al.*, 2010). La proteína Vif impide la inhibición viral producida por dichos factores celulares mediante la ubiquitinación y posterior degradación del factor (Marin *et al.*, 2003; Sheehy *et*

al., 2003; Nagao *et al.*, 2010). La proteína Vif se incorpora en bajos niveles a las partículas virales recién sintetizadas, unida al ARN viral (Khan *et al.*, 2001; Henriot *et al.*, 2005; Bernacchi *et al.*, 2007). Como resultado de esta unión, Vif es un componente del complejo de retrotranscripción en las células infectadas (Carr *et al.*, 2008), provoca la estimulación de la actividad catalítica de la retrotranscriptasa y facilita el inicio de la retrotranscripción (Cancio *et al.*, 2004; Kataropoulou *et al.*, 2009). Además, la proteína Vif interviene en la incorporación de Env a los viriones emergentes (Sakai *et al.*, 1993).

1.2.2. La proteína Vpr

La proteína viral R (Vpr) es codificada por el genoma de los virus VIH-1, VIH-2 y SIV. Esta proteína básica, de 96 aminoácidos y 14 KDa, forma agregados cuando se encuentra en solución. Mediante RMN y utilizando un polipéptido soluble de dicha proteína, se ha logrado dilucidar que su estructura terciaria consta de tres α -hélices antipáticas formadas por los residuos 17-33, 38-50 y 55-77 (Fig. 3) (Morellet *et al.*, 2003). Las tres hélices, conectadas por bucles, están plegadas en torno a un núcleo hidrofóbico. La proteína Vpr es imprescindible para la replicación y patogénesis del virus *in vivo* (Goh *et al.*, 1998). Vpr se empaqueta dentro de los viriones y también se encuentra en forma soluble en el suero de pacientes (Cohen *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1994).

El VIH-1 al igual que los onco-retrovirus infecta células en división, sin embargo, también es capaz de infectar células que no están en división, como los macrófagos completamente diferenciados (Heinzinger *et al.*, 1994). Esta particularidad del VIH-1 se debe a la proteína Vpr que, gracias a su carácter nucleofílico, puede acceder al núcleo. La proteína Vpr es la responsable de transportar el PIC desde el citoplasma hasta el núcleo celular y de, una vez en el núcleo, inducir la parada del ciclo celular en la fase G2/M (Jowett JB, 1995; Vodicka *et al.*, 1998). Esto lo logra por medio de la interacción con dos proteínas celulares: la quinasa Wee1, que inhibe la entrada en mitosis de la

célula y la fosfatasa Cdc25C, que pone en marcha el proceso de mitosis (Elder *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2004). Además, Vpr provoca alteraciones transitorias en la integridad de la membrana nuclear (de Noronha *et al.*, 2001). La parada del ciclo celular supone una ventaja selectiva para el virus, ya que los niveles de transcripción virales son mayores durante la fase celular G2 que durante G1 (Goh *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Además, esta proteína viral incrementa los niveles de transcritos *nef* a partir del LTR del ADN viral no integrado, permitiendo la síntesis eficiente de la proteína Nef incluso en virus defectivos en integrasa (Poon *et al.*, 2007).

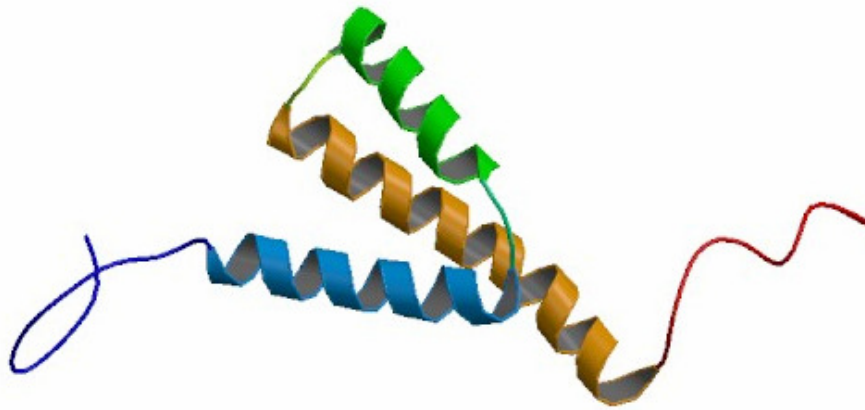


Figura 3: Estructura de la proteína Vpr del VIH-1. Modelo obtenido de los datos de RMN. Las tres α -hélices (17-33, 38-50 y 54-77) se muestran en color azul, verde y naranja respectivamente. (Adaptado de Morellet *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que la proteína Vpr del VIH-1 es capaz de inducir la apoptosis celular (Conti *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2008). Algunos estudios han demostrado la interacción entre esta proteína y la proteína ANT de la membrana mitocondrial interna. Esto conlleva a la formación de canales iónicos en la membrana a través de los cuales se

produce la liberación del citocromo c (Jacotot *et al.*, 2000; Jacotot *et al.*, 2001). El citocromo c liberado se uniría a proteínas activadoras de la cascada apoptótica, como la Apaf-1, y desencadenaría la cascada de activación de las caspasas y la apoptosis (Muthumani *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005).

La proteína Vpr juega un papel importante en la patogenicidad del SIDA, suprime la respuesta inmune mediada por linfocitos T_{CD4} y T_{CD8}, reduce la capacidad de los monocitos para madurar a células dendríticas y la producción de interferón gamma en células *natural killer* (Muthumani *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Majumder *et al.*, 2008). Además, la proteína presente en el suero de los individuos infectados por VIH-1 actúa como una virotoxina, puede entrar en células no infectadas e inducir su apoptosis u otros daños celulares que contribuirían a la neurotoxicidad y demencia producida por el virus (Patel *et al.*, 2000). También se ha demostrado que la proteína Vpr extracelular puede reactivar la producción viral en monocitos humanos con infección viral latente (Hoshino *et al.*, 2010).

1.2.3. La proteína Vpu

En el año 1988 se identificó una nueva proteína viral codificada en el genoma del VIH-1, que fue denominada Vpu (*Viral Protein Unknown*). Vpu es una proteína de unos 81 aminoácidos y un peso molecular de 16 KDa (Strebel *et al.*, 1998). En la célula infectada, esta proteína se acumula en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi e incluso en los endosomas implicados en el reciclado por endocitosis de las proteínas de membrana (Pacyniak *et al.*, 2005; Varthakavi *et al.*, 2006). También se ha visto que Vpu se localiza en la membrana celular, pero nunca es incorporada al interior de los viriones (González y Carrasco, 1998; Pacyniak *et al.*, 2005). Esta proteína codificada por el VIH-1 (Cohen *et al.*, 1988) también se ha encontrado en algunos virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) con los cuales el VIH comparte un ancestro:

SIV_{cpz} (Huet *et al.*, 1990), SIV_{gsn} (Courgnaud *et al.*, 2002), SIV_{mon} (Barlow *et al.*, 2003), SIV_{mus} (Courgnaud *et al.*, 2003), también en SIV_{den} (en este virus el gen es más corto, está cortado en su extremo C-terminal) (Dazza *et al.*, 2005) y en SIV_{gor} (Van Heuverswyn *et al.*, 2006). Los análisis de la secuencia de nucleótidos de los distintos genes *vpu* muestran que el gen *vpu* de SIV_{cpz} está filogenéticamente más relacionado con el gen *vpu* del VIH-1 que con los genes *vpu* de los demás SIV (Gómez *et al.*, 2005). El VIH de tipo 2 (VIH-2) y la mayoría de los SIV carecen del gen *vpu*. Sin embargo, la proteína de la envuelta del VIH-2 presenta una actividad similar a la de la proteína Vpu del VIH-1, estimulando la liberación de partículas virales recién formadas (Bour S, 1996; Ritter *et al.*, 1996; Noble *et al.*, 2006).

1.2.3.1. Estructura y funciones de la proteína Vpu

La proteína Vpu es una proteína integral de membrana de tipo I muy hidrofóbica, lo que dificulta su aislamiento. Por ello, la mayoría de los estudios sobre su estructura son simulaciones de ordenador o estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) que utilizan solamente uno de los dominios de dicha proteína. Esta proteína está formada por dos regiones, una región amino que se extiende aproximadamente del residuo 1 al 27 y contiene un elevado número de residuos hidrofóbicos (Park *et al.*, 2003), y una región carboxilo hidrofílica formada por los 54 residuos restantes (Fig. 4). Las simulaciones moleculares por ordenador sugieren que el dominio transmembrana forma oligómeros, concretamente un homopentámero dentro de la bicapa lipídica, posibilitando su actividad como canal iónico (Cordes *et al.*, 2001; Cordes *et al.*, 2002). La región carboxilo está formada por dos pequeñas α -hélices anfipáticas: la hélice 1, (32-51) se dispone paralela a la membrana (Willbold *et al.*, 1997) y la hélice 2 (57-70), de orientación desconocida, se dispondría lo más alejada posible de la bicapa lipídica (Bour y Strebel, 2003). Las regiones más variables de esta proteína son la región amino terminal (incluyendo la mayoría del fragmento transmembrana) y la región carboxilo terminal distal. La

región más conservada es la región situada entre la hélice 1 y la hélice 2, un bucle que contiene dos serinas fosforiladas, en las posiciones 52 y 56 (Schubert *et al.*, 1994). A la proteína Vpu se le han atribuido dos funciones dentro del ciclo replicativo del virus, cada una localizada en un dominio estructural distinto de la proteína y desarrollada en una localización celular diferente.

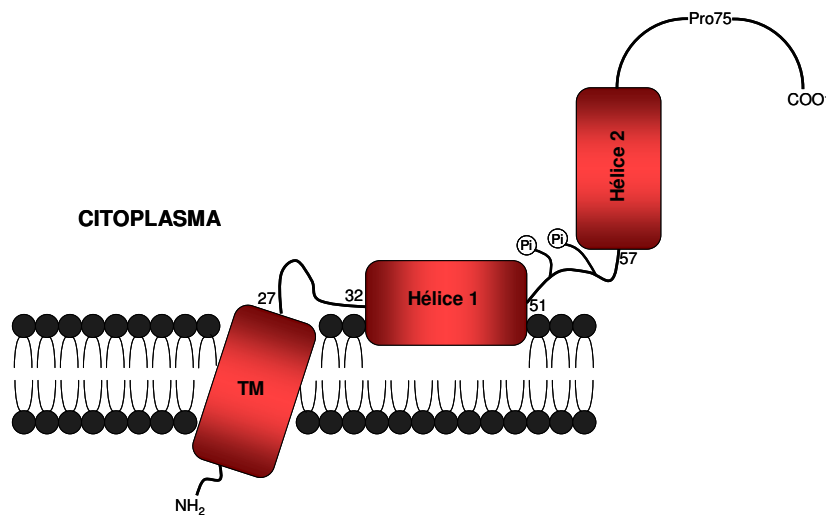


Figura 4: Estructura secundaria hipotética de la proteína Vpu del VIH-1. Modelo obtenido de los datos de RMN y modelado. La disposición de Vpu en la membrana podría verse alterada por su oligomerización o por la interacción con otros factores. (Adaptado de Bour y Strebel, 2003).

La región carboxilo interviene en la degradación del receptor celular CD4 de nueva síntesis (Willey, 1992a). El receptor CD4 y la proteína viral gp160 son sintetizados en el retículo endoplásmico, donde interaccionan formando complejos no funcionales CD4-gp160. La proteína Vpu, que también es sintetizada en el retículo endoplásmico, impide allí que el nuevo CD4 sintetizado interaccione con gp160 (Willey, 1992). Para ello la proteína Vpu interacciona con la proteína β -TrCP generando un complejo ternario CD4-Vpu- β -TrCP. Esta proteína β -TrCP recluta a su vez a otros componentes del

complejo de las ligasa ubiquitina E3 (las proteínas SKp1 y culina 1), que provocan la ubiquitinación del receptor CD4 y su posterior degradación siguiendo la ruta del proteasoma (Margottin *et al.*, 1998). De esta manera, la proteína Vpu permite que la proteína viral gp160 reanude su transporte hacia la superficie celular. Las dos α -hélices de la región carboxilo de la proteína Vpu son importantes para la degradación del receptor celular CD4, pero solamente es requerida la primera para la unión entre la proteína Vpu y la proteína β -TrCP (Tiganos *et al.*, 1997). También son esenciales para esta función los dos residuos de serina tan conservados que posee esta proteína (Paul y Jabbar, 1997), puesto que la señal de reconocimiento de ligandos de la proteína β -TrCP es la fosforilación de uno o dos residuos de serina dentro de un motivo conservado DS^PGxxS^P (Wu *et al.*, 2003; Megy *et al.*, 2005; Evrard-Todeschi *et al.*, 2006). Sin embargo, estos residuos no son requeridos para la unión entre las proteínas Vpu y CD4, dado que mutantes de Vpu defectivos en fosforilación retienen la capacidad para interactuar con CD4 (Bour *et al.*, 1995). Recientemente también se ha comprobado que en la segunda α -hélice de esta proteína, los aminoácidos Leu₆₃ (en el subtipo B de VIH-1), otros similares en otros subtipos y Val₆₈ (en el subtipo B) son imprescindibles para la disminución del receptor CD4 (Hill *et al.*, 2010). Otros estudios han mostrado que el tráfico y la maduración de otras proteínas de membrana, como MHC-I y glicoproteínas del virus Sindbis resultan alterados por la presencia de Vpu en la célula (Kerkau *et al.*, 1997; González y Carrasco, 2001).

La región transmembrana de la proteína Vpu está relacionada con la salida de los viriones de nueva síntesis de las células infectadas. Se ha demostrado que los viriones desprovistos de la proteína Vpu quedan anclados en la membrana celular (Klimkait *et al.*, 1990). También que la proteína Vpu del VIH-1 puede incrementar la liberación celular de otros retrovirus que no poseen gen *vpu* como Visna virus y VIH-2 (Göttlinger *et al.*, 1993) o complementar la actividad de proteínas equivalentes en mutantes de otros virus como el virus Sindbis (González y Carrasco, 2001). Incluso se ha visto que esta actividad de la proteína desaparece cuando se altera la secuencia de aminoácidos de su región transmembrana (Schubert *et al.*, 1996). El mecanismo molecular por el

cual se lleva a cabo esta función aún permanece desconocido, aunque existen varias teorías al respecto. Hay estudios que apuntan a que la presencia de la proteína Vpu en la membrana celular provocaría una desestabilización en su estructura, siendo ésta la causa de la salida de los nuevos viriones. Las primeras evidencias de que la proteína Vpu podía formar un canal iónico surgieron de estudios que mostraron que la expresión de esta proteína en bicapas lipídicas y en oocitos de *Xenopus* producía una conductancia que era débilmente selectiva para cationes (Ewart *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1996). También se ha demostrado que la expresión de la proteína Vpu en *Escherichia coli* y en células COS produce un incremento de la permeabilidad celular a ciertas moléculas como higromicina B, ONPG o uridina (González y Carrasco, 1998). Incluso se ha comprobado que la actividad de la proteína como canal iónico y el incremento en la liberación de partículas virales inducido por Vpu desaparece tras un tratamiento con 5-(N,N-dimetil)-amilorida (DMA) y en mayor medida con 5-(N,N-hexametilen)-amilorida (HMA), dos derivados de un compuesto que bloquea canales iónicos, la amilorida (Ewart *et al.*, 2002). Estos hechos podrían indicar que la proteína Vpu formaría poros en la membrana celular que permitirían la liberación de los viriones en la célula infectada (González y Carrasco, 2003; Mehnert *et al.*, 2007).

1.2.3.2. Interacción de la proteína Vpu con factores celulares

Se ha demostrado que la proteína Vpu incrementa la liberación de viriones de una manera dependiente del tipo celular (Sakai *et al.*, 1995). Hay líneas celulares consideradas permisivas (COS y 293T) en las que la liberación de partículas virales es independiente de la síntesis de la proteína Vpu. Por el contrario, en otras líneas celulares restrictivas (Hela, linfocitos T CD4⁺ y macrófagos) la liberación eficiente de partículas virales requiere la actividad de la proteína Vpu (Göttlinger *et al.*, 1993; Varthakavi *et al.*, 2003). Estos fenómenos sugieren que la proteína Vpu contrarrestaría un factor celular, presente en las células humanas pero no en las simias, cuya función sería la

de evitar la salida de los viriones de nueva síntesis. Hoy en día se han identificado algunos factores celulares que podrían estar implicados en la retención viral. La proteína TASK-1 es un canal de potasio expresado en células de mamífero. Estudios realizados *in vitro* muestran que, cuando es coexpresado con la proteína Vpu se produce la anulación de la actividad de ambas. Vpu inhibe la capacidad como canal iónico de la proteína TASK y ésta, a su vez, suprime la liberación de partículas virales mediada por Vpu (Hsu *et al.*, 2004; Strebel, 2004).

Recientemente se ha identificado una proteína de membrana, inducible por interferón, que podría estar relacionada con la liberación de viriones dependiente de Vpu: BST-2/CD317/Teterina. Esta proteína se localiza dentro de dominios lipídicos con una composición enriquecida en colesterol, en los cuales el VIH-1 y otros virus con envuelta emergen de la célula infectada (Nguyen y Hildreth, 2000; Ono y Freed, 2001; Kupzig *et al.*, 2003). La proteína BST-2 se localiza en los mismos compartimentos celulares que la proteína viral Vpu: en la membrana plasmática, en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Cuando la proteína viral Vpu no se sintetiza, las partículas virales recién formadas quedan retenidas en la membrana celular asociadas a la proteína BST-2, no pudiendo salir de la célula (Kupzig *et al.*, 2003; Neil *et al.*, 2008; Dubé *et al.*, 2009). Estas partículas virales retenidas no se acumulan en exceso en la membrana celular, lo que sugiere que son destruidas a una velocidad similar a la de su síntesis, probablemente por un mecanismo de endocitosis seguido de una degradación (McNatt *et al.*, 2009). Estudios recientes con células Hela indican que la proteína BST-2 sería incorporada al interior de la partícula viral y podrían formarse dímeros entre las proteínas incorporadas al virión y las localizadas en la membrana celular, dando lugar a la retención viral (Fitzpatrick *et al.*, 2010). Vpu facilita la degradación de la proteína BST-2 evitando la retención viral inducida por esta proteína celular. De hecho, se ha comprobado que algunos residuos de la región transmembrana de BST-2 son necesarios para su neutralización por Vpu (Gupta *et al.*, 2009; Dubé *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011), y que determinadas mutaciones en residuos del fragmento transmembrana de la

proteína Vpu alteran su capacidad para eliminar el factor BST-2 de la membrana celular (Lv *et al.*, 2011; Skasko *et al.*, 2011). También se ha visto que ambas proteínas interactúan físicamente a través de sus dominios transmembrana (Banning, 2010). Aún se desconoce si la degradación de la proteína BST-2 ocurre por la ruta del lisosoma o por la del proteasoma (Douglas *et al.*, 2009; Goffinet *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2009; Mangeat *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2009), pero se sabe que la proteína Vpu estimula la ubiquitinación de este factor por medio de la proteína β -TrCP del complejo de la ligasa ubiquitina E3 (Tokarev, 2011). La proteína BST-2 también es activa frente a otros virus con envuelta como el VIH-2 (Le Tortorec y Neil, 2009), el virus Ébola (Kaletsky *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010) los virus Lassa y Marburg (Sakuma *et al.*, 2009) y el herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (Mansouri *et al.*, 2009). Esto sugeriría que la proteína BST-2 constituye un mecanismo de defensa general de las células hospedadoras.

La proteína CAML (ligando de ciclofilina modulado por calcio) también se ha relacionado con el secuestro de los viriones de nueva síntesis en la membrana celular y, de nuevo, la proteína viral Vpu ha demostrado revertir dicho efecto (Varthakavi *et al.*, 2008). No se sabe cómo la proteína CAML retiene los viriones en la membrana celular, puesto que es una proteína localizada en el retículo endoplásmico y no en la membrana celular (Holloway y Bram, 1998).

1.3. LA PROTEÍNA VPU FORMA PARTE DE LA FAMILIA DE VIROPORINAS

La mayoría de los virus animales cuyo material genético es ARN, codifican en su genoma para unas proteínas con al menos un dominio transmembrana y con capacidad para alterar el transporte a través de la membrana celular. Estas proteínas, implicadas en la salida de viriones desde la

célula infectada, reciben el nombre de vioporinas (Carrasco, 1995). Las vioporinas muestran propiedades que son comunes a todas ellas, independientemente del virus al que pertenezcan. Son proteínas no glicosiladas, de pequeño tamaño (entre 50 y 120 aminoácidos) y altamente hidrofóbicas. Las vioporinas contienen uno o más dominios hidrofóbicos, formando α -hélices antipáticas mediante las que interaccionan con la membrana y un dominio de aminoácidos básicos o de aminoácidos aromáticos (González y Carrasco, 2003). Una vez insertadas en la membrana tienden a oligomerizar, creando así un poro hidrofílico en la membrana de la célula hospedadora (Agirre *et al.*, 2002; Melton *et al.*, 2002). Este poro sería responsable del aumento en la permeabilidad de la membrana celular producido por dichas proteínas (Aldabe *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1997; González y Carrasco, 1998; Sanz *et al.*, 2003). Esta desestabilización de la membrana celular finalmente conduciría la liberación de la progenie viral por la célula hospedadora.

La primera vioporina en la que se identificó actividad de canal iónico fue en la proteína M2 del virus influenza (Pinto *et al.*, 1992). Desde entonces se han descubierto otras vioporinas que también tienen dicha actividad, como la proteína Vpu del VIH-1 (Ewart *et al.*, 1996), la proteína 6K de los togavirus (Melton *et al.*, 2002), la proteína p7 del VHC (Griffin *et al.*, 2003), la proteína E de los coronavirus (Wilson *et al.*, 2004) la proteína SH del virus respiratorio sincitial humano (Gan *et al.*, 2008) y la proteína 2B de los picornavirus (Patargias *et al.*, 2009). La mayoría de las vioporinas no son imprescindibles para el ciclo vital del virus, pero facilitan la liberación de las partículas infecciosas y aumentan la patogenicidad del virus. Sin embargo, estudios recientes muestran que la proteína p7 del VHC es completamente imprescindible para la producción de nuevas partículas virales (Brohm *et al.*, 2009). Últimamente ha aumentado el interés por estas proteínas ya que muchos autores las consideran como prometedoras dianas para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales.

1.4. LA PROTEÍNA VPU COMO POSIBLE DIANA TERAPEÚTICA

La proteína Vpu y en general todas las viroporinas representan una atractiva diana para el desarrollo de inhibidores (González y Carrasco, 2005). El primer inhibidor descrito frente a una viroporina fue la amantadina (Hay, 1992). Posteriormente se encontraron derivados de la amilorida que eran capaces de bloquear la actividad de la proteína Vpu (Ewart *et al.*, 2002). La amilorida es una pirazinoylguanidina que inhibe el transporte del ión sodio a través de la membrana celular por medio del bloqueo de los canales de sodio (Bentley, 1968; Kleyman y Cragoe, 1988). La 5-(N,N-hexametilen)-amilorida (HMA) es un derivado de la amilorida, con actividad mucho mayor que ésta sobre los canales de sodio (Simchowicz y Cragoe, 1986). Este derivado de amilorida inhibe la actividad de diversas viroporinas. Cuando la poliproteína Gag se expresa en células Hela se induce la formación y liberación de seudopartículas virales (VLPs) al medio de cultivo. La coexpresión de las proteínas Gag y Vpu incrementa el proceso de liberación de seudopartículas (Göttlinger *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1998). Sin embargo, la liberación de VLPs de las células coexpresando la poliproteína Gag y la proteína Vpu es inhibida por la adición de HMA al medio de cultivo (Ewart *et al.*, 2002). En infecciones con el VIH-1 en monocitos de sangre humana, realizadas *in vitro*, se observó que la HMA y la 5-(N, N-dimetil)-amilorida (DMA), aunque ésta en menor medida, inhiben la replicación viral (Ewart *et al.*, 2004). Además, experimentos realizados en bicapas lipídicas, con péptidos correspondientes a la región amino de la proteína Vpu, indican que la HMA bloquea su actividad como canal iónico.

La metil éster anfotericina B (AME) es otro compuesto que inhibe la liberación de partículas virales del VIH-1 recién formadas. El AME es un derivado de la anfotericina B, un antifúngico con afinidad por los esteroides de las membranas celulares, incluido el colesterol. Estudios antiguos ya mostraban que, éste y otros derivados de la anfotericina B, inhibían la infección del VIH-1 *in vitro* (Schaffner *et al.*, 1986; Hansen *et al.*, 1990). Estudios más

recientes indican que el tratamiento con AME altera significativamente la morfología del virión. Su actividad se relaciona con la presencia de la proteína Vpu, puesto que este compuesto no es capaz de inhibir la liberación de viriones de nueva síntesis en virus VIH-1 y SIV defectivos en el gen *vpu*. El tratamiento con AME de células 293T que sobreexpresan la proteína celular BST-2, e infectadas con virus defectivos en el gen *vpu*, no afecta al secuestro de estas partículas virales por parte de la proteína BST-2. Pero cuando se coexpresan BST-2 y Vpu, el tratamiento con AME inhibe la liberación viral producida por Vpu. Esto sugiere que el AME reduce significativamente la capacidad de la proteína viral Vpu para contrarrestar la actividad de la proteína celular BST-2 (Waheed *et al.*, 2008).

Recientemente se ha encontrado un compuesto que inhibe la actividad de canal iónico de la proteína Vpu y tiene actividad antiviral para el VIH-1, el BIT225 (N-[5-(1-metil-1H-pirazol-4-yl)-naftalen-2-carbonil]-guanidina) (Khoury *et al.*, 2010). Cuando se expresa el fragmento transmembrana de la proteína Vpu en bicapas lipídicas, se detecta un potencial de membrana consecuencia de la proteína Vpu que desaparece con el tratamiento con BIT225. Además, en cultivos celulares infectados con el virus VIH-1, este compuesto ha logrado disminuir la liberación de nuevas partículas virales (Khoury *et al.*, 2010). Este compuesto también inhibe la actividad de canal iónico de la viroporina p7 del virus Hepatitis C (Luscombe *et al.*, 2010). Esta droga ha entrado en estudios clínicos para ser utilizada como inhibidor de VIH-1 y de VHC.

1.5. LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO SISTEMA BIOLÓGICO PARA ESTUDIOS DE PROTEÍNAS HETEROLOGAS

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ambiental común muy utilizado como modelo biológico en investigación. Su

velocidad de crecimiento es alta, su genética está bien caracterizada (su genoma está completamente secuenciado desde el año 1997), su cultivo es sencillo y no necesita medidas especiales de seguridad para su manipulación.

1.5.1. Utilización de *S. cerevisiae* en estudios de virología

Entre las ventajas de *Saccharomyces*, como sistema a utilizar en estudios de virología, destaca su capacidad para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales (como la miristilación, la acetilación de extremos amino terminales, y el procesamiento proteolítico) indispensables para la actividad de muchos productos proteicos. Además, el 30% de los genes implicados en enfermedades humanas tienen ortólogos en la levadura (Foury, 1997). Las posibilidades de manipulación genética del sistema también facilitan su utilización para la detección de dianas terapéuticas (Sturgeon *et al.*, 2006). Por todo ello, los estudios realizados en este sistema han sido muy útiles para el avance del conocimiento en Virología.

Las levaduras también son muy empleadas en el estudio de interacciones entre proteínas o proteína-ADN, utilizando la técnica *two hybrid system*. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido exitosamente utilizada como modelo eucariota para estudiar los efectos sobre la célula, la antigenicidad y la búsqueda de inhibidores de algunas proteínas virales. Esta levadura se utiliza en la producción de antígenos virales necesarios para la producción de vacunas. Finalmente, la producción de VLPs en levaduras se ha utilizado para estudiar la expresión y función de determinadas proteínas virales. Este tipo de estudios utilizando el sistema de *Saccharomyces* sido realizados con una gran variedad de virus (Tabla I).

Tipo de estudios	Virus	Proteínas	Referencia
Interacciones entre proteínas (<i>Two hybrid system</i>)	<i>Bunyamwera</i>	NSs /MED8	(Léonard <i>et al.</i> , 2006)
	VPH	E5/Bap31	(Regan y Laimins, 2008)
	VIH-1	Nef/CD4	(Rossi <i>et al.</i> , 1996)
	HCV	Vpr /14-3-3/Cdc25C	(Kino <i>et al.</i> , 2005)
		NS4A/NS2	(Flajolet <i>et al.</i> , 2000)
Vacunas recombinantes	VHB	HBsAg	(Valenzuela <i>et al.</i> , 1982; Garçon <i>et al.</i> , 2003)
Producción de VLPs para estudios serológicos y celulares	VPH	L1	(Patel <i>et al.</i> , 2009)
	VIH-1	Gag	(Sakuragi <i>et al.</i> , 2002)
	VIH-2	Gag	(Morikawa <i>et al.</i> , 2007)
	Poliomavirus ratón	VP1	(Adamec <i>et al.</i> , 2005)
Estudios fenotípicos de proteínas virales y búsqueda de inhibidores	<i>Influenza</i>	M2	(Kurtz <i>et al.</i> , 1995)
	Poliovirus	2BC	(Barco y Carrasco, 1998)
	VIH-1	Integrasa	(Parissi <i>et al.</i> , 2000; Desfarges <i>et al.</i> , 2009)
		Proteasa	(Blanco <i>et al.</i> , 2003; M'Barek NB, 2006)
		Gp160	(Yang <i>et al.</i> , 2009)
		Nef	(Plemenitas <i>et al.</i> , 1999; Triple <i>et al.</i> , 2006)
		Vpr	(Macreadie <i>et al.</i> , 1995; Yao <i>et al.</i> , 2002; Ong <i>et al.</i> , 2011)
		Vpu	(Meusser y Sommer, 2004)

Tabla I: Utilidades de *Saccharomyces cerevisiae* en estudios de virología.

Entre las proteínas del VIH-1 que han sido expresadas en levadura se encuentran las proteínas Vpr y Vpu. En este sistema se ha reproducido la actividad de ambas proteínas, obteniendo nuevos datos sobre su funcionalidad. Ensayos realizados con Vpr establecieron los aminoácidos de la proteína que son críticos para inhibir el crecimiento de la levadura (Macreadie *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2004; Nakazawa *et al.*, 2005). También se han buscado posibles inhibidores de la actividad de la proteína viral Vpr. Así se descubrió que la fumagilina y el vipirinin eran capaces de revertir la inhibición del crecimiento

celular que provocaba la proteína Vpr. Además, utilizando este sistema celular se ha logrado demostrar la interacción física entre la proteína viral Vpr y el inhibidor vopirin (Watanabe *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2011). Por otra parte, la degradación del CD4 por la proteína viral Vpu puede ser reconstituida en la levadura, mediante la coexpresión de Vpu y el receptor celular CD4 en este sistema. Estos ensayos han revelado que la fosforilación de la proteína Vpu no interviene en la unión entre esta proteína y el receptor celular CD4, aunque es imprescindible para su degradación. También han evidenciado que previamente a la proteólisis del receptor CD4, Vpu induce su ubiquitinación (Meusser y Sommer, 2004).

1.5.2. *S. cerevisiae* como modelo para el estudio funcional de canales iónicos

La homeostasis de la concentración celular de iones es una propiedad fundamental de las células vivas. Muchos parámetros fisiológicos importantes dependen de la concentración de los principales cationes monovalentes. La concentración de potasio determina algunos parámetros fisiológicos tan importantes como el volumen celular, el pH intracelular o la fuerza iónica. El potasio es el principal componente de las células vivas por lo que muchos microorganismos lo retienen de forma activa, para poder crecer y mantenerse vivos. Así, este ión se encuentra en el interior celular a concentraciones mucho mayores que las del ambiente extracelular (Rodríguez-Navarro, 2000). El umbral de toxicidad de otros cationes monovalentes como el sodio o el litio es mucho más bajo que el del potasio, por lo que las células evitan su acumulación en el citoplasma. Las células eucarióticas emplean el transporte activo primario (mediado por ATPasas) y el transporte secundario (mediado por canales y cotransportadores) para mantener altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio en su interior (Serrano, 1991).

En *Saccharomyces cerevisiae* el principal sistema de toma de potasio está codificado por los genes *trk1* y *trk2* (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994). El gen *trk1* codifica para la proteína TRK1 de 1.235 aminoácidos, con 12 dominios transmembrana (Durell y Guy, 1999). Esta proteína es un transportador de potasio de gran afinidad que permite el crecimiento celular a concentraciones micromolares de potasio en el medio (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). *trk1* fue el primer gen codificante de un transportador de potasio clonado en células eucariotas (Gaber *et al.*, 1988). Las proteínas TRK1 y TRK2 son idénticas en un 55% de su secuencia de aminoácidos; en los segmentos hidrofóbicos esta homología es aún mayor y puede alcanzar el 90%. Mutaciones en el gen *trk1* provocan un deterioro importante en el transporte de potasio y la incapacidad de crecimiento celular bajo condiciones limitantes de este catión (Ramos *et al.*, 1994). El papel del gen *trk2* solo parece ser importante en el mutante *trk1*, una mutación en el gen *trk2* produce un empeoramiento en los requerimientos de potasio de un mutante *trk1* (Ramos *et al.*, 1985; Ko *et al.*, 1990). Las células de levaduras $\Delta trk1 \Delta trk2$ son, por tanto, incapaces de crecer en medios con baja cantidad de potasio (menor de 10mM), pero pueden crecer en medios con altas concentraciones del mismo, gracias a la entrada inespecífica del potasio (Madrid *et al.*, 1998; Bihler *et al.*, 2002). En esta levadura, doble mutante, se han identificado otros transportadores de la membrana plasmática que contribuyen a la regulación de las concentraciones intracelulares de potasio, como el canal Tok1 (Bertl *et al.*, 1993; Maresova *et al.*, 2006). Este canal normalmente tiene una fuerte actividad de expulsión de potasio, pero se ha descrito que bajo ciertas condiciones también es capaz de mediar la toma de dicho ión (Fairman *et al.*, 1999). En condiciones específicas, el potasio puede ser sacado de las células de forma activa a través de las ATPasas Ena/Pmr2, o por el antiportador Nha1. Estos sistemas de regulación de potasio también son capaces de transportar otros cationes como sodio o litio (Haro *et al.*, 1991; Bañuelos *et al.*, 1998; Bañuelos *et al.*, 2002).

La toma y liberación de K^+ puede representar una válvula de seguridad para ajustar rápidamente el pH intracelular. Si éste disminuye, se acelera la

bomba de H⁺ y la toma de K⁺ hasta que vuelve a valores normales para la célula (Ryan y Ryan, 1972; Ramos *et al.*, 1990). La incorporación de K⁺ puede llevarse a cabo a través de un transporte simporte K⁺/H⁺, como en el caso de los *trk*, pero también de un transporte antiporte K⁺/H⁺ (Rodríguez-Navarro, 2000). Además, el doble mutante *trk1,2* puede realizar la incorporación de K⁺ a través del canal de baja afinidad NSC1 (Bertl *et al.*, 2003).

La delección de los genes *trk1* y *trk2* afecta a la membrana plasmática, provocando una hiperpolarización de la misma (Madrid *et al.*, 1998). Como consecuencia del defecto en el potencial de membrana que poseen, las células mutantes son mucho más sensibles al ión sodio, a los protones y a la higromicina B (Mulet *et al.*, 1999). Este cambio en el potencial de membrana de la membrana celular es el principal determinante de la toxicidad de los cationes del medio. Además, la delección del sistema principal de toma de potasio provoca la activación de otras rutas de baja afinidad para la toma del ión potasio (Wright *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 1998; Mulet *et al.*, 1999). Se ha propuesto que transportadores de azúcar o de aminoácidos podrían aceptar y transportar cationes, incluso pequeñas cantidades de K⁺, que mejorarían el crecimiento de las levaduras en situaciones limitantes de potasio en el exterior (Ko *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 1997).

El doble mutante $\Delta trk1 \Delta trk2$ de *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser útil en el estudio de canales iónicos de otros organismos, ya que permite discriminar la actividad de las proteínas heterólogas en ella expresadas, mediante ensayos de hipersensibilidad a drogas e iones (Mercier *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2006). Utilizando mutantes *trk1*, *trk2* se han expresado canales iónicos de plantas, como Kat1 de *Arabidopsis thaliana* (Anderson *et al.*, 1992), canales virales como el canal ATCV-1 Kcv del *Paramecium bursaria* *Chlorella* virus 1 (PBCV-1) (Gazzarrini *et al.*, 2009) e incluso de mamíferos, como los canales murinos mirK 2.1, EAG1, ENAC (Gupta y Canessa, 2000; Kolacna *et al.*, 2005; Schwarzer *et al.*, 2008) o las acuoporinas AQP (Pettersson *et al.*, 2006). La caracterización funcional de estos canales ha sido posible mediante el seguimiento del crecimiento de celular de los mutantes que expresaban dichos canales. Asimismo, la utilización de estos mutantes ha

permitido la identificación de nuevos inhibidores de algunos canales iónicos (Hasenbrink *et al.*, 2005; Chatelain *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Una de las proteínas accesorias del VIH-1, la proteína Vpu, facilita la salida de los viriones de nueva síntesis de la célula infectada mediante un mecanismo aún desconocido. Debido a la dificultad de manejo de la proteína completa, los estudios previos con esta proteína viral utilizaron solamente el fragmento transmembrana de Vpu. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* permite producir, de forma inducible, proteínas de estructura compleja e incluso con actividad citotóxica. En este modelo es posible analizar interacciones de proteínas heterólogas con la célula eucariota, tales como modificaciones de la permeabilidad celular, así como ensayar inhibidores selectivos frente a dichas proteínas.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Poner a punto las condiciones de manipulación de los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* para lograr una expresión eficiente de los genes accesorios retrovirales.
2. Caracterizar, en este sistema eucariótico, los efectos inducidos por el producto de uno de los genes accesorios del VIH-1, la proteína Vpu.
3. Caracterizar los efectos inducidos por la proteína Vpu en un mutante de levadura, deficiente en el transporte de potasio, que permite la detección de canales iónicos expresados de forma heteróloga.
4. Estudiar el comportamiento de la proteína Vpu en presencia de posibles inhibidores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Bacterias

Para la amplificación y purificación de los plásmidos utilizados en este trabajo se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* [F⁻, recA1, hsdR17, (rK⁻, mK⁻), LacZY, argF, U169, supE44, thi1, gyrA96, relA1] (Hanahan, 1983).

3.1.2. Levaduras

Los experimentos de este trabajo se llevaron a cabo con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Una cepa silvestre, la W303-1B (MAT α , ade 2-1, leu 2-3, his 3-11, ura 3-1, trp 1-1, can^r 1-100), y la otra, el mutante W Δ 3 (MAT α , ade 2-1, leu 2-3, his 3-11, ura 3-1, trp 1-1, can^r 1-100, trk1::LEU2, trk2::HIS3) (Madrid *et al.*, 1998). La cepa *silvestre* permite detectar actividades citopatogénicas de proteínas heterólogas. La cepa mutante tiene alterado el transporte de potasio, lo que la convierte en un sistema adecuado para estudiar canales iónicos heterólogos.

3.2. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.2.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue el medio de Luria- Bertani (LB) (Sambrook y Russel, 2001) con un 1,5 % de agar (Difco)

para los cultivos en medio sólido. Cuando el medio se utilizó con ampicilina (Sigma), ésta se añadió a una concentración del 0,01 % (p/v).

Los medios de cultivo empleados para *S. cerevisiae* se muestran a continuación:

Medio	Utilización	Composición
YPD	Medio rico empleado para levaduras sin transformar	bactopeptona (Difco) 20 g/l extracto de levadura (Difco) 10 g/l glucosa (Panreac) 20 g/l adenina (Sigma) 40 mg/l
YNBGlu	Medio mínimo utilizado para la selección y el mantenimiento de los transformantes	YNB (Difco) 6.7 g/l glucosa (Panreac) 20 g/l leucina (Sigma) 20 mg/l (sólo cepa W303-1B) KCl 100 mM (Merck) (sólo cepa WΔ3)
YNBGlu	Medio mínimo para el crecimiento de transformantes sin inducir el promotor plasmídico	YNB (Difco) 6,7 g/l glucosa (Panreac) 20 g/l KCl 100 mM (sólo cepa WΔ3)
YNBGal	Medio mínimo utilizado para el crecimiento de los transformantes induciendo el promotor plasmídico	YNB (Difco) 6,7 g/l galactosa (Sigma) 20 g/l

Tabla II: Composición química de los medios empleados para el cultivo de levaduras.

Todos los medios mínimos fueron suplementados con los aminoácidos correspondientes dependiendo de las necesidades nutritivas de la cepa a utilizar. Los transformantes de la cepa W303-1B necesitan la adición de adenina 40 mg/l, histidina 20 mg/l y triptófano 20 mg/l. Los transformantes de la cepa WΔ3 sólo necesitan la adición de adenina 20 mg/l y triptófano 20 mg/l. Todos los aminoácidos fueron suministrados por Sigma. Cuando fue necesario ajustar el pH del medio, se utilizó arginina (Merck). Para la obtención de medio sólido se añadió agar al 1,5 % (Difco).

3.2.2. Conservación de los microorganismos

El mantenimiento a largo plazo de las células de levadura sin transformar se realizó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio líquido YPD que contenía glicerol al 20 %. Para la congelación celular, se partió de una colonia aislada en medio YPD sólido. A partir de la colonia, el cultivo se amplificó en 10 ml de YPD líquido, mediante incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación orbital durante una noche. El cultivo amplificado se refrescó diluyéndolo con medio nuevo, hasta lograr que la densidad óptica medida en longitud de onda 600 nm (DO_{600}) fuera 0,1. Para preparar este cultivo se calculó 20 ml de medio por vial a congelar. Cuando el cultivo alcanzó DO_{600} 1,5, se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min. El sedimento resultante se resuspendió en YPD con glicerol a razón de 1 ml por cada vial a congelar. Esta suspensión celular se alicuotó en criotubos que fueron congelados rápidamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las colonias de levadura transformantes, aisladas en medio de selección, se amplificaron en el mismo medio de selección mediante su siembra en forma de estría. Las placas de estas transformaciones y estrías se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, un tiempo máximo de 1 mes y de 1 semana respectivamente. Para la realización de los experimentos se seleccionaron parejas de transformantes (pEMBLyex4 y pEMBLyex4vpr, o pEMBLyex4 y pEMBLyex4vpu), con velocidades de crecimiento similares en medio no inductor.

3.3. TRANSFORMACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

3.3.1. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de la bacteria *E. coli* se realizó por el método de PHI-Broth, en el que las células adquieren el estado de competencia por medio de

un tratamiento químico con cloruro de calcio y de rubidio a elevada concentración. Para ello, lo primero fue hacer un aislamiento de colonias en medio LB sólido, a partir de un cultivo congelado y conservado en glicerol. Se seleccionó una colonia y se amplificó en medio LB líquido mediante incubación a 37 °C con agitación orbital durante una noche. El cultivo resultante se refrescó diluyéndolo en medio nuevo para continuar su crecimiento. Cuando el crecimiento del cultivo fresco alcanzó la fase exponencial temprana, se diluyó con un medio de cultivo que contenía sulfato de magnesio 0,4 % (p/v) y se dejó crecer hasta alcanzar nuevamente la fase exponencial. En ese momento se eliminó el medio mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y las células se lavaron con una solución salina pH 5,8 que contenía cloruro de rubidio 1,2 % (p/v), cloruro de manganeso 0,98 % (p/v), cloruro potásico 0,3 % (p/v) y cloruro de calcio 0,15 % (p/v). Finalmente las células competentes se resuspendieron en una solución salina con tampón MOPS 0,1 M pH 7,0 al 10 % (v/v), cloruro de rubidio 0,12 % (p/v), cloruro de calcio 0,83 % (p/v) y glicerol 15 % (v/v). La suspensión de células se alicuotó y las alicuotas se almacenaron congeladas a -80 °C.

Para la transformación se mezcló en frío una alícuota de bacterias competentes con el ADN deseado. Tras una incubación de 10 min en hielo, la mezcla se sometió a un choque térmico pasándola rápidamente a 37 °C y se incubó a esta temperatura y en agitación durante 5 min. Para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina, se añadieron 4 volúmenes de medio LB sobre las células ya transformadas y se incubaron a 37 °C en agitación durante 30 min. La selección de las bacterias que incorporaron el ADN se realizó extendiendo la mezcla anterior en LB sólido suplementado con ampicilina 0,01 % (p/v).

3.3.2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de la levadura *S. cerevisiae* con la construcción control pEMBLyex4 y con las construcciones pEMBLyex4*vpr* y pEMBLyex4*vpu* se realizó de manera rutinaria cada mes, utilizando el método del acetato de litio (Ito *et al.*, 1983). Siguiendo este método, a partir de un cultivo glicerolado se sembró en forma de estría una placa con medio YPD y se seleccionó una colonia perfectamente aislada. Esta colonia se creció en medio YPD líquido a 30 °C con agitación orbital de 300 rpm durante una noche. El cultivo resultante se refrescó en medio nuevo y se dejó crecer hasta alcanzar la fase exponencial de su crecimiento. A continuación el cultivo se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min, se eliminó el medio y las células se lavaron con acetato de litio 0,1 M (Sigma) en TE (pH 7,5). Finalmente las células se resuspendieron en un volumen 1/100 del volumen inicial de acetato de litio 0,1 M y se incubaron a 30 °C en agitación durante 1h, adquiriéndose durante este periodo de tiempo el estado de competencia. Estas células competentes se conservaron a 4 °C durante un máximo de 1 semana. Para la transformación se empleó 1 µg de ADN plasmídico y 50 µg de ADN transportador de timo de ternera (Sigma), por cada 100 µl de concentrado celular. La mezcla se incubó 30 min a 30 °C. Después se añadió polietilenglicol al 40 % (Sigma) para facilitar la unión del ADN a la pared celular y se realizó una nueva incubación a 30 °C en agitación de 1h de duración. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 5 min para facilitar la entrada del ADN. A continuación, el acetato de litio se eliminó mediante centrifugación. Las células se lavaron con TE (pH 7,5) y finalmente se resuspendieron en 100 µl de TE (pH 7,5). La selección de los transformantes se llevó a cabo sembrando estas células en YNBGlu sólido en ausencia de uracilo y con leucina en el caso de la cepa W303-1B, ya que el gen *Leu2d* tiene una expresión demasiado débil para permitir el crecimiento masivo de los transformantes.

3.4. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE *S.CEREVISIAE* Y *E. COLI*

3.4.1. Cultivos de bacterias

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C, con agitación continua en un agitador orbital si el medio LB era líquido y con ampicilina cuando ésta fue necesaria. La determinación del crecimiento de los cultivos se realizó valorando la turbidez de los mismos, por medio de la medida de DO₆₆₀, en un espectrofotómetro marca Genesys 10 VIS (Thermo Scientific).

3.4.2. Cultivos de levaduras

3.4.2.1. Preparación de inóculos para la inducción con galactosa

Todos los ensayos llevados a cabo se realizaron a partir de cultivos frescos de células que estaba en la fase exponencial temprana de su crecimiento (DO₆₀₀ 0,5 - 0,9). Estos cultivos se utilizaron como inóculo para la inducción con galactosa en los diferentes ensayos. El procedimiento para su obtención fue el siguiente. Las colonias de transformantes se amplificaron mediante la incubación en medio YNBGlu pH 6,5 a 30 °C y agitación orbital de 300 rpm, durante 24 – 27 h. El cultivo obtenido fue centrifugado a 2.000 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de glucosa, el sedimento fue lavado con agua mediante centrifugación a 2.000 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación las células fueron resuspendidas en agua y diluidas en medio mínimo con galactosa a la densidad adecuada para cada ensayo. La determinación del crecimiento de los cultivos se realizó valorando la turbidez de los mismos por medio de la medida

de DO_{600} , en un espectrofotómetro Genesys 10 VIS, en el rango de valores en el que existe linealidad entre la lectura de la DO y el número de células.

3.4.2.2. Cinéticas de crecimiento

Para estudiar la cinética de crecimiento de los cultivos, se partió de un número de células equivalente a una DO_{600} 0,005 en medio líquido inductor ($DO_{600} 1 = 3 \times 10^7$ ufc). Los cultivos fueron incubados a 30 °C y 300 rpm durante varios días, a lo largo de los cuales se fueron extrayendo muestras para determinar su crecimiento.

3.4.2.3. Tratamiento con higromicina B

Para la realización de las curvas de concentración de higromicina B, se preparó un inóculo como se ha descrito previamente. Una vez que el inóculo alcanzó la fase exponencial, se centrifugó y se diluyó hasta DO_{600} 0,003 en medio YNBGal pH 7,0 suplementado con 30 mM ó 100 mM KCl. Este inóculo se dividió en alícuotas de 2 ml y a cada una se le añadió higromicina B (Roche) a la concentración deseada. A continuación todas las alícuotas de cultivo fueron incubadas a 30 °C, en agitación orbital, hasta que los controles alcanzaron la fase exponencial de su crecimiento. En ese momento se midió la turbidez de los cultivos para determinar su crecimiento.

3.4.2.4. Tratamiento con 5-(N,N-hexametilen)-amilorida

La 5-(N,N-hexametilen)-amilorida (HMA) suministrada por Sigma, se resuspendió a una concentración 10 mM en Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma) y se conservó a -20 °C en oscuridad. El inóculo, obtenido como se describe previamente, se diluyó a DO_{600} 0,002. Esta suspensión celular se dividió en

alícuotas de 2 ml y a cada alícuota de cultivo se le añadió el volumen adecuado de la solución de HMA, hasta alcanzar la concentración deseada de la droga. Asimismo se prepararon alícuotas de cultivo a las que se les añadieron los mismos volúmenes de solvente. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C, en agitación orbital, hasta que los controles alcanzaron la fase exponencial de su crecimiento. Finalmente se midió la turbidez de los distintos cultivos para determinar su crecimiento.

3.4.2.5. Cultivo de levaduras en medio sólido

Para estudiar el crecimiento celular en medio sólido por diluciones seriadas, se preparó un inóculo de células como se indica en el punto 3.4.2.1. Dicho cultivo, tras ser centrifugado, lavado y resuspendido en agua, se utilizó para inocular el medio de cultivo (YNBGlu o YNBGal) a DO_{600} 0,4. A partir de esta dilución se realizaron varias diluciones seriadas en el medio de elección, con un factor de dilución 2. De cada dilución se sembraron 4 μ l en placas de YNBGal o YNBGlu pH 7,0 ajustado con Arg. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 6 días a lo largo de los cuales se observó el crecimiento celular y se plasmó en imágenes digitales con la ayuda de un escáner de la marca hp.

3.5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.5.1. Vector plasmídico

El vector plasmídico utilizado en este trabajo fue el plásmido de alto número de copias pEMBLyex4 (Cesareni y Murray, 1987) (Fig. 5). Este plásmido contiene un origen de replicación para *E. coli* (ORI) y un origen de replicación para *S. cerevisiae* (2 μ ORI), lo que hace que sea capaz de replicar

en ambos tipos de microorganismos. Contiene el gen *amp^r* que confiere resistencia al antibiótico ampicilina a las bacterias transformadas con él. También tiene el gen defectivo *Leu2d* y el gen *URA3*, que codifican para las enzimas implicadas en la ruta biosintética de la leucina y del uracilo respectivamente y que son usados como marcadores de selección de las levaduras transformadas. Este plásmido también contiene el promotor CYCGAL que se reprime en presencia de glucosa y se activa en presencia de galactosa, permitiendo la expresión del inserto en el momento deseado.

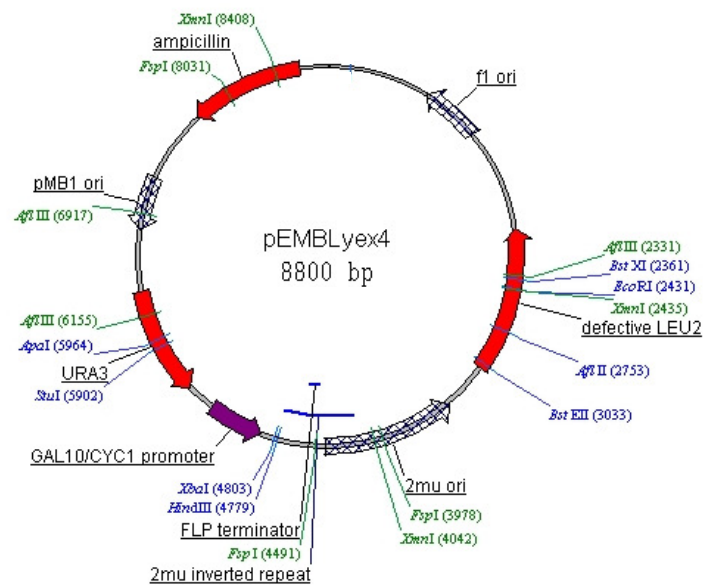


Figura 5: Vector plasmídico pEMBLyex4. (Adaptado de la *Belgian coordinated collections of microorganisms*.)

3.5.2. Enzimas

Todas las enzimas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y se utilizaron siguiendo las indicaciones del fabricante, en las soluciones salinas proporcionadas por el mismo. El fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*, utilizado para amplificar fragmentos de ADN mediante PCR, fue suministrado por New England Biolabs. Para las reacciones de ligación se utilizó la ADN ligasa del fago T4 de New England Biolabs.

3.5.3. Preparación y purificación de las construcciones plasmídicas

La construcción pEMBLyex4*vpu* fue obtenida previamente en nuestro laboratorio. La construcción pEMBLyex4*vpr* se obtuvo durante el desarrollo de este trabajo; mediante PCR se obtuvo el ADNc del gen *vpr*, a partir del plásmido pTM1*vpr*. Para ello primero se linealizó el plásmido que contenía el molde de la reacción de PCR, mediante digestión en un volumen de 20 µl, con la enzima de restricción *Nco*I. A continuación el ADN linearizado se purificó utilizando el kit comercial Wizard^R DNA Clean-up system de la casa comercial Promega, para eliminar la enzima de restricción y las sales del tampón de digestión. Para ello, la muestra se mezcló con 1ml de resina Clean-up, se mezcló y se añadió a una columna de purificación. Esta columna se sometió al vacío para que el ADN penetrase en ella y tras eliminar el eluido, el ADN se lavó con 2 ml de isopropanol utilizando vacío. Para secar la columna ésta se colocó sobre un tubo eppendorf y se realizó una centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min. A continuación la columna se colocó en un tubo eppendorf limpio, se le añadió 50 µl de agua destilada estéril y precalentada a 65 °C y, tras una incubación de 1 min, se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm para la elución del ADN. Este ADN se utilizó como molde para amplificar la secuencia del gen *vpr* en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987). Durante dicha reacción se introdujeron las dianas de restricción *Sma*I

(5') y *Bam*HI (3') en los extremos de la secuencia amplificada. En la PCR se emplearon como cebadores los oligonucleótidos OL-3 (TCCTCCCCCGGGATG GAACAAGCCCCA) y A-3 (GGGCCCGGATCCTACTAGGATCTACTGG) a una concentración 5 μ M. Las soluciones utilizadas durante la reacción (tampón de reacción, MgCl₂ 1,5 mM y dNTPs 0,2 mM) se adquirieron a Amershan Pharmacia. La reacción se llevó a cabo con 5 μ l del purificado anterior en un volumen final de 100 μ l, en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, INC). Tras la reacción, el producto de amplificación fue purificado con el kit comercial Wizard^R DNA Clean-up system como se ha indicado anteriormente. El fragmento purificado se digirió con las enzimas de restricción *Sma*I y *Bam*HI y después se aisló en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5 %. Se recortó el trozo de agarosa que contenía el fragmento de ADN de 290 pb, con un bisturí estéril y se introdujo en un tubo eppendorf. Sobre el recorte de gel se añadió 3 volúmenes de yoduro sódico 6 M (Sigma) y se calentó a 65 °C hasta que la agarosa se fundió. Se extrajo el fragmento de ADNc de la agarosa, utilizando el kit comercial Wizard^R DNA Clean-up system y finalmente se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril.

El plásmido pEMBlyex4 sufrió un proceso similar de corte con las enzimas de restricción *Sma*I y *Bam*HI, para conseguir extremos compatibles con el ADNc para la proteína Vpr. Esta digestión se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,7 %. El fragmento con un tamaño similar a 8,8 Kb fue cortado de dicho gel y purificado como se ha descrito previamente.

La reacción de ligación entre el ADNc del gen *vpr* y el plásmido pEMBlyex4 linealizado se llevó a cabo mezclando 5 μ l del ADNc que codifica para la proteína Vpr con 1 μ l del plásmido. Esta reacción fue catalizada por la enzima ADN ligasa del fago T4 en una incubación de 17 h a 16 °C.

Esta construcción se amplificó siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación y después se secuenció para comprobar su calidad. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos OL4 y OL8 (correspondientes a las regiones 5' y 3' flanqueantes al polilynker del plásmido), en una reacción de PCR, con el kit BigDye® Terminator v2.0 (PE Biosystems). Mediante este procedimiento, basado en el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) y

utilizando un secuenciador automático, se obtuvo la secuencia completa del gen amplificado y su posición en el plásmido.

3.5.4. Amplificación de las construcciones plasmídicas

Para aumentar el número de copias de las construcciones se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*. Esta cepa fue transformada con las construcciones plasmídicas (ver punto 3.3.1.). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar con ampicilina al 0,01 % (p/v). Se picaron varias colonias obtenidas durante la selección y se crecieron individualmente en 5 ml de medio líquido de LB suplementado con ampicilina 0,01 % (p/v). Estos minicultivos, después de incubarlos durante una noche a 37 °C en agitación, fueron lisados para extraer el plásmido del interior celular. Para ello, las células se sedimentaron mediante centrifugación. A continuación las células se lisaron utilizando una solución de lisis (NaOH 0,1 N (Merck), EDTA 0,01 M (Merck) y SDS 2 % (p/v) (Serva)) e incubándolas 2 min en agua hirviendo. Posteriormente se añadió 50 μ l de cloruro magnésico 1M y la mezcla se dejó incubar 2 min en hielo. Entonces la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min, se retiró el sobrenadante y el sedimento fue neutralizado con 50 μ l acetato potásico 5 M pH 4,8 (Merck). Tras 2 min de incubación en hielo, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. El ADN plasmídico disuelto en el sobrenadante fue precipitado mediante la adición de etanol 100 % y posterior centrifugación. El ADN precipitado se lavó con etanol 70 % y finalmente se resuspendió en agua que contenía RNAsa 0,1 mg/ml. Una vez extraídas las construcciones plasmídicas, se comprobó que éstas contenían el inserto, mediante digestión con las enzimas de restricción *Sma*I y *Hind*III. El producto de la digestión se analizó en un gel de agarosa al 1 %.

Los cultivos transformantes de *E. coli* en los que se había confirmado la presencia de inserto en el plásmido fueron amplificados a gran escala. La amplificación se realizó inoculando 500 ml de medio LB con ampicilina 0,01 % (p/v) con 1,5 ml del cultivo seleccionado. Las construcciones se extrajeron con

el kit comercial Quiagen^R Plasmid Maxi Kit de Quiagen, según las indicaciones del fabricante. Para ello, las células fueron sedimentadas mediante centrifugación a 6.000 rpm a 4 °C durante 15 min y posteriormente lisadas con SDS. Este lisado se trató con RNAsa A, para la degradación del ARN celular y se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C durante 30 min, para la eliminación de los restos celulares y del ADN genómico. El sobrenadante obtenido, conteniendo el ADN plasmídico, se cargó en una columna de cromatografía para purificar este ADN. Tras eluir el ADN en isopropanol, éste se rehidrató lavándolo con etanol al 70 % y finalmente se resuspendió en 500 µl de TE pH 8,0. El ADN así resuspendido fue conservado a -20 °C. Para calcular el rendimiento de la purificación, se cargó 1 µl de producto purificado en un gel de agarosa y se sometió a electroforesis. Mediante tinción con bromuro de etidio y bajo la luz ultravioleta se visualizó este producto.

3.5.5. Electroforesis en geles de agarosa

La separación e identificación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello se prepararon geles de agarosa (Gibco) de concentraciones que oscilaron entre 0.7 y 1,5 % según el tamaño de los fragmentos que se deseaba analizar. Las muestras se cargaron en *tampón de carga* (glicerol, 0,25 % de azul de bromofenol y 0,25 % de xileno-cianol). Junto a las muestras se cargó un marcador de peso molecular (1Kb DNA de Gibco), para la identificación de las bandas de interés. La electroforesis se desarrolló en *tampón TAE* (Tris 0,48 % (Sigma), ácido acético 0,11 % (Merck) y EDTA 1 mM (Merck)), a 80 V. Para la visualización del ADN, cada gel de agarosa fue posteriormente teñido con una solución que contenía bromuro de etidio a 10 mg/ml, desteñido con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio y fotografiado mientras era iluminado con un transiluminador de radiación UV.

3.6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.6.1. Obtención de extractos de proteína a partir de cultivos de *S. cerevisiae*

Las proteínas totales procedentes de cultivos de la levadura *S. cerevisiae* se obtuvieron cuando cada cultivo celular alcanzó DO_{600} 1,0. En ese momento se extrajo 1 ml de cultivo que se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se eliminó y sobre el sedimento de células se añadió 1 ml de *solución de lisis* (NaOH 0,2 M (Merck), β -mercaptoetanol 0,1 M (Merck) y PMSF 0,1 mM (Roche)). Tras una incubación de 5 min en hielo, se agregó 2 μ l de TCA 100% (Merck). Inmediatamente se incubó a 65 °C durante 5 min y posteriormente a 4 °C otros 5 min. A continuación se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. El sedimento fue lavado con acetona enfriada a -20 °C (Merck) y después fue secado. El sedimento que contenía las proteínas precipitadas se resuspendió en 100 μ l de *tampón de muestra*, que contenía: 0,16 M Tris-HCl pH 6,8 (Merck), glicerol 13,3 % (v/v) (Merck), SDS 2 % (p/v) (Serva), DTT 1,5 % (p/v) (Sigma), azul de bromofenol 0,033 % (p/v) (Sigma). Finalmente las muestras fueron sonicadas y hervidas durante 5 min. Su conservación se realizó a - 20 °C.

3.6.2. Electroforesis de proteínas

Los extractos de proteínas fueron analizados en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El *gel de empaquetamiento* se preparó con: acrilamida 5 % (p/v) (Serva), bisacrilamida 0,161 % (p/v) (Merck), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,05 % (p/v) (Merck), TEMED 0,05 % (v/v) (Serva) y 0,12 M Tris-HCl pH 6,8. El *gel separador* se preparó con: acrilamida al 20 % (p/v), bisacrilamida 0,33 % (p/v),

(SDS) 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,05 % (p/v) y TEMED 0,05 % (v/v), 0,325 M Tris-HCl pH 8,8. Como marcador de peso molecular se utilizó *tampón de muestra* con una mezcla de proteínas marcadoras: ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y α -lactoalbúmina (14,2 KDa) de Sigma. La concentración final de cada proteína marcadora era 1 mg/ml. De cada uno de los extractos y del marcador se cargó un volumen de 10 μ l, en un gel de 20 cm de longitud. El *tampón de electroforesis* empleado contenía Tris base 0,495 M, glicina 0,38 M y SDS 0,1 % (p/v). Finalmente la electroforesis se realizó a voltaje constante de 125 V hasta que las muestras atravesaron el gel empaquetador y a partir de aquí a 60 V durante toda la noche hasta que el frente salió del gel.

3.6.3. Electrotransferencia

Las proteínas, separadas previamente por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot Transfer Medium de Bio-Rad). El gel de resolución se puso en contacto con una membrana de su mismo tamaño. A cada lado se colocó una capa de papel *Whatman* 3 MM y por fuera de ésta una esponja absorbente. Todo ello se manipuló humedecido con *tampón de transferencia*. Este buffer consistió en una solución tris 25 mM y glicina 113 mM que se ajustó a pH 8,3 con HCl y se mezcló con metanol (20 % (v/v)). El sándwich se colocó en un soporte de plástico y se introdujo en una cubeta rellena de *tampón de transferencia*. La transferencia se desarrolló a un amperaje constante de 200 mA durante toda la noche. Para comprobar que la transferencia de las proteínas había funcionado, se desmontó el sistema anterior y la membrana se incubó con una solución de rojo Ponceau al 1 % (p/v) (Sigma) en ácido tricloroacético al 3 % (v/v) (Merck). La tinción se realizó incubando la membrana en esta solución durante 2 min y lavándola posteriormente en agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

3.6.4. Anticuerpos

La procedencia de los anticuerpos utilizados en el trabajo y la dilución empleada se indica a continuación. El anticuerpo policlonal anti-Vpu, procedente de conejo, previamente había sido producido en nuestro laboratorio. El anticuerpo monoclonal anti-3-fosfoglicerato quinasa de levadura fue suministrado por Molecular Probes. Ambos anticuerpos se emplearon en dilución 1:5.000. El anticuerpo policlonal anti-Vpr, producido en conejo y donado por Dr. J. Koop. (suministrado por el NIBSC, UK), se utilizó en dilución 1:500. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG (H+L) anti-conejo obtenida en cabra e IgG (H+L) anti-ratón obtenida en cabra. Ambos anticuerpos, conjugados a peroxidasa y suministrados por Pierce, se utilizaron en dilución 1:10.000.

3.6.5. Inmunodetección de proteínas mediante *western-blot*

La membrana se bloqueó para prevenir la unión no específica de los anticuerpos. Para ello se incubó la membrana durante 1 h con *solución de bloqueo* (leche desnatada 5 % (p/v) en PBS 1X). A continuación esta solución se retiró, y la membrana se incubó durante 2 h con el anticuerpo primario en *solución de anticuerpo primario* (4 ml de solución de bloqueo y 16 ml de PBS 1X). Después de tres lavados con *solución de lavado* (PBS-Tween al 0,05 % (v/v)) la membrana se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario diluido en *solución de lavado*. Finalmente se hicieron cuatro nuevos lavados de la membrana en *solución de lavado* y las proteínas se detectaron utilizando el sistema de detección quimioluminiscente de Amersham Pharmacia Biotech. Para ello se añadió 1,5 ml de cada una de las soluciones del kit sobre la membrana, que se dejó actuar durante 1 min. Tras eliminar el exceso de reactivo, la membrana revelada se puso en contacto, a oscuras, con una película fotográfica en el interior de un casete. La película se reveló en un

cuarto oscuro, incubándola con líquidos reveladores y fijadores. De cada membrana se impresionaron varias películas con tiempos de exposición variables.

4. RESULTADOS

4.1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO MODELO BIOLÓGICO PARA EXPRESAR PROTEÍNAS ACCESORIAS DEL VIH-1

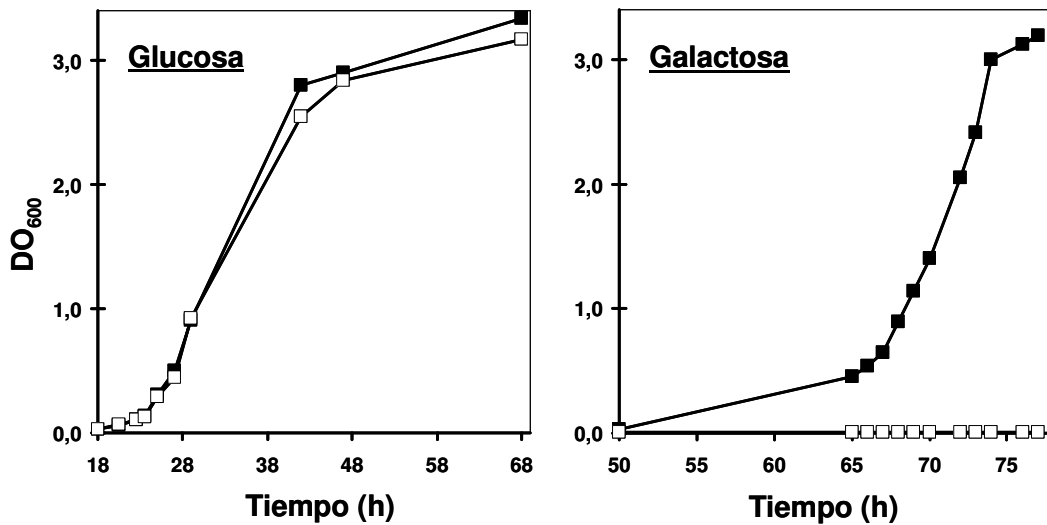
El primer objetivo de este trabajo fue la obtención de un sistema celular eficiente para expresar genes accesorios del VIH-1, como *vpu* y *vpr*, para lo que elegimos la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La genética de esta levadura (posibilidad de marcadores de selección, promotores fuertes y regulables y amplificación de plásmidos con alto número de copias) y su biología molecular (mecanismos de traducción y postraduccionales) hacen ventajosa, frente a otros sistemas, su utilización en la expresión de proteínas heterólogas y en ensayos funcionales de las proteínas sintetizadas. La proteína Vpr es la proteína accesoria retroviral que mayor citopatogenicidad muestra en diversos sistemas de expresión. Vpr detiene el ciclo celular de las células en la fase G2 y produce daños en las estructuras celulares que pueden conducir a la muerte celular. La proteína Vpr había sido anteriormente expresada en levaduras, produciendo parada del ciclo celular y muerte celular (Macreadie *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1997). Por ello, la proteína Vpr fue elegida como control en la puesta a punto del sistema de expresión. En este modelo eucarótico, que ha demostrado su utilidad para el análisis de proteínas heterólogas con actividad de canal iónico, decidimos expresar la proteína Vpu. Buscábamos un modelo biológico eficaz para analizar la actividad directa de la proteína Vpu sobre la célula.

4.1.1. Expresión inducible de genes accesorios del VIH-1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Los promotores GAL son una buena herramienta cuando se quiere controlar la producción en levaduras de una proteína heteróloga, ya que dichos promotores se inducen con galactosa y permiten obtener altos niveles de proteína (Johnston, 1987). La glucosa reprime estos promotores, bloqueando completamente la síntesis basal de la proteína heteróloga. Este control sobre la actividad del promotor permite expresar proteínas tóxicas para la levadura. El vector de expresión pEMBlyex4 nos permitió situar los genes retrovirales bajo el control del promotor híbrido CYCGAL10, promotor fuerte, inducible con galactosa y formado por un fragmento del promotor CYC y otro del promotor del gen *Gal10* (Cesareni y Murray, 1987). Utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*, transformadas con el plásmido vacío o portando la secuencia del gen *vpr*, se analizó el efecto citotóxico de la proteína Vpr sobre cultivos de la levadura (Fig. 6). A partir de un cultivo de levadura en fase de crecimiento exponencial, se inoculó medio mínimo con glucosa y medio mínimo con galactosa. A lo largo del tiempo se tomaron muestras para cuantificar el crecimiento celular, obteniéndose la cinética de crecimiento del cultivo (Fig. 6A). En medio no inductor los dos cultivos empezaron a crecer a la vez, mantuvieron la misma tasa de multiplicación y ambos alcanzaron DO_{600} 3 después de 46 h de cultivo. Por el contrario, en medio inductor el comportamiento de ambos cultivos fue diferente. El cultivo transformante para pEMBlyex4 fue el único capaz de crecer, alcanzando DO_{600} 3 después de 74 h de incubación, mientras que el cultivo transformante para pEMBlyex4*vpr* fue incapaz de crecer incluso después de 76 h de incubación. También se analizó la toxicidad de la proteína Vpr en cultivos en medio sólido (Fig. 6B). En este caso, a partir de un inóculo de la levadura transformada y creciendo en fase exponencial se sembraron diluciones seriadas de cultivo en placas con medio no inductor YNBGlu pH 7,0 y con medio inductor YNBGal pH 7,0. Después de varios días de incubación en ausencia de galactosa, se observó que tanto el cultivo control (los transformantes pEMBlyex4) como el cultivo Vpr (los

transformantes pEMBLyex4vpr) eran capaces de crecer y que el crecimiento de ambos cultivos era similar. Sin embargo cuando la glucosa del medio de cultivo era sustituida por galactosa, después de cuatro días de incubación sólo había crecido el cultivo control, no apareciendo ninguna colonia en el cultivo Vpr ni siquiera en la primera dilución (equivalente a $4,8 \times 10^4$ ufc).

A.



B.

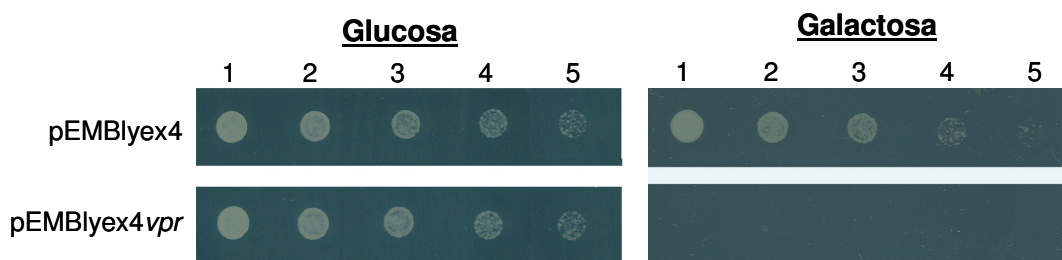


Figura 6: Crecimiento de la cepa W303-1B de *Saccharomyces cerevisiae*, transformada con los plásmidos pEMBLyex4 (control) y pEMBLyex4vpr (Vpr), en medio con glucosa y en medio con galactosa. Panel A: Cinética de crecimiento de los cultivos en medio líquido a pH 7,0. El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con glucosa o galactosa. Control (■) Vpr (□). Panel B: Diluciones seriadas de los cultivos, en medio sólido a pH 7,0. Los cultivos inoculados a DO₆₀₀ 0,2 (glucosa) ó 0,4 (galactosa) (1) fueron diluidos ½ de forma seriada (2-5). Se depositaron 4 µl de cada dilución en la placa con el medio correspondiente. Las placas se incubaron durante 2 días (YNBGlu) ó 3 días (YNBGal).

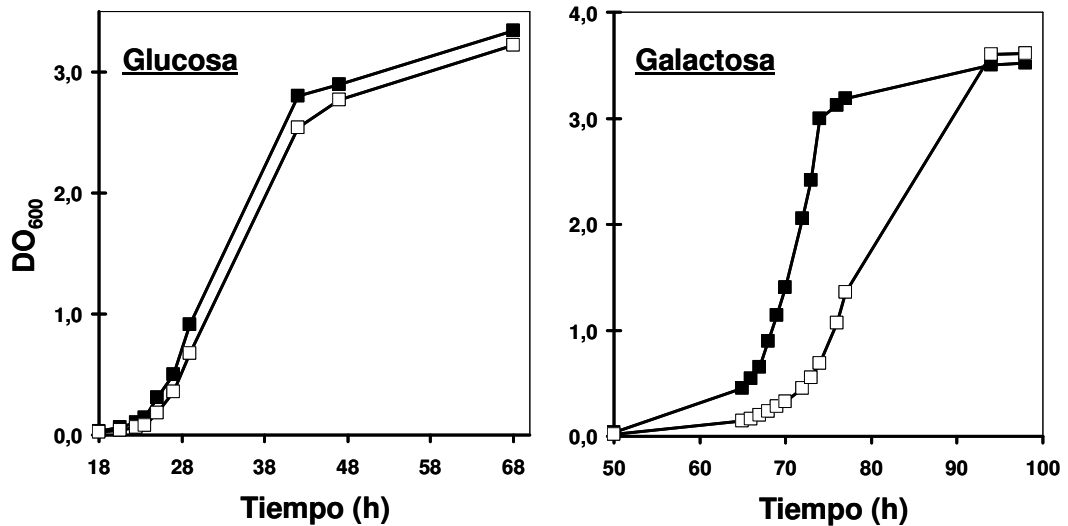
Estos resultados indicaban que la presencia de galactosa en el medio de cultivo provocaba una fuerte inhibición en el crecimiento de la levadura transformante pEMBlyex4*vpr*, probablemente por la presencia intracelular de la proteína Vpr.

Una vez comprobado que en nuestro sistema de expresión éramos capaces de reproducir la actividad descrita en la literatura para la proteína Vpr, se utilizó dicho sistema para buscar posibles efectos citopatogénicos de la proteína Vpu (Fig. 7). A partir de un cultivo de levadura, transformada con la construcción plasmídica que contenía el gen *vpu* y en fase de crecimiento exponencial, se inoculó medio mínimo inductor y no inductor. A lo largo del tiempo se tomaron muestras de ambos cultivos (control y Vpu) para ver el crecimiento celular, obteniéndose las cinéticas de crecimiento de estos cultivos (Fig. 7A). En medio no inductor ambos cultivos empezaron a crecer a la vez, crecieron a la misma velocidad y finalmente alcanzaron DO_{600} 3 (después de 46 h de cultivo). Sin embargo, en medio inductor se detectaron diferencias entre ambos cultivos: el cultivo transformante para pEMBlyex4 comenzó a crecer a las 65 h postinducción, mientras que el cultivo transformante para pEMBlyex4*vpu* no lo hizo hasta pasadas 72 h de inducción. Una vez abandonada la fase de latencia, ambos cultivos mostraban un perfil de crecimiento similar y alcanzaban la misma DO_{600} .

También se analizó la actividad de la proteína Vpu en medio sólido (Fig. 7B). En este caso, con el inóculo de levadura transformada se sembraron diluciones seriadas en placas con medio que contenía, o no, galactosa. Tras varios días de incubación se observó que, en medio sólido con glucosa, tanto los transformantes pEMBlyex4 como los transformantes pEMBlyex4*vpu* fueron capaces de crecer y tuvieron un crecimiento similar. Por el contrario, cuando el medio contenía galactosa y después de 3 días de incubación, el cultivo transformante pEMBlyex4*vpu* presentaba su crecimiento reducido (dos diluciones inferior con respecto al crecimiento del cultivo control). Cuando estas placas de cultivo se dejaban incubando más tiempo (hasta 6 días), en ambos

cultivos llegaban a detectarse el mismo número de diluciones con crecimiento (datos no mostrados).

A.



B.

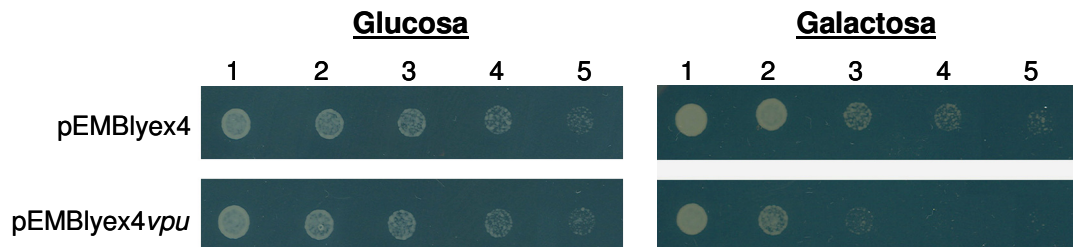


Figura 7: Crecimiento de la cepa W303-1B de *Saccharomyces cerevisiae*, transformada con los plásmidos pEMBLyex4 (control) o pEMBLyex4vpu (Vpu), en medio con glucosa y en medio con galactosa. Panel A: Cinética de crecimiento de los cultivos en medio líquido a pH 7,0. El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con glucosa o con galactosa. Control (■) Vpu (□). **Panel B:** Diluciones seriadas de los cultivos, en medio sólido a pH 7,0. Los cultivos inoculados a DO₆₀₀ 0,2 (glucosa) ó 0,4 (galactosa) (1) fueron diluidos ½ de forma seriada (2-5). Se depositaron 4 µl de cada dilución en la placa con el medio correspondiente. Las placas se incubaron durante 2 días (YNBGlu) ó 3 días (YNBGal).

Todos estos resultados indicaban que la producción intracelular de la proteína retroviral Vpu provoca un retraso en el crecimiento de los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*.

El siguiente paso fue comprobar que las levaduras cuyo crecimiento resultaba retrasado contenían en su interior celular las proteínas virales Vpr o Vpu. Tras la inducción del promotor CYCGAL con galactosa y un periodo de incubación que asegurase un número de células apropiado para la detección proteica, se analizó el contenido proteico de los extractos celulares de los cultivos de levadura portadores de la construcción pEMBLyex4vpr o pEMBLyex4vpu mediante SDS-PAGE. Ninguna de las dos proteínas virales pudieron ser detectadas directamente en geles, ni por tinción con azul de coomasie ni con marcaje metabólico radioactivo utilizando metionina ³⁵S (Resultados no mostrados). Pensamos que el pequeño tamaño de ambas proteínas podría influir en la dificultad de su detección y por ello probamos a hacer la detección de ambas proteínas mediante western-blot (Fig. 8).

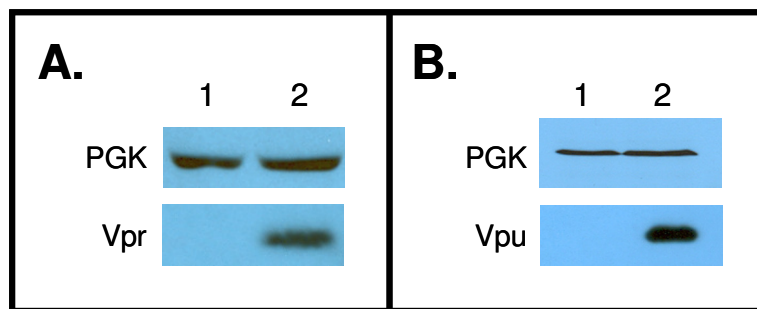


Figura 8: Detección de las proteínas Vpr y Vpu en los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* transformados con pEMBLyex4, pEMBLyex4vpr o pEMBLyex4vpu. Western-blot de los extractos proteicos de los cultivos transformados con: pEMBLyex4 (A-1 y B-1), pEMBLyex4vpr (A-2) ó pEMBLyex4vpu (B-2). Todos los cultivos fueron crecidos en presencia de galactosa.

La enzima glicolítica celular fosfoglicerato kinasa (PGK), es un buen marcador de referencia para comparar el contenido proteico en los extractos celulares. El gen *pgk* se expresa de forma constitutiva en la célula de *Saccharomyces cerevisiae*, llegando a producir el 5% del mRNA total celular (Holland y Holland, 1978). La incubación con los anticuerpos correspondientes demostró que las levaduras producían y retenían en su interior celular elevados niveles tanto de proteína Vpr como de proteína Vpu.

Todos estos resultados demostraban que el sistema celular que habíamos seleccionado era muy eficiente en la síntesis de proteínas retrovirales accesorias, y sensible a la actividad de dichas proteínas. También pudimos concluir que la sensibilidad de los cultivos era mayor en medio líquido que en medio sólido.

4.1.2. La presencia de leucina en el medio de cultivo impide detectar la actividad de las proteínas Vpr y Vpu del VIH-1 en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa W303-1B de *S. cerevisiae* es auxótrofa para leucina, por lo que en medios carentes de este aminoácido la levadura no puede crecer. El plásmido pEMBlyex4 contiene el marcador *Leu2d* del gen *LEU2* (beta-isopropylmalato dehidrogenasa), que complementa la auxotrofia de las células. Sin embargo, este marcador presente en el plásmido tiene delecionada parte de la región promotora, hecho que hace que su expresión sea reducida (Erhart y Hollenberg, 1983).

Para establecer si nuestra construcción plasmídica permitía la total independencia de leucina, se estudió el crecimiento celular en medio suplementado o no con leucina (Fig. 9). El cultivo control presentó un perfil de crecimiento similar bajo ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, el cultivo que sintetizaba la proteína Vpu en el medio que contenía leucina mostró un crecimiento similar al del cultivo control, pero en ausencia de leucina mostró un

retraso de 10 h. Después de 87 h de incubación, el cultivo que expresaba Vpu alcanzaba valores de saturación idénticos a los del cultivo control, mostrando una adaptación a la presencia de la proteína viral. Con respecto al cultivo que expresaba el gen *vpr*, se vio que en medio de cultivo sin leucina era incapaz de crecer incluso después de 75 h de incubación, mientras que cuando el medio de cultivo contenía leucina empezaba a crecer después de 63h de incubación, aunque su crecimiento era mucho más lento que el del cultivo control.

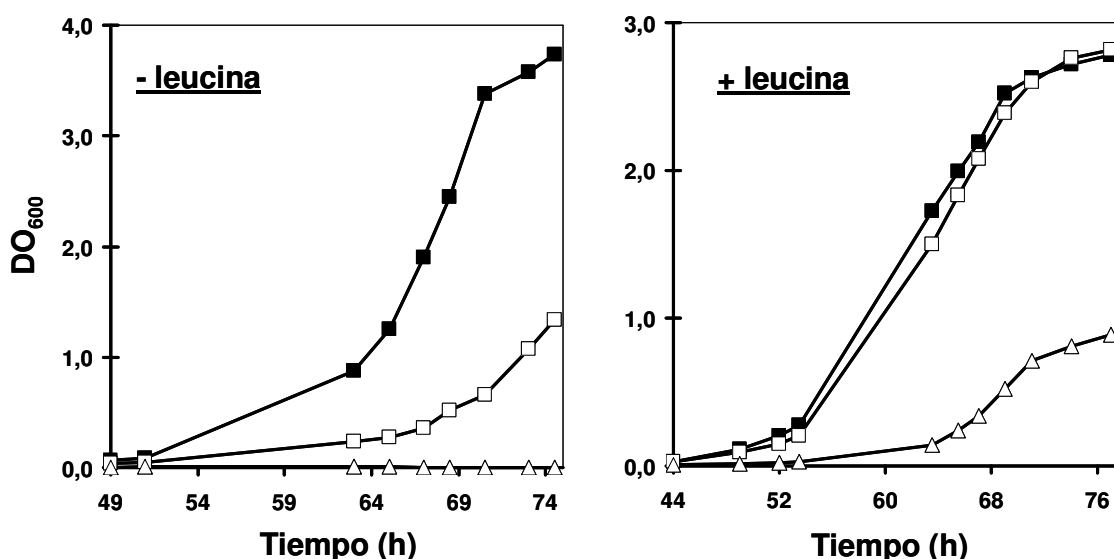


Figura 9: Influencia de la leucina sobre la actividad de las proteínas Vpr y Vpu del VIH-1 en los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Cinéticas de crecimiento de cultivos en medio mínimo con galactosa, pH 7,0 en presencia o no de leucina 0,2 %. Las cinéticas se realizaron a partir de inóculos obtenidos en presencia o ausencia de leucina al 0,2 % respectivamente. El tiempo se midió a partir de la inducción con galactosa. Control (■), Vpr (Δ), Vpu (□).

Además, realizamos otros ensayos con transformantes que habían sido amplificados a partir de una colonia en placas que contenían o no leucina (Resultados no mostrados). Concluimos que, igual que era necesario suplementar con leucina el medio de selección para lograr que se desarrollaran

las colonias durante su aislamiento, también era preciso adicionar la leucina durante la amplificación de las colonias de transformantes. Sin embargo, el aminoácido no debía añadirse ni durante la preparación de inóculos, ni durante la inducción de los cultivos, puesto que su presencia interfería con la detección de la actividad de las proteínas retrovirales.

4.1.3. El tamaño de la población inicial de células en los cultivos inducidos es crítico para la detección de la actividad de las proteínas Vpu y Vpr del VIH-1

La detección de actividad de proteínas heterólogas en cultivos celulares exige la utilización de un cultivo lo más homogéneo posible. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que se divide por gemación, es decir, en cada célula madre surge una yema que, tras un proceso de maduración, es liberada originando una célula hija de tamaño inferior al de la células madre. Esta división celular asimétrica da lugar a una heterogeneidad de la población, tanto en tamaño como en envejecimiento, que se refleja en diferencias en el fenotipo y en la respuesta al estrés de sus individuos (Sumner y Avery, 2002). Por este motivo, consideramos importante analizar cual era el tamaño adecuado de la población inicial de levadura, en el momento de inducir la expresión de la proteína recombinante Vpr, a fin de poder detectar la actividad proteica. Para fijar este parámetro se hicieron cinéticas de crecimiento con cultivos inoculados a DO_{600} 0,150, 0,050 ó 0,005 (Fig. 10). La presencia de la proteína Vpr en los cultivos de levadura producía una inhibición en el crecimiento de los cultivos en los tres casos. Sin embargo, aunque la inhibición del crecimiento de este cultivo era drástica, terminaba siendo indetectable cuando la DO_{600} inicial de los cultivos era 0,150 ó 0,050; no así en el caso de los cultivos con DO_{600} inicial 0,005 que mantenían dicha inhibición incluso después de 90h de incubación. Es decir, el número de células en el momento de la inducción con galactosa era

determinante para la detección de la actividad de la proteína retroviral sobre el crecimiento celular.

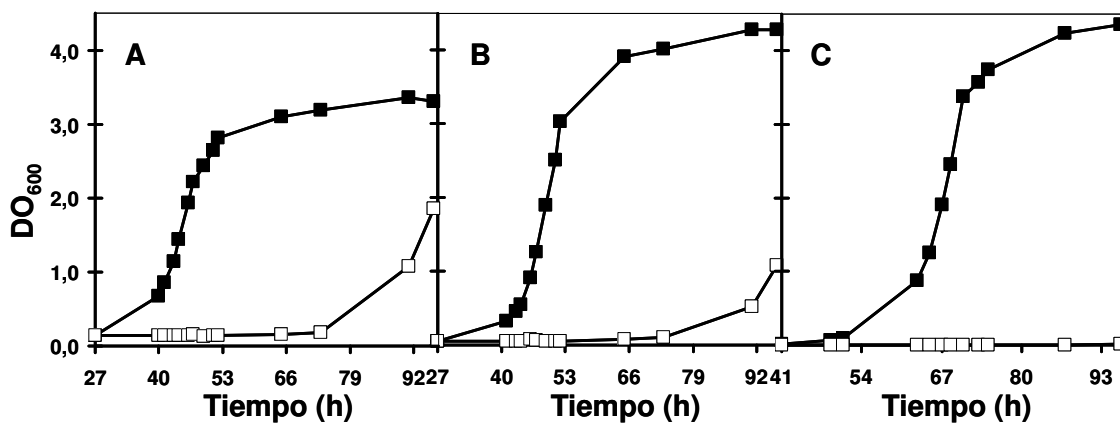


Figura 10: Influencia del tamaño de la población celular en el momento de la inducción con galactosa sobre la actividad de la proteína Vpr. Cinéticas de crecimiento de los cultivos en medio líquido pH 7,0, cuya DO₆₀₀ inicial fue 0,150 (A), 0,050 (B) ó 0,005 (C); el tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa. Control (■), Vpr (□).

Una vez comprobado que el tamaño de la población celular afectaba la capacidad de detección de la fuerte actividad de la proteína Vpr, decidimos estudiar qué ocurría con la proteína Vpu, de actividad más débil. Se hicieron cinéticas de crecimiento con cultivos portadores del gen *vpu* inoculados a DO₆₀₀ 0,150, 0,050 ó 0,005 (Fig. 11). La proteína Vpu producía una inhibición en el crecimiento de los cultivos, que era de solo 3 h cuando el cultivo inicial tenía DO₆₀₀ 0,150, aumentando a 4h si la DO₆₀₀ era 0,050 y llegaba hasta 10 h cuando la DO₆₀₀ del cultivo inicial era 0,005. Es decir, el número de células en el momento de la síntesis de la proteína retroviral, era mucho más crítico, para la detección de variaciones en el crecimiento celular, en el caso de la expresión de la proteína Vpu que en el de la proteína Vpr.

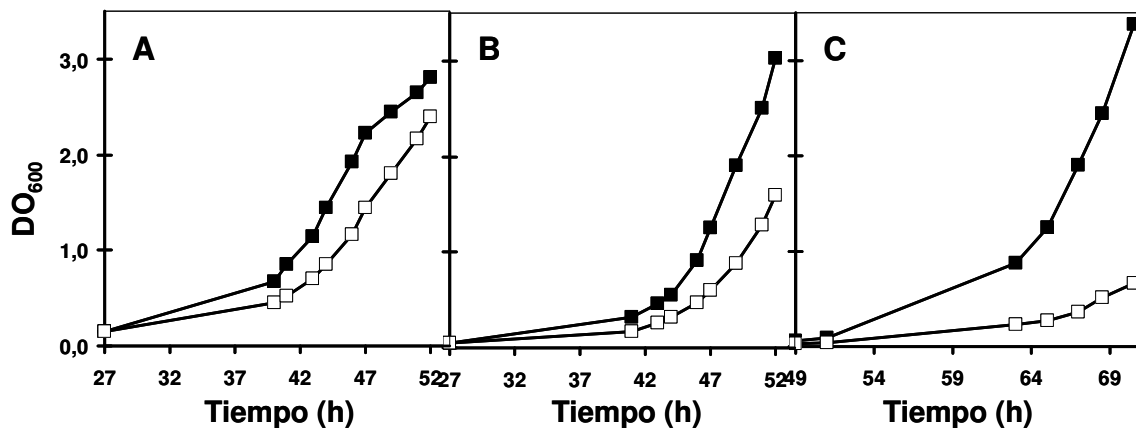


Figura 11: Influencia del tamaño de la población celular en el momento de la inducción con galactosa sobre la actividad de la proteína Vpu. Cinéticas de crecimiento de los cultivos en medio líquido pH 7,0 cuya DO₆₀₀ inicial fue 0,150 (A), 0,050 (B) ó 0,005 (C); el tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa. Control (■), Vpu (□).

Estos ensayos mostraban que, la detección de las alteraciones fenotípicas producidas por la actividad de las proteínas accesorias del VIH-1, era óptima cuando la DO₆₀₀ de los cultivos en el momento de la inducción con galactosa era 0,005.

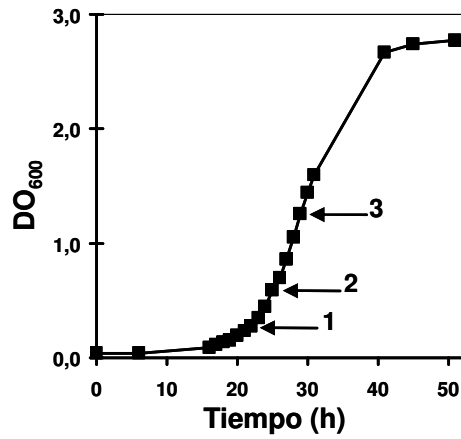
4.1.4. El estado de crecimiento del inóculo de levadura en el momento de la inducción afecta la detección de actividad de la proteína retroviral Vpu

El hecho de que con la proteína Vpu detectáramos una actividad mucho más débil que con la proteína Vpr, nos indujo a buscar condiciones experimentales que condujesen a mejorar dicha detección. En *Saccharomyces*, la sensibilidad celular a cambios en el medio o a condiciones de estrés

disminuye a medida que avanza el ciclo de crecimiento de los cultivos. Los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, cuando utilizan la glucosa como fuente de carbono, muestran cinco fases de crecimiento bien definidas: latencia, exponencial, cambio diauxico, fase postdiáuxica y estacionaria. En cada una de estas fases se expresan diferentes genes, lo que hace que las características celulares varíen a lo largo del crecimiento del cultivo (Derisi *et al.*, 1997). Cuando las células entran en la fase estacionaria comienzan su proceso de envejecimiento (Ashrafi *et al.*, 1999). En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Werner-Washburne *et al.*, 1993).

Se analizó la actividad de la proteína Vpu utilizando cultivos de levadura en diferentes momentos de su crecimiento correspondientes al metabolismo fermentativo (Fig. 12). Células transformadas con el vector control o con el vector portador de la secuencia codificante de *vpu* se cultivaron en medio con glucosa. Se extrajeron sucesivamente alícuotas de los cultivos cuando éstos alcanzaron: la fase exponencial temprana (DO_{600} 0,3), la mitad de la fase exponencial (DO_{600} 0,6) o la fase exponencial tardía (DO_{600} 1,2) (Fig. 12A). Seguidamente, las alícuotas recogidas se utilizaron para inocular medio inductor y se realizó el seguimiento de la cinética de crecimiento de los nuevos cultivos (Fig. 12B). Observamos que en los cultivos que procedían de las alícuotas extraídas al inicio de la fase exponencial, la presencia de la proteína Vpu no alteraba ni el inicio ni la velocidad de crecimiento del cultivo. Si los inóculos utilizados ya habían alcanzado el final de la fase exponencial, la proteína Vpu alargaba la fase de latencia unas 3h más que la del control. La fase de latencia aumentaba hasta 6h en el caso de los cultivos inoculados con células en plena fase exponencial de su crecimiento. Estos resultados mostraron que, para tener una buena detección de la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en los cultivos de levadura, el momento óptimo para inducir la síntesis de dicha proteína en el cultivo inóculo, era la mitad de la fase exponencial del crecimiento.

A.



B.

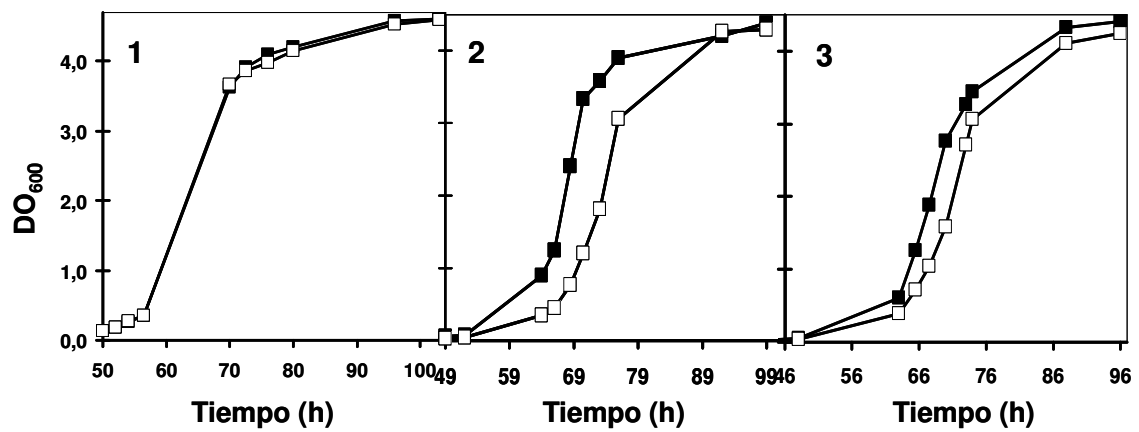


Figura 12: Comparación del efecto de la proteína Vpu en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes estados de crecimiento. (A): Se creció un cultivo en medio mínimo con glucosa y de él se tomaron tres alícuotas en diferentes estadios de su crecimiento (1- fase exponencial temprana, 2- mitad de la fase exponencial o 3- exponencial tardía). (B): Las tres alícuotas extraídas se utilizaron como inóculos para realizar cinéticas de crecimiento en medio mínimo con galactosa a pH 7,0 (1, 2 y 3). El tiempo se midió a partir de la inoculación del medio mínimo. Control (■), Vpu (□).

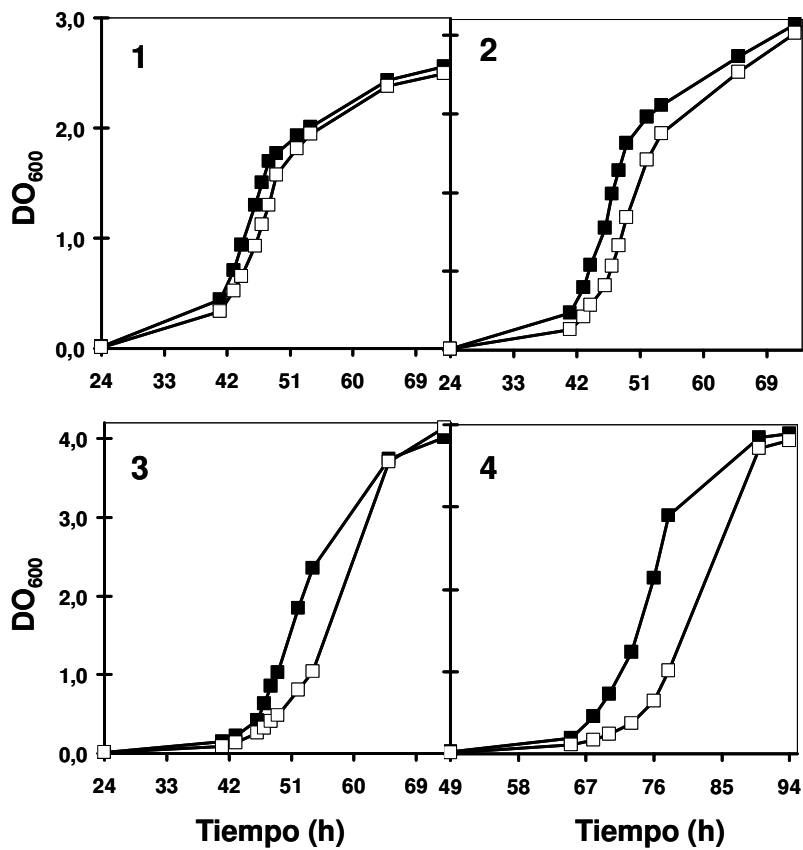
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU DEL VIH-1 UTILIZANDO LA CEPA W303-1B DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Una vez observado que la presencia de la proteína Vpu producía un fenotipo de *S.cerevisiae* con crecimiento retrasado, procedimos a caracterizar la actividad de la proteína viral en este sistema celular. Otras proteínas virales con actividad de canal iónico han sido expresadas en este sistema celular para caracterizar su actividad. Este es el caso de la proteína M2 del virus de la gripe, que también pertenece a la familia de las viroporinas. Esta proteína modifica el fenotipo de la levadura y su actividad ha podido ser bloqueada utilizando este sistema celular (Kurtz *et al.*, 1995). La toxina viral K1 del micovirus ScV-M1 muestra actividad de canal iónico para K⁺ en esferoplastos (Martinac *et al.*, 1990) y modifica el gradiente de H⁺ y el transporte de K⁺ en levaduras completas (de la Peña *et al.*, 1981; Sesti *et al.*, 2001).

4.2.1. El efecto de la proteína Vpu del VIH-1 sobre los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* es dependiente del pH del medio de cultivo

Estudios de proteínas con actividad de canal iónico, realizados en cultivos de levadura, han mostrado que la actividad de éstas es dependiente del pH del medio extracelular. La proteína murina Kir 2.1 expresada de manera heteróloga en *S. cerevisiae* muestra muy poca actividad en cultivos celulares crecidos a pH ácido, y su máximo de actividad en cultivos celulares crecidos en medio con pH neutro (Hasenbrink *et al.*, 2005; Kolacna *et al.*, 2005). Estas observaciones nos llevaron a buscar el pH óptimo para la actividad de la proteína Vpu. Para estudiar si el pH del medio de cultivo celular afectaba a la actividad de la proteína Vpu, se realizaron cinéticas de crecimiento de cultivos de levadura en medio mínimo a diferentes pHs (Fig. 13).

A.



B.

pH	DO ₆₀₀ Control	DO ₆₀₀ Vpu	% Inhibición
5,4	1,30	0,93	29
6,0	1,31	0,69	47
6,5	1,23	0,56	53
7,0	1,24	0,37	69

Figura 13: Influencia del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de levadura. Panel A: Cinética de crecimiento de los cultivos en medio líquido a pH 5,4 (1) (el pH natural del medio) 6,0 (2); 6,5 (3); o 7,0 (4). El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa. Control (■), Vpu (□). Panel B: Comparación del crecimiento alcanzado por los cultivos a los distintos pHs (DO₆₀₀). El % de inhibición expresa el diferencial de crecimiento del cultivo Vpu con respecto al cultivo control. % Inhibición = $[100 - 100 \times (DO_{Vpu}/DO_C)]$.

Los cultivos de levadura control mostraron un retraso en el inicio de su crecimiento según el pH del medio de cultivo se acercaba a la neutralidad. Mientras que para pH 5,4 el crecimiento exponencial del cultivo comenzaba alrededor de las 41 h postinducción, a pH 7,0 se retrasaba 27 h más. Cuando el pH era ácido, la presencia de la proteína Vpu apenas alteraba el inicio del crecimiento del cultivo, mientras que retrasaba aún más el inicio de la fase exponencial en los cultivos crecidos a pH 7,0 (Fig. 13A). La inhibición del crecimiento del cultivo producido por la proteína Vpu era dependiente del pH del medio de cultivo; la tasa máxima de variación entre la inhibición detectada a pH 7,0 y a pH 5,4 alcanzó el valor 2,3 (Fig. 13B). Por tanto, la inhibición del crecimiento celular que producía la proteína Vpu del VIH-1 era mayor y más prolongado en el tiempo, cuanto más cercano a la neutralidad era el pH del medio de cultivo.

La correlación entre el pH del medio de cultivo y la inhibición del crecimiento del cultivo celular podía deberse a dos causas: a una variación en la cantidad de proteína Vpu en el interior celular en función del pH del medio ó a una sensibilidad de la actividad de la proteína Vpu al pH del medio. Para ver cual de las hipótesis era la cierta, se analizó la cantidad de proteína Vpu acumulada en el interior celular a cada pH. Para ello, los distintos cultivos se dejaron crecer hasta el mismo momento del crecimiento celular, y entonces se recogió un alícuota de cada uno de ellos para la realización de un western-blot (Fig. 14). Los resultados mostraron que, bajo estas condiciones de cultivo, la proteína Vpu era sintetizada por la levadura a todos los pHs de crecimiento celular. Tomando como referencia la cantidad de proteína PGK, se pudo comparar las cantidades relativas de proteína Vpu en los extractos celulares de los cuatro pHs ensayados. Observamos que no se produjeron diferencias significativas en las cantidades relativas de proteína Vpu acumulada en el interior celular. Estos resultados confirmaban que las diferencias observadas en el crecimiento de los cultivos celulares en función del pH era consecuencia de un aumento de actividad de la proteína Vpu a pHs próximos a la neutralidad.

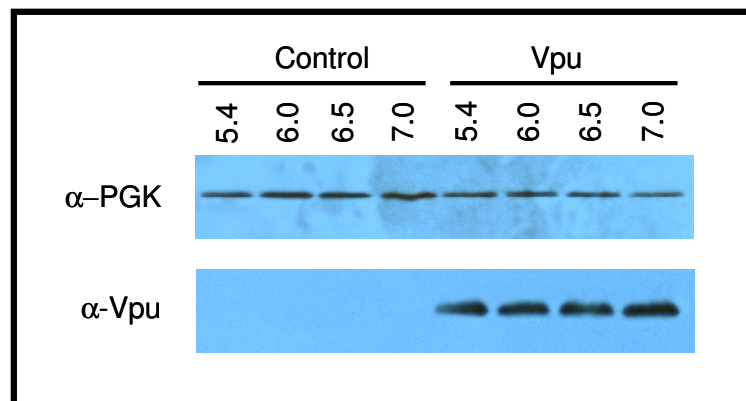


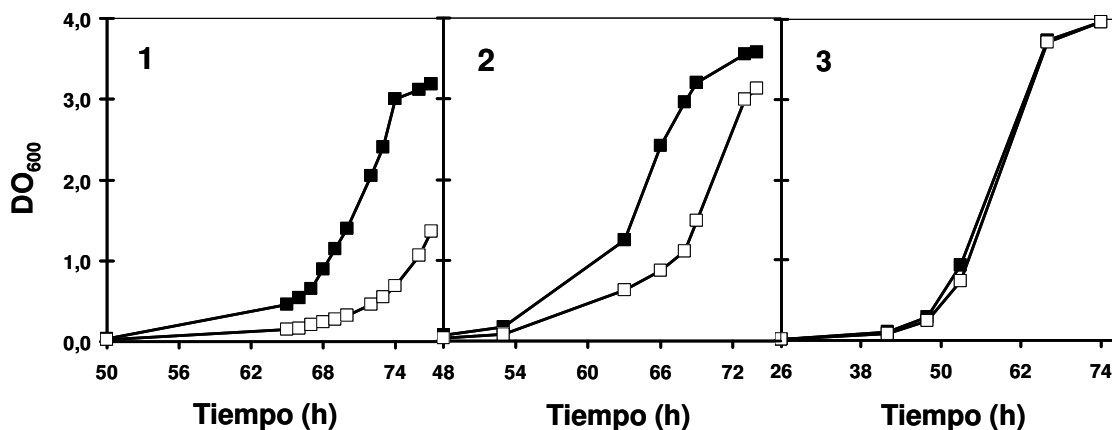
Figura 14: Síntesis de la proteína Vpu en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* realizados a distintos pHs. Los extractos proteicos de los cultivos crecidos a distintos pHs se analizaron por western-blot. Todos los cultivos fueron crecidos en presencia de galactosa.

4.2.2. La actividad de la proteína Vpu del VIH-1 sobre los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* es sensible a la concentración de iones K⁺ en el medio de cultivo

Como ya se ha comentado en la introducción, el potasio tiene funciones muy importantes para la supervivencia celular. En la naturaleza, este ión se encuentra en concentraciones del rango de micromolar, mientras que la concentración intracelular del catión es aproximadamente 150 mM (Ogino *et al.*, 1983). Un elevado contenido de este ión en el medio extracelular puede provocar su entrada masiva al interior celular, a través de transportadores inespecíficos. Como consecuencia, el transporte iónico a través de la membrana plasmática se puede ver alterado para compensar los niveles fisiológicos de este ión. Por este motivo, y dado que la proteína Vpu se ha descrito como un posible canal iónico, se estudió el comportamiento de la proteína Vpu en presencia de diferentes concentraciones de potasio. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento con cultivos de levadura con la cantidad

mínima de potasio requerida para el crecimiento celular (7 mM, en el medio YNB), con una cantidad algo mayor (17 mM), o con alta concentración de potasio (107 mM) (Fig. 15).

A.



B.

<u>K⁺ (mM)</u>	<u>DO₆₀₀ Control</u>	<u>DO₆₀₀ Vpu</u>	<u>% Inhibición</u>
7	1,10	0,28	73
17	1,25	0,64	49
107	0,94	0,74	21

Figura 15: Influencia del ión K⁺ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de levadura. **Panel A:** Cinética de crecimiento de los cultivos en medio de cultivo a pH 7,0 y concentración de KCl: 7mM (1), 17mM (2) ó 107 mM (3). Los cultivos se prepararon con un inóculo crecido en medio con KCl 7mM. El tiempo se midió a partir de la inoculación en medio mínimo con galactosa. Control (■), Vpu (□). **Panel B:** Comparación del crecimiento alcanzado por los cultivos a distintas concentraciones de K⁺ (DO₆₀₀). El % de inhibición expresa el diferencial del crecimiento alcanzado por el cultivo Vpu con respecto al cultivo control. % Inhibición = $[100 - 100 \times (DO_{Vpu}/DO_C)]$.

Los cultivos control crecidos con una cantidad mínima de K⁺ entraban en la fase exponencial de su crecimiento tras 66 h de incubación. En ese mismo momento, aquellos crecidos con algo más de K⁺ se encontraban en una fase

exponencial tardía, mientras que los crecidos con un exceso de K^+ se encontraban en una fase estacionaria (Fig. 15A). Por tanto, observamos que el potasio aceleraba el crecimiento de los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la proteína Vpu provocaba una inhibición en el crecimiento de los cultivos de levadura menor a medida que aumentaba la concentración de ión K^+ en el medio de cultivo (Fig. 15B).

La correlación entre el aumento en la concentración de ión K^+ en el medio de cultivo y la disminución en la inhibición del crecimiento podía ser consecuencia de un cambio en la síntesis o en la estabilidad de la proteína. Para ver si esto ocurría, se examinó la cantidad de proteína Vpu acumulada en el interior celular en cada una de las condiciones de cultivo. Para ello, los cultivos celulares crecidos con distintas concentraciones de ión K^+ en el medio, se dejaron crecer hasta el inicio de la fase exponencial del cultivo y mediante western-blot se analizó el contenido proteico de los extractos celulares (Fig. 16). Vimos que los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* eran capaces de sintetizar la proteína Vpu cuando crecían en un medio con un mínimo o un exceso de ión K^+ . Mediante comparación con la señal obtenida por la proteína PGK, concluimos que no había diferencias significativas en la cantidad de proteína Vpu acumulada en el interior celular en las distintas concentraciones de K^+ ensayadas. Estos resultados mostraron que las células de *S. cerevisiae* sintetizaban la misma cantidad de proteína Vpu creciendo en un medio que contenía KCl 7, 17 ó 107 mM, sugiriendo la posibilidad de que en presencia de altas concentraciones de ión potasio en el medio, las células eran resistentes a la actividad de la proteína retroviral Vpu.

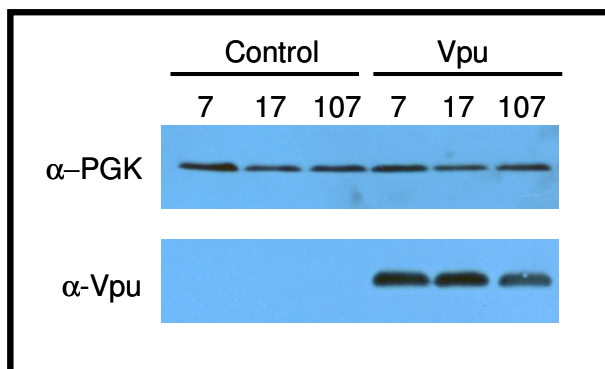


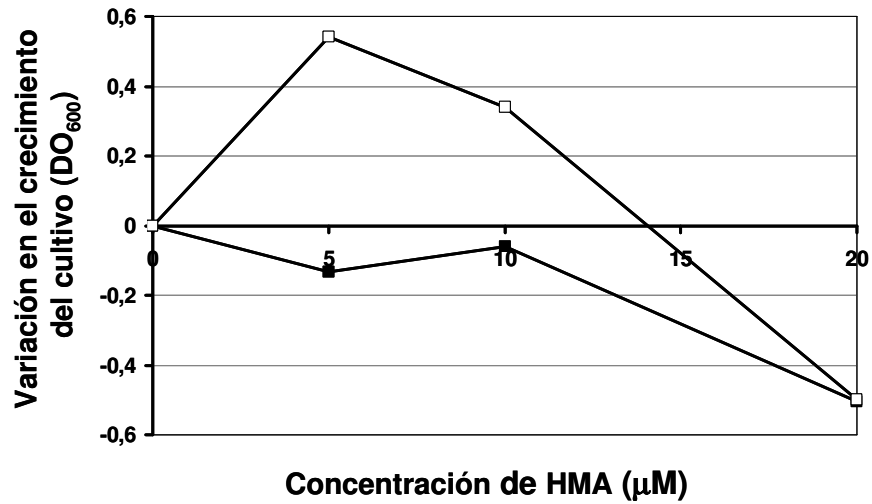
Figura 16: Síntesis de la proteína Vpu en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* crecidos con distintas cantidades de K^+ . Los extractos proteicos de los cultivos crecidos a distintos pHs se analizaron por western-blot. Todos los cultivos fueron crecidos en presencia de galactosa.

4.2.3. La 5-(N,N-hexametilen)-amilorida es capaz de revertir el efecto que produce la proteína Vpu del VIH-1 sobre el crecimiento de cultivos de *S. cerevisiae*

Se ha demostrado que la 5-(N,N-hexametilen)-amilorida (HMA) inhibe la actividad de diversas viroporinas tales como la proteína E del coronavirus SARS en células L2 y L929 murinas (Wilson *et al.*, 2006), la proteína p7 del virus de la hepatitis C, la proteína M del virus del dengue expresadas en bicapas lipídicas (Premkumar *et al.*, 2004; Premkumar *et al.*, 2005) e incluso la propia proteína Vpu en células Hela (Ewart *et al.*, 2002).

Dado que nosotros detectábamos que la actividad de Vpu en *S. cerevisiae* era dependiente de las condiciones iónicas de los cultivos, nos pareció interesante ensayar en nuestro sistema este inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ . Por ello, preparamos cultivos en medio líquido en presencia de cantidades variables de HMA y los dejamos crecer hasta que el cultivo sin HMA alcanzó la fase exponencial. En ese momento se tomaron muestras de todos los cultivos y se midió su densidad óptica (Fig. 17A).

A.



B.

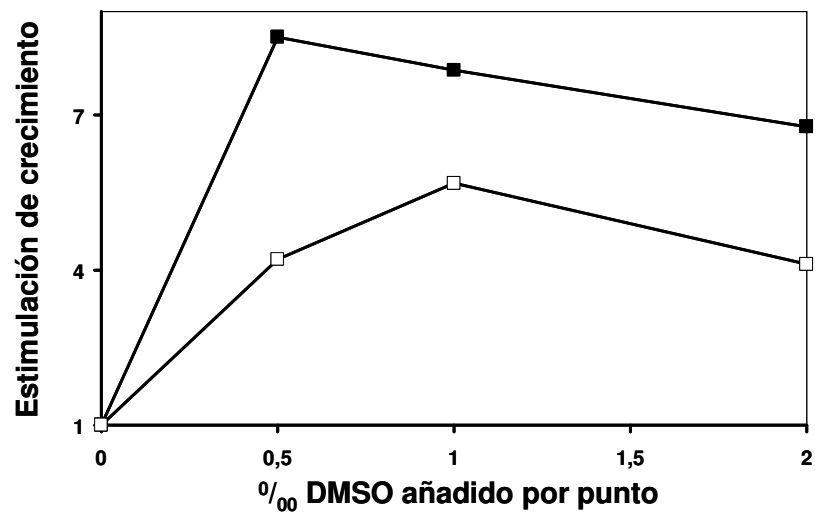


Figura 17: Efecto de la adición de 5-(N,N-hexametilen)-amilorida al medio de cultivo, sobre el crecimiento de la cepa silvestre. Panel A: Crecimiento de cultivos en medio mínimo con galactosa pH 7,0 en presencia de HMA. En cada concentración de HMA, se muestra el valor obtenido después de restar la DO₆₀₀ en medio con el correspondiente volumen del solvente (DMSO). Panel B: Efecto genuino del solvente sobre el crecimiento de cada cultivo. Control (■), Vpu (□).

Se observó que cantidades crecientes de HMA, hasta 10 μM , producían una estimulación del crecimiento en el cultivo de levaduras productoras de la proteína Vpu. Este efecto se perdió con HMA 20 μM . Por el contrario, en el cultivo de levaduras control (transformadas con el plásmido pEMBlyex4) se observó reducción del crecimiento de forma ligera en presencia de concentraciones de HMA hasta 10 μM y drásticamente con 20 μM . Estos resultados mostraban que cuando la levadura *S. cerevisiae* crecía en presencia del inhibidor HMA, el efecto estimulador de éste compensaba el retraso en el crecimiento provocado por la proteína retroviral Vpu. La HMA utilizada estaba disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y dicho solvente afecta por sí mismo al crecimiento celular. Por este motivo estudiamos el efecto que producía el solvente en los cultivos de levadura (Fig. 17B). Ambos cultivos sufrían una estimulación en su crecimiento como consecuencia del efecto del DMSO, pero la estimulación que experimentaba el cultivo control era mayor que la que sufría el cultivo productor de la proteína Vpu. En el caso del cultivo portador de la proteína Vpu, la estimulación de su crecimiento podría atribuirse tanto a HMA como al DMSO, si bien cuanto menores eran las concentraciones de solvente, menos se enmascaraba el efecto de HMA. Ambos cultivos experimentaban fuerte toxicidad por HMA 20 μM , claramente producida por HMA.

Los resultados sugirieron que el tratamiento con HMA revertía la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* y este efecto solo puede ser detectado cuando la concentración del solvente es baja. Además, la actividad de la proteína Vpu interfiere con la entrada de DMSO al interior celular o con la actividad de éste una vez dentro de la célula.

4.2.4. La actividad inhibidora de la proteína Vpu en la cepa silvestre aumenta en condiciones de abundancia de nutrientes

Cuando la cepa silvestre de levadura crece en un medio extracelular con déficit de purinas, se ha visto que la auxotrofia para adenina provoca la

acumulación intracelular de un intermediario metabólico del nucleótido. Este metabolito resulta tóxico para las células, así que es necesaria la suplementación del medio de cultivo con adenina en abundancia para asegurar el crecimiento celular. También se ha visto que en la levadura algunas proteínas transportadoras de nutrientes pueden alterar el intercambio iónico entre la célula y el medio externo (Wright *et al.*, 1997; Perez-Valle *et al.*, 2007). Puesto que la actividad de la proteína Vpu en la cepa silvestre es sensible a la concentración de iones K^+ del medio de cultivo y la auxotrofia de la levadura para adenina hace necesaria la modificación de la cantidad de adenina del medio, nos planteamos si el déficit/exceso de adenina del medio modificaría el intercambio iónico celular, alterando así la actividad de la proteína viral (Fig 18). Para responder a esta cuestión, se realizaron cinéticas de crecimiento con cultivos de levadura crecidos hasta la fase de exponencial de crecimiento, en medio con 20 mg/l o con 40 mg/l de adenina. Con estos cultivos se inoculó medio mínimo inductor que contenía la correspondiente concentración de adenina.

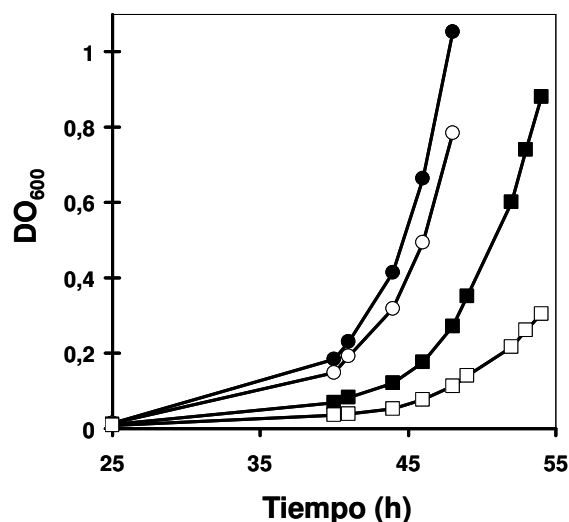


Figura 18: Influencia de la adenina sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Cinética de crecimiento en medio a pH 6,5 en presencia de Ade 40 mg/l: Control (■) y Vpu (□) o de Ade 20 mg/l: Control (●) y Vpu (○). Los cultivos provenían de un inóculo con la misma cantidad de adenina. El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa.

Los dos cultivos de levadura mostraron un adelanto en el inicio de su crecimiento cuando el medio contenía adenina 20 mg/l. En estas condiciones el efecto inhibitor de la proteína Vpu era débil, contrariamente a lo observado cuando la adenina se encontraba en abundancia, donde el cultivo portador de la proteína Vpu mostraba un retraso en el crecimiento del 66%. Estos resultados mostraban que en condiciones de abundancia de la base nitrogenada, la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 confería una gran desventaja para el crecimiento de las células silvestres.

4.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU DEL VIH-1 UTILIZANDO LA CEPA WΔ3 DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

En este trabajo hemos demostrado que la síntesis de la proteína Vpu en la cepa silvestre de *Sacharomyces cerevisiae* provoca un retraso en el crecimiento de los cultivos y que concentraciones elevadas de potasio en el medio confieren resistencia al efecto de la Vpu en la levadura. La proteína viral ha sido descrita como canal iónico en estudios electrofisiológicos, aunque se desconoce su especificidad (Ewart *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1996). La genética de la levadura permite caracterizar canales iónicos heterólogos mediante el análisis de fenotipos de crecimiento (Nakamura y Gaber, 1998). En *Saccharomyces* los dos genes que regulan la entrada de potasio en la célula, *trk1* y *trk2*, codifican para las proteínas TRK1 y TRK2 respectivamente (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). La cepa mutante *trk1 trk2* de *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser útil en el estudio de canales iónicos de otros organismos ya que permite discriminar la actividad de las proteínas heterólogas en ella expresadas (Mercier *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2006).

4.3.1. La proteína viral Vpu produce la estimulación del crecimiento de los cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizamos la cepa W Δ 3, constituida por mutantes defectivos de levadura *trk1 trk2*, para ensayar la complementación de la proteína Vpu con los transportadores de alta afinidad para el potasio. En primer lugar analizamos el crecimiento, en medio sólido, de cultivos con los mutantes que habíamos transformado con pEMBlyex4 ó pEMBlyex4*vpu* (Fig. 19). Después de tres días de incubación, en medio no inductor observamos que el crecimiento de ambos cultivos era similar. Sin embargo cuando el medio de crecimiento contenía galactosa, el cultivo del transformante pEMBlyex4*vpu* crecía más que el cultivo control. Cuando estas placas de medio sólido se dejaban incubar más tiempo, ambos cultivos terminaban alcanzando el mismo crecimiento.

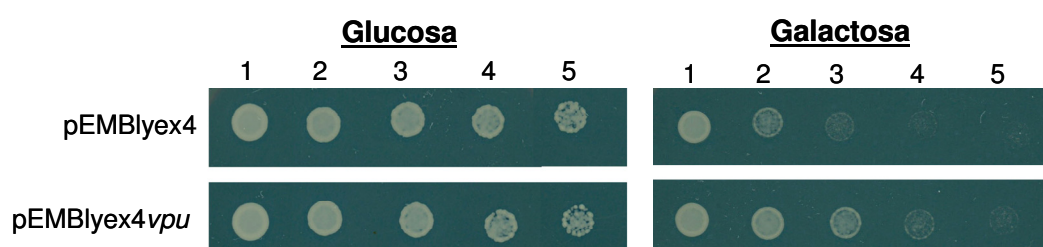


Figura 19: Crecimiento de la cepa $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*, transformada con los plásmidos pEMBlyex4 (control) o pEMBlyex4*vpu* (Vpu), en medio con glucosa y en medio con galactosa.. Diluciones seriadas en medio sólido pH 7,0. Los cultivos inoculados a DO_{600} 0,2 fueron diluidos $\frac{1}{2}$ de forma seriada. Se depositaron 4 μ l de cada dilución en la placa con el medio correspondiente. Las placas se incubaron durante 2 días (YNBGlu) ó 3 días (YNBGal).

Con objeto de confirmar la presencia de proteína Vpu en el mutante, se prepararon cultivos de transformantes pEMBlyex4 ó pEMBlyex4*vpu* en medio líquido inductor y se analizó el contenido proteico del extracto celular mediante

western-blot (Fig. 20). Observamos que al igual que ocurría en la cepa salvaje, los mutantes portadores de la construcción pEMBLyex4vpu sintetizaban de manera eficiente la proteína Vpu del VIH-1. Los resultados obtenidos indicaban que, en la cepa mutante *trk1 trk2* de *Saccharomyces cerevisiae*, la presencia de la proteína Vpu del VIH-1 causaba la estimulación del crecimiento celular.

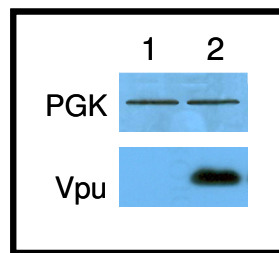
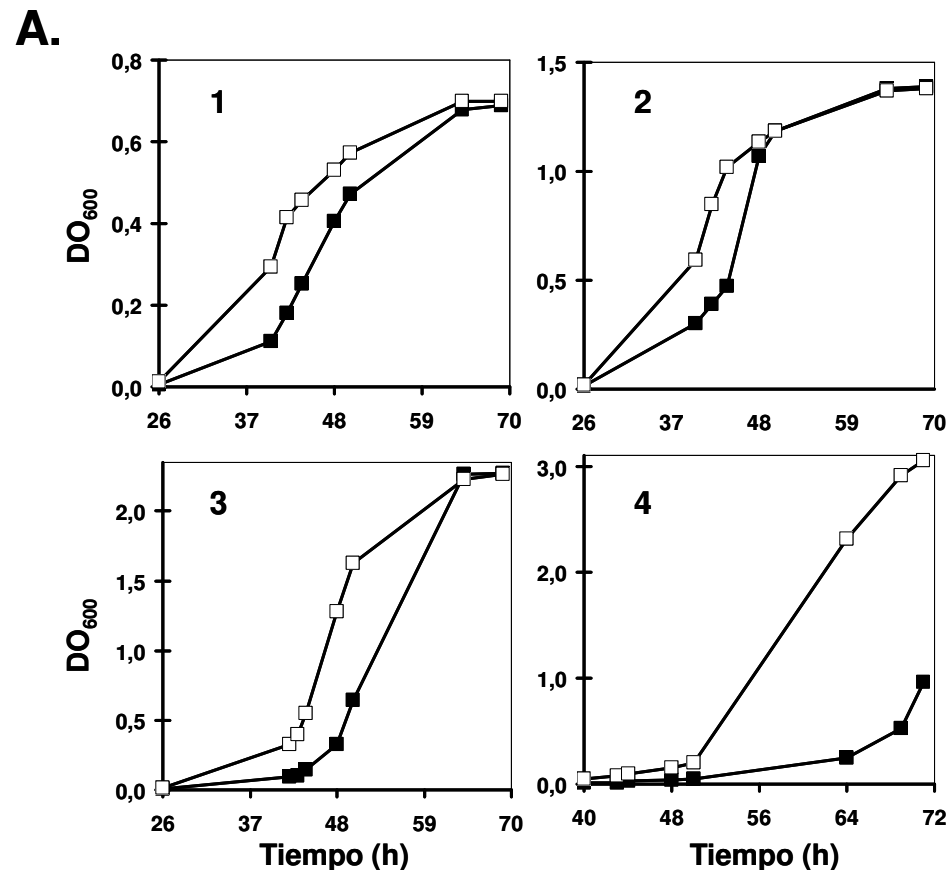


Figura 20: Detección de la proteína Vpu en cultivos la cepa $\Delta trk1,2$, transformada con pEMBLyex4 o pEMBLyex4vpu. Mediante western-blot se analizaron los extractos proteicos del cultivo transformado con pEMBLyex4 (1) y del cultivo transformado con pEMBLyex4vpu (2), ambos crecidos en presencia de galactosa.

4.3.2. El efecto de la proteína Vpu sobre los cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae* es dependiente del pH del medio de cultivo

En la cepa silvestre la proteína Vpu es más activa cuando el pH del medio es próximo a 7, a pesar de que el crecimiento óptimo de esta levadura se produce a pH ligeramente más ácido (5,5). El mutante *trk1 trk2* tiene hiperpolarizada la membrana celular, su crecimiento es dependiente del pH externo y muestra hipersensibilidad al pH ácido del medio de cultivo (Bertl *et al.*, 2003). Esta hiperpolarización de la membrana plasmática podría afectar la actividad de la proteína viral Vpu que es una proteína integral de membrana. O por el contrario, la propia Vpu podría modificar el estado de polarización de la membrana plasmática.

Nos planteamos analizar si, al igual que ocurría en la cepa silvestre, la actividad de la proteína viral en este mutante también era dependiente del pH externo. Realizamos cinéticas de crecimiento, con el mutante transformado con el plásmido vacío y con el plásmido portador de la secuencia *vpu* (Fig. 21).



B.

pH	DO ₆₀₀ Control	DO ₆₀₀ Vpu	% Estimulación
5,4	0,25	0,45	181
6,0	0,30	0,59	197
6,5	0,30	1,28	395
7,0	0,25	2,31	924

Figura 21: Influencia del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Panel A: Cinética de crecimiento de los cultivos en medio líquido a pH 5,4 (1) (pH natural del medio YNB); 6,0 (2); 6,5 (3) y 7,0 (4). El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa. Control (■) Vpu (□). Panel B: Comparación del crecimiento alcanzado por los cultivos a los distintos pHs (DO₆₀₀). El % de estimulación expresa el diferencial de crecimiento del cultivo Vpu con respecto al cultivo control. % Estimulación = $[100 - 100 \times (\frac{DO_{Vpu}}{DO_{Control}})]$.

Los cultivos de levadura, en fase de crecimiento exponencial se inocularon sobre medio mínimo inductor a diferentes pHs. A lo largo del tiempo se tomaron muestras para medir el crecimiento celular (Fig. 21A). El inicio del crecimiento en los cultivos de levadura control estaba retrasado cuanto mayor era el pH del medio de cultivo, pasando de 43 h a un pH ácido, hasta 65 h a un pH neutro. Sin embargo, la presencia de la proteína Vpu hacía que, 42 h después de la inducción, los cultivos de células se encontrasen en mitad de la fase exponencial si el pH del medio era 5,4 ó 6,0, estuviesen empezando a crecer para un pH 6,5, o tardasen 53 h en empezar a crecer a pH 7,0. Por tanto, el inicio del crecimiento de ambos cultivos de levadura se retrasaba a medida que el pH del medio de cultivo se acercaba al punto de neutralidad. Sin embargo, los cultivos que sintetizaban la proteína Vpu iniciaban su crecimiento antes que los cultivos control, en todas las condiciones ensayadas. Cuanto más neutro era el pH del medio, mayor era la diferencia entre el número de células del cultivo que sintetizaba la proteína Vpu y del cultivo control (Fig. 21B). También se observó que los cultivos alcanzaban un mayor número de células cuanto más cercano a la neutralidad era el pH del medio de cultivo. Estos resultados indicaban que, en la cepa mutante de levadura, la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 sobre el crecimiento de los cultivos aumentaba y era más prolongada en el tiempo, según el pH del medio se acercaba a la neutralidad.

4.3.3. La concentración de iones K^+ del medio de cultivo afecta a la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en el doble mutante *trk1 trk2*

Como hemos mostrado anteriormente, en la cepa silvestre de levadura la proteína Vpu perdía su actividad cuando había exceso de iones K^+ en el medio de cultivo. La cepa mutante *trk1 trk2* de *Saccharomyces cerevisiae* al tener deletados los genes principales implicados en el transporte de potasio, tiene afectado el intercambio iónico con el medio extracelular. Esto nos hizo

reflexionar sobre si la proteína Vpu en esta cepa, en presencia de potasio, podría tener un comportamiento diferente al mostrado en la cepa silvestre. Para responder a esta pregunta realizamos cinéticas de crecimiento de cultivos de levadura crecidos en medio líquido con distintas concentraciones de KCl (Fig. 22). El crecimiento celular resultó ser dependiente de la concentración de K^+ en el medio. En medio con concentración mínima de potasio el crecimiento del cultivo era lento y finalizaba en pocas generaciones. Por el contrario cuando el potasio se encontraba en exceso, el crecimiento celular era más rápido y se conseguía mayor número de células en el cultivo. Además, la proteína Vpu permitía que fuera más temprano el inicio del crecimiento, estimulando hasta un 800 % el crecimiento celular.

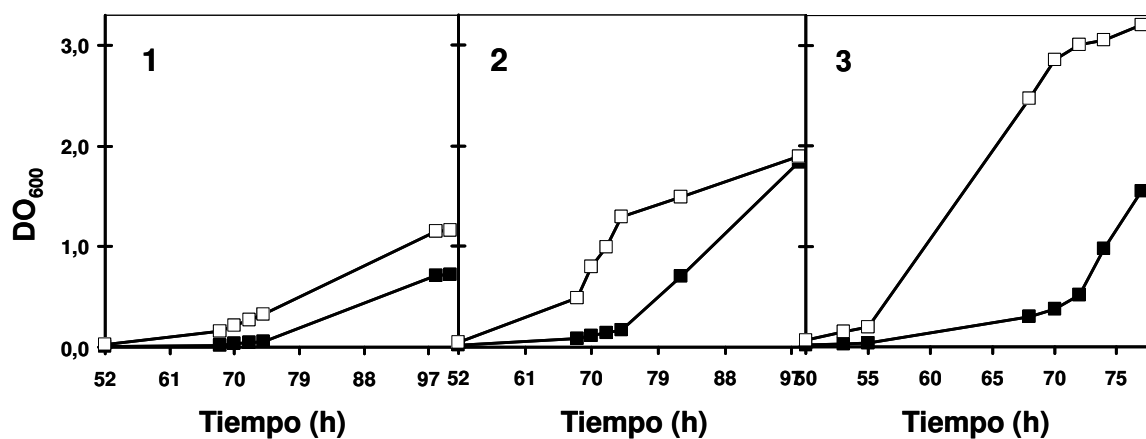


Figura 22: Influencia del ión K^+ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Cinética de crecimiento en medio a pH 7,0 y con KCl 17mM,(1), 37mM (2) ó 107 mM (3). Los cultivos provenían de un inóculo común con KCl 107mM. El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa. Control (■), Vpu (□).

Estos datos indicaban que en la cepa mutante *trk1 trk2* la estimulación del crecimiento celular producida por la proteína retroviral Vpu era fuerte cuando el potasio estaba en exceso en el medio de cultivo.

4.3.4. La presencia de amonio en el medio de cultivo disminuye la actividad de la proteína Vpu en el mutante *trk1 trk2*

El mantenimiento de la concentración intracelular de los metabolitos dentro de los límites biológicos, es uno de los desafíos de los microorganismos. Este mantenimiento de la homeostasis metabólica es llevado a cabo controlando la actividad y concentración de enzimas celulares y proteínas transportadoras. Por ello, el desequilibrio en un ión modifica el transporte de otros iones. El amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las levaduras. Sus características iónicas son muy parecidas a las del ión potasio, por lo que bajo ciertas condiciones puede ser incorporado a la célula a través de los transportadores de potasio (Hess *et al.*, 2006).

Nos planteamos analizar si en la cepa mutante, que requiere un exceso de K^+ para garantizar el crecimiento celular, la actividad de la proteína viral Vpu era dependiente de la presencia de amonio en el medio de cultivo. Analizamos el crecimiento, en medio sólido, de cultivos de la cepa mutante transformada con pEMBlyex4 ó pEMBlyex4*vpu* cuando el medio contenía o no amonio. Este ensayo se llevó a cabo utilizando, en paralelo, el medio YNB convencional y un medio YNB (Difco) sin sulfato amónico. Para garantizar el crecimiento celular el medio sin amonio fue suplementado con arginina 10 mM como fuente de nitrógeno (cantidad equivalente a la que se añade al medio con amonio para alcanzar pH 7,0). Finalmente, el pH de este medio fue ajustado a pH 7,0 con Tris. Este ensayo se llevó a cabo utilizando varias concentraciones de potasio (Fig. 23). El experimento se realizó utilizando como inóculo un cultivo crecido, en medio con amonio, hasta la fase exponencial. En placas con medio inductor que contenía, o no, amonio se sembraron diluciones seriadas del cultivo. Después de cinco días de incubación, se observó el crecimiento obtenido en el medio con amonio. Detectamos que el cultivo del transformante pEMBlyex4*vpu* podía crecer con incluso con la mínima concentración de KCl, 7mM. Sin embargo, el cultivo control necesitaba mayor concentración de KCl en el medio, hasta 17 mM. Cuando el medio no contenía amonio el crecimiento de estos cultivos era más lento, tardaban ocho días en crecer. Además, estos cultivos

precisaban de mayores concentraciones de potasio en el medio para poder crecer. El cultivo control aumentaba seis veces su requerimiento de potasio, mientras que el cultivo Vpu solo 1,5 veces.

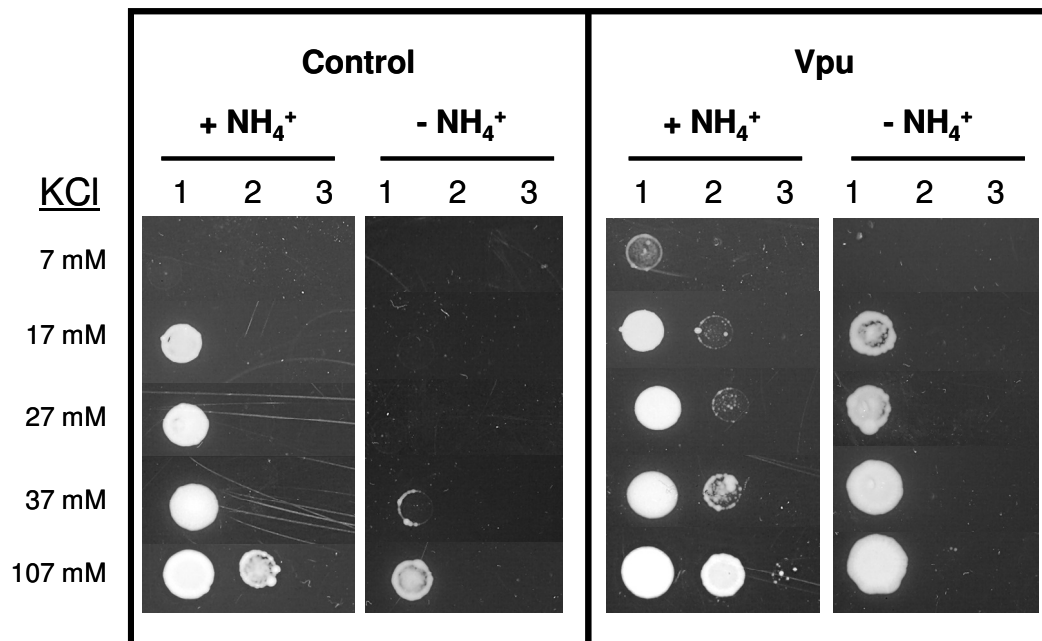


Figura 23: Efecto del ión NH₄⁺ sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Diluciones seriadas de los cultivos en medio sólido a pH 7,0 conteniendo o no (NH₄)₂SO₄ 37 mM. Los cultivos inoculados a DO₆₀₀ 0,5 (1) fueron diluidos ¹/₅ de forma seriada (2-3). Se depositaron 3 μ l de cada dilución en la placa con el medio medio correspondiente. Las placas se incubaron durante 5 días (+NH₄⁺) ó 8 días (-NH₄⁺).

Estos datos indicaban que la calidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo afectaba a la actividad estimuladora de la proteína Vpu. Cuando la eficiencia metabólica de la fuente de nitrógeno era menor, Vpu resultaba más activa.

4.3.5. La actividad estimuladora de la proteína Vpu en el mutante *trk1 trk2* aumenta en condiciones de déficit de nutrientes

La delección de los principales genes implicados en el transporte de potasio produce déficit de crecimiento en la cepa mutante *trk1 trk2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunas proteínas de membrana de la levadura pueden incrementar el transporte de K^+ al interior celular y compensar ese déficit de crecimiento. Además, según las condiciones de K^+ , la estabilidad de estas proteínas en la membrana puede variar. Este es el caso de transportadores de nutrientes como del azúcar, del inositol y de aminoácidos como la histidina o la arginina (Wright *et al.*, 1997; Perez-Valle *et al.*, 2007). Nosotros nos planteamos si, como en el caso de la cepa silvestre, el exceso de adenina modificaría el crecimiento de esta cepa y como consecuencia alteraría la actividad de la proteína Vpu. Para aclarar este punto comparamos las cinéticas de crecimiento, en medio mínimo y en medio con exceso de adenina, del mutante transformado con el plásmido vacío o portando la secuencia *vpu* (Fig. 24). El experimento se realizó utilizando cultivos de levadura crecidos hasta la fase de exponencial de crecimiento, en medio con 20 mg/l o con 40 mg/l de adenina. Con estos cultivos se inoculó medio mínimo inductor que contenía la correspondiente concentración de adenina. A lo largo del tiempo se tomaron muestras para medir el crecimiento celular. Los dos cultivos de levadura mostraron un adelanto en el inicio de su crecimiento cuando el medio contenía adenina 40 mg/l. En estas condiciones de exceso de adenina el efecto estimulador de la proteína Vpu no se apreciaba, ambos cultivos mostraron un perfil de crecimiento similar; contrariamente a lo observado cuando la concentración de adenina en el medio era mínima,. Estos resultados mostraban que, únicamente en condiciones limitantes para la base nitrogenada, la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 confería una ventaja para el crecimiento de las células mutantes $\Delta trk1,2$.

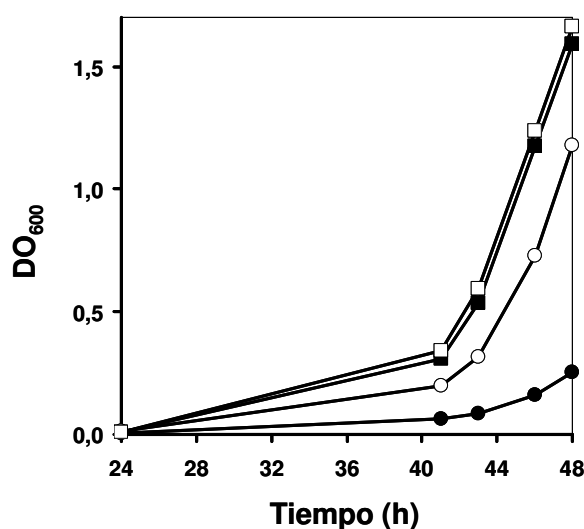
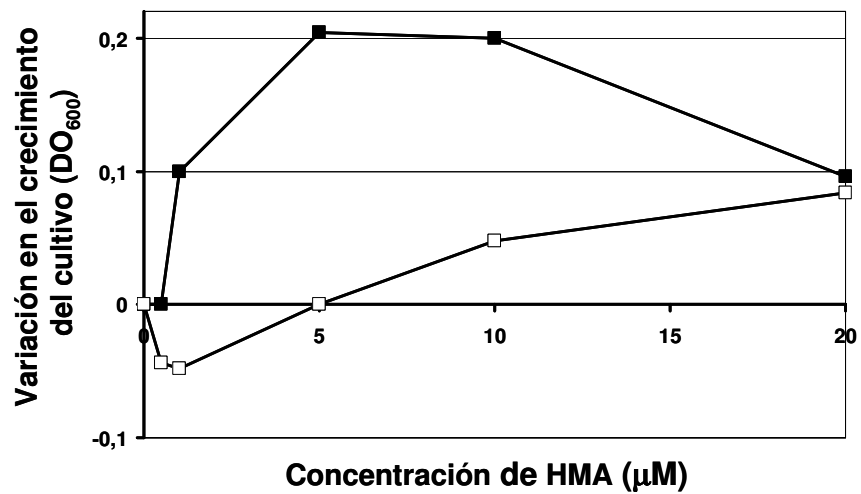


Figura 24: Influencia de la adenina sobre la actividad de la proteína Vpu del VIH-1 en cultivos $\Delta trk1,2$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Cinética de crecimiento en medio a pH 6,5, con KCl 107 mM y en presencia de Ade 20 mg/l: Control (●) y Vpu (○) o de Ade 40 mg/l: Control (■) y Vpu (□). Los cultivos provenían de un inóculo con la misma cantidad de adenina. El tiempo se midió a partir de la inoculación de medio mínimo con galactosa.

4.3.6. La proteína Vpu del VIH-1 es menos activa en el mutante de levadura en presencia de HMA

El mutante *trk1 trk2* de *S. cerevisiae* tiene alterado el transporte de potasio a través de la membrana y como consecuencia su crecimiento es deficiente. La proteína Vpu es capaz de restituir el crecimiento celular y devolverlo a valores similares a los de la cepa silvestre. En este trabajo se ha demostrado que la HMA revertía la actividad de la proteína Vpu en la cepa silvestre de levadura, por lo que nos pareció interesante estudiar el efecto de este compuesto sobre la actividad de la proteína retroviral en la cepa mutante (Fig. 25). Para ello, se hicieron cultivos en medio líquido en presencia de cantidades variables de HMA y se dejaron crecer hasta que el cultivo sin HMA (cultivo referencia) alcanzó la fase exponencial. En este momento se tomaron muestras de todos los cultivos para ver su crecimiento celular con respecto al cultivo referencia (Fig. 25A).

A.



B.

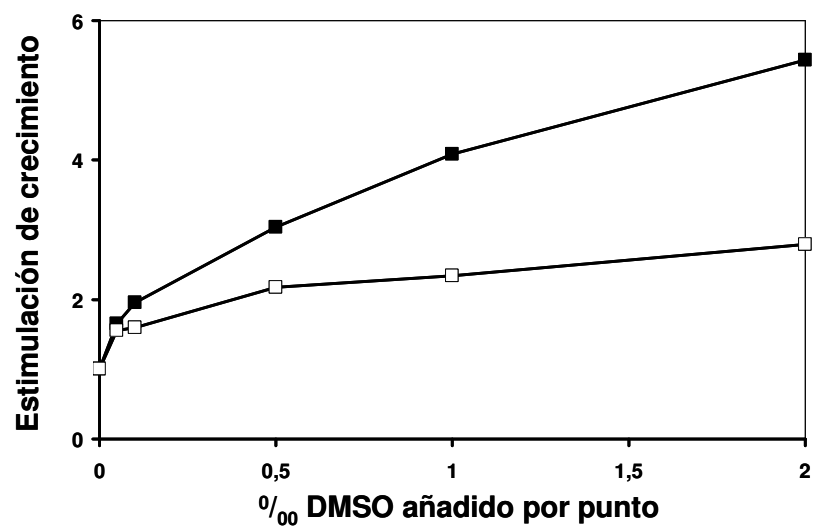


Figura 25: Efecto de la adición de 5-(N,N-hexametilen)-amilorida al medio de cultivo, sobre el crecimiento de la cepa mutante. Panel A: Crecimiento de cultivos en medio mínimo con galactosa a pH 7,0 y KCl 107mM en presencia de HMA. En cada concentración de HMA, se muestra el valor obtenido después de restar la DO₆₀₀ en medio con el correspondiente volumen del solvente (DMSO). Panel B: Efecto genuino del solvente sobre el crecimiento de cada cultivo. Control (■), Vpu (□).

Se observó que a concentraciones inferiores a 5 μM , HMA provocaba el retraso del crecimiento del cultivo Vpu. Este efecto no se producía con concentraciones superiores de HMA. Por el contrario, en el cultivo de levaduras control se observó una estimulación del crecimiento con todas las concentraciones de HMA ensayadas (1-20 μM). También se analizó el efecto del DMSO, por sí mismo, sobre el crecimiento de los cultivos (Fig. 25B). Ambos cultivos sufrieron una estimulación del crecimiento en presencia de DMSO. Sin embargo, mientras que en el caso del cultivo control la estimulación aumentaba según lo hacían las concentraciones ensayadas de DMSO, en el cultivo Vpu la estimulación era constante e inferior a la sufrida por el cultivo control. En ambos cultivos el efecto de HMA a concentraciones superiores a 5 μM puede quedar enmascarado por el fuerte efecto estimulador del DMSO. Los resultados sugirieron que el tratamiento con HMA eliminaba en parte el defecto de crecimiento en los cultivos de la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, el tratamiento con HMA revertía el fenotipo de estimulación de la proteína viral Vpu, observado en la cepa mutante sin tratar, dando lugar a un fenotipo de inhibición. Sin embargo, cuando la concentración del solvente era elevada, la actividad estimulante del DMSO sobre el crecimiento celular, junto con la actividad estimulante de la proteína retroviral, impedía detectar ningún efecto significativo de HMA sobre la actividad de Vpu en la cepa mutante.

4.3.7. La actividad de la proteína Vpu protege a las células $\Delta\text{trk1,2}$ de la acción tóxica del antibiótico higromicina B

La higromicina B es un antibiótico aminoglicósido que inhibe la síntesis de proteínas (González *et al.*, 1978). A bajas concentraciones las células no son permeables a este inhibidor. Sin embargo, cuando la membrana celular está alterada, el antibiótico es capaz de penetrar al interior de la célula, bloquear la traducción de los mensajeros celulares y finalmente provocar la muerte celular.

Como consecuencia de la alteración en la entrada del ión K^+ , la cepa mutante *trk1 trk2* de *Saccharomyces cerevisiae* tiene hiperpolarizada su membrana celular, el interior de la célula es más negativo de lo habitual (Madrid *et al.*, 1998). Esto provoca la hipersensibilidad de la levadura a la entrada del antibiótico higromicina B (Perlin *et al.*, 1988).

Dado que la proteína Vpu es un canal iónico y que complementa el crecimiento de estos mutantes, nos planteamos estudiar si esta proteína revertía la sensibilidad de las células a higromicina B. Para ello, se prepararon cultivos con medio líquido que contenía distintas concentraciones del antibiótico. Los cultivos tratados se dejaron crecer hasta que el cultivo referencia, sin tratar, alcanzó la fase exponencial. En ese momento se tomaron muestras de todos los cultivos para comparar su crecimiento celular con respecto al cultivo referencia. Además, se estudió el comportamiento celular en condiciones crecientes de ión potasio 37 mM y 107 mM (Fig. 26). Después de varios días de incubación se observó que, en el medio que contenía niveles moderados de ión K^+ , bajas concentraciones de higromicina B resultaban tóxicas para las células de levadura. Los cultivos celulares crecidos en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ higromicina B mostraban un 25% de inhibición en su crecimiento. Sin embargo, bajo estas mismas condiciones de cultivo, la proteína Vpu protegió del efecto tóxico del antibiótico. Cuando el cultivo se trató con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico, el cultivo control resultó inhibido hasta el 65% y la proteína Vpu seguía protegiendo al cultivo. A partir de 25 $\mu\text{g/ml}$ la higromicina B resultaba muy tóxica para los cultivos. En los ensayos realizados con concentración mayor del ión potasio en el medio (107 mM), se vio que era necesaria una concentración de mayor de higromicina B, 10 $\mu\text{g/ml}$, para inhibir el crecimiento del cultivo control. En este caso también la proteína Vpu protegía a las células de la actividad del antibiótico, si bien eran necesarias dosis más altas para alcanzar la misma protección que cuando la concentración de K^+ en el medio era menor. Con esta concentración de ión K^+ en el medio se necesitó una dosis de 75 $\mu\text{g/ml}$ para que higromicina B resultase tóxica a las células.

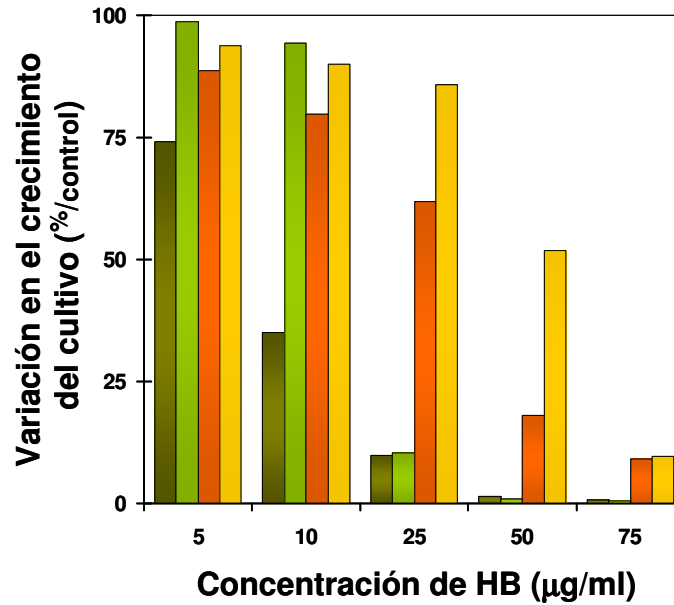


Figura 26: Sensibilidad de la cepa mutante a concentraciones crecientes de higromicina B. Variación en el crecimiento de los cultivos en medio mínimo con galactosa a pH 7,0 y KCl 37mM ó 107mM en presencia de diversas concentraciones de higromicina B. KCl 37mM: Vector (■) y Vpu (■). KCl 107mM: Vector (■) y Vpu KCl 107mM (■).

Por tanto, nuestros resultados indicaban que la proteína viral Vpu protegía a las células $\Delta trk1,2$ del fenómeno de hipersensibilidad a la higromicina B, producido por el déficit, a nivel de membrana, en el transporte de entrada de K^+ en la célula.

5. DISCUSIÓN

5.1. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE MANIPULACIÓN DE LOS CULTIVOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA LOGRAR UNA EXPRESIÓN EFICIENTE DE LOS GENES ACCESORIOS RETROVIRALES.

En este trabajo se ha utilizado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema eucariota de expresión para los genes accesorios del VIH-1. Este sistema ha demostrado ser útil en la caracterización del efecto de la proteína accesoria Vpu del VIH sobre el transporte de iones y la permeabilidad en la membrana plasmática.

Durante la puesta a punto de este sistema de expresión se utilizó la proteína Vpr del VIH-1 como control. La proteína Vpr produce, en células de mamífero, la detención del ciclo celular en la fase G2/M del crecimiento. Esta detención del ciclo celular proporciona una ventaja para el virus, ya que los niveles de transcripción virales son mayores durante la fase G2 (Goh *et al.*, 1998). Como las rutas reguladoras del ciclo celular están altamente conservadas en células eucariotas (Warbrick y Fantes, 1988; Krylov *et al.*, 2003), la expresión de la proteína Vpr en las células de levadura también detiene el ciclo celular (Macreadie *et al.*, 1995). En este trabajo se logró reproducir, en cultivos de *Saccharomyces*, esta actividad citotóxica de la proteína viral.

En los organismos unicelulares el crecimiento y proliferación es regulado por la disponibilidad de nutrientes. Como ya se ha comentado en este trabajo, los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* muestran varias fases de crecimiento. Las fases de latencia y de entrada en crecimiento exponencial expresan el tiempo empleado por el cultivo en reparar y reconstruir sus sistemas enzimáticos. Cuando a un cultivo de levaduras se le modifica el medio de crecimiento, el cultivo entra en fase de latencia porque utiliza la energía disponible para sintetizar las enzimas necesarias para su desarrollo en las

nuevas condiciones ambientales y nutricionales. En *Saccharomyces*, cuando la glucosa está presente en el medio, la transcripción de los genes GAL está reprimida debido al fenómeno de la represión catabólica (Gancedo, 1998). La sustitución de la fuente de carbono del medio, de glucosa a galactosa, da lugar a una larga fase de latencia durante la cual se desreprimen los genes GAL y se sintetizan las enzimas necesarias para la utilización de esta fuente de carbono. Nosotros observamos que cuando los cultivos son portadores de la construcción plasmídica con los genes virales *vpr* o *vpu*, la fase de latencia de los cultivos aumenta y alcanza 52 h en el caso de Vpr y 8 h en el caso de Vpu. Así, el retraso observado en el crecimiento de estos cultivos de levadura podría atribuirse a la actividad de las proteínas retrovirales correspondientes.

Otro factor que afecta a la duración de la fase de latencia de un cultivo es el tamaño inicial de dicho cultivo. Cuanto mayor sea la densidad poblacional inicial del cultivo, menor será la duración de su fase de latencia. En nuestros ensayos, la detección de la actividad de las proteínas virales mejoraba cuanto menor era la densidad poblacional del cultivo. Así, los cultivos Vpr con DO_{600} inicial 0,005 seguían sin crecer después de 96 h de incubación. La actividad inhibidora de la proteína Vpu resultó mucho más débil que la de proteína Vpr. Los cultivos portadores de la proteína Vpu tenían una fase de latencia 8 h más larga que la del cultivo control para DO_{600} inicial 0,005. En ambos casos, la prolongación de la fase de latencia respecto del cultivo control refleja el daño celular que producen las proteínas virales; frente a este daño, la célula es capaz de reponerse con mayor efectividad en el caso de la proteína Vpu que en el de la proteína Vpr. *S. cerevisiae* se divide un número finito de veces antes de llegar a la senescencia. La edad celular de sus cultivos se define en función del número de generaciones que transcurren hasta que finaliza su crecimiento, si bien este término no es absoluto. Para alcanzar la misma densidad de población, en un cultivo en el que inicialmente hay un número pequeño de individuos transcurrirán más generaciones que en uno con una DO_{600} mayor (Sumner y Avery, 2002). Además, la proporción de células viejas en una población de levaduras disminuye exponencialmente cuanto menor es la edad del cultivo. Así, nuestra observación de que la actividad de las proteínas

retrovirales era menor cuanto mayor era el número inicial de células del cultivo, podría explicarse por una mayor proporción de individuos envejecidos en los cultivos densos. Transcurridas pocas generaciones, estos cultivos son más resistentes a distintos tipos de estrés y resultan menos afectados por la actividad de ambas proteínas virales.

Los cultivos de levadura que están cerca de la fase estacionaria de su crecimiento tienen cambios en su patrón de síntesis proteica que hace que sean más resistentes al calor y a otros estreses, comparados con cultivos que se encuentran en fase exponencial (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Werner-Washburne *et al.*, 1996). En nuestro trabajo observamos que la actividad de la proteína Vpu no era detectable cuando el cultivo inóculo a inducir se encontraba al inicio de la fase exponencial. Tampoco era detectable si el cultivo estaba entrando ya en la fase estacionaria. En esta fase el cultivo celular sufre un cambio en la composición de su pared que le hace más resistente al estrés ambiental (Werner-Washburne *et al.*, 1993). La nueva composición de la pared celular y el engrosamiento de la misma podrían alterar el intercambio de ciertos nutrientes o iones, protegiendo a la célula frente a la actividad del canal iónico Vpu. Por otra parte, se ha demostrado que durante la fase estacionaria del crecimiento disminuye el número de ribosomas, por lo que los niveles proteína Vpu sintetizada en esta fase deben ser inferiores. Nuestros resultados muestran que la fase exponencial del crecimiento del inóculo es la más adecuada para inducir la síntesis de esta proteína de membrana. En esta fase de crecimiento los cultivos tienen una actividad metabólica máxima que permite que el número de células aumente exponencialmente. Cuando los cultivos están en constante división la pared celular es más delgada que cuando no se dividen y esto podría provocar que, durante esta fase, la célula sea más sensible a la alteración en el transporte iónico a través de la membrana provocado por la proteína Vpu.

Los marcadores más utilizados para la selección de transformantes de *Saccharomyces* complementan auxotrofías de las células receptoras del plásmido. Estos marcadores son alelos silvestres de genes de levadura que codifican para enzimas de la ruta biosintética de determinados nutrientes

esenciales. Este es el caso de los genes *URA3* (gen codificante para la orotidina-5'-fosfato decarboxilasa, enzima esencial en la biosíntesis de pirimidinas) o *HIS3*, *TRP1* y *LEU2* (genes codificantes para enzimas esenciales en la síntesis de los aminoácidos L-histidina, L-triptófano y L-leucina respectivamente) (Botstein y Davis, 1982; Pronk, 2002). El vector de expresión utilizado en nuestro sistema, pEMBLyex4, contiene los marcadores de selección *URA3* y *LEU2d*. Dado que el marcador *LEU2d* tiene el promotor del gen parcialmente defectivo, su expresión es muy débil y se requiere un elevado número de copias del mismo para que las células auxótrofas para leucina sean capaces de crecer en condiciones restrictivas del aminoácido (Erhart y Hollenberg, 1983). Durante este trabajo analizamos si la secuencia *leu2d* de dicho plásmido complementaba la auxotrofia de las células de levadura para la leucina. Observamos que el crecimiento del cultivo control apenas se alteraba por la presencia/ausencia de leucina en el medio, lo que indicaba complementación de la auxotrofia por el plásmido. Sin embargo, en los cultivos transformados con las secuencias virales no se detectaba la actividad de las proteínas retrovirales cuando el medio de crecimiento estaba suplementado con leucina. La selección de levaduras que producen un elevado número de copias del plásmido portador del marcador *LEU2d*, permite también obtener más copias del gen heterólogo *vpr* o *vpu*. Por tanto, se podría suponer que el crecimiento celular en ausencia de leucina provocaría una cantidad de proteína viral mayor que en presencia de leucina. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la cantidad de proteína viral acumulada en el interior celular era similar en ambas condiciones (Resultados no mostrados). Alternativamente, podría ocurrir que la actividad de ambas proteínas alterase el transporte de este aminoácido o su metabolismo, reduciendo finalmente el crecimiento celular por exceso de nutrientes nitrogenados (Hess *et al.*, 2006). Este fenómeno sí podría explicar la diferencia de actividad observada en las proteínas retrovirales en función de la existencia o no de leucina en el medio.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR LA PROTEÍNA VPU EN LA CEPA SILVESTRE Y MUTANTE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Durante la infección de las células por el VIH-1 se producen cambios en la permeabilidad de su membrana celular. Como consecuencia de estas alteraciones en la membrana producidas por el virus se modifica el contenido intracelular de cationes. Aumenta la concentración de Na⁺ y de K⁺ intracelular, altera los flujos de Ca²⁺ y disminuye el pH intracelular (Lynn *et al.*, 1988; Makutonina *et al.*, 1996; Voss *et al.*, 1996). En estos cambios participan proteínas virales descritas como canales iónicos en varios sistemas celulares, como la proteína Vpu y la proteína Vpr, capaz de provocar corrientes eléctricas en neuronas (Piller *et al.*, 1996). Otras proteínas del VIH-1 también alteran las propiedades electroquímicas de las membranas sin ser canales iónicos, Tat bloquea canales de Ca²⁺ en células dendríticas (Poggi *et al.*, 1998) y Nef altera la concentración intracelular de K⁺ en linfocitos T CD4 (Choi *et al.*, 2008). Las alteraciones en el transporte iónico a través de la membrana y en la permeabilidad de la misma, son mecanismos importantes para la citopatogénesis del VIH-1. Las primeras sospechas de que la proteína Vpu era un canal iónico surgieron al observar su similitud estructural con otro canal iónico, la proteína M2 del virus Influenza A (Klimkait *et al.*, 1990; Schubert *et al.*, 1994). Estas sospechas aumentaron con las evidencias experimentales de que la proteína Vpu producía cambios de conductancia en bicapas lipídicas (Ewart *et al.*, 1996). Además, se descubrió que la capacidad para formar canales iónicos correspondía al fragmento transmembrana de la proteína. Otros estudios en oocitos de *Xenopus*, *E. coli* y células de mamífero también evidenciaban que Vpu producía cambios de permeabilidad de membrana a iones y moléculas de pequeño tamaño (Schubert *et al.*, 1996; González y Carrasco, 1998). Numerosos trabajos muestran que es posible la utilización de levaduras como un sistema sencillo para la expresión de canales iónicos (Gupta y Canessa, 2000; Ali *et al.*, 2006; Schwarzer *et al.*, 2008). Pero, nuestro

trabajo es el primero que utiliza las levaduras para la caracterización del supuesto canal iónico que formaría la proteína Vpu.

En la cepa silvestre de levadura la presencia de la proteína Vpu provoca un retraso en el crecimiento celular. La actividad de esta proteína, como canal iónico, podría alterar el transporte iónico a través de la membrana celular provocando el retraso celular observado en los cultivos Vpu. Ensayos realizados por otros autores con cepas de levadura defectivas en la toma de potasio, muestran que la expresión de determinados canales iónicos, como gplRK1 de vertebrados o el canal KAT1 de *Arabidopsis thaliana*, repone el déficit de crecimiento de estas cepas (Tang *et al.*, 1995). Esto nos llevó a examinar el comportamiento de la proteína Vpu en una cepa de levadura defectiva en la toma de potasio. En esta cepa mutante, el crecimiento celular está inhibido como consecuencia de la pérdida de los principales transportadores de potasio. Los resultados mostraron que la presencia de la proteína viral en esta cepa recupera el crecimiento celular devolviéndolo a un nivel similar al de la cepa silvestre. Además, indican que la proteína Vpu podría formar canales iónicos en este sistema celular eucariota a nivel de la membrana plasmática. En resumen, la actividad de la proteína Vpu altera el transporte iónico a través de la membrana de la célula, retrasando el crecimiento de la cepa silvestre. Esta alteración del transporte iónico complementa las deficiencias en la toma de potasio en la cepa mutante, permitiendo que se restituya su crecimiento celular.

La proteína retroviral Vpu parece mostrar una actividad dependiente de pH, siendo mínima a pH ácido externo y máxima a un pH neutro externo. En la cepa $\Delta trk1,2$, donde la ausencia de los dos principales transportadores de potasio provoca un déficit de crecimiento a pHs ácidos, la proteína Vpu también posee mayor actividad a pH neutro. Otros canales iónicos expresados en levaduras han mostrado ser más activos a pH neutro. Por ejemplo, el canal Kir2.1p murino es un canal rectificador de potasio que introduce potasio en la célula. Cuando los cultivos de levaduras crecen en un medio con una cantidad de potasio mínima (pH 3,0) dicho canal no es activo. Sin embargo, cuando el pH del medio es 7,0 el canal introduce potasio de una manera masiva en el

interior celular, produciendo la muerte de las células (Kolacna *et al.*, 2005). Los cultivos de la cepa silvestre sufren una inhibición del crecimiento cuando la proteína Vpu es activa. Se podría pensar que, al igual que ocurre con el canal Kir2.1p, la actividad de la proteína Vpu está produciendo la muerte celular a pH 6,5 y 7,0. Al observar el tiempo de generación de estos cultivos se ve que, una vez que cada cultivo logra alcanzar la fase exponencial, éste es el mismo. Además, en los ensayos realizados a pH 7,0 en medio de cultivo sólido, varios días después de que el control hubiera detenido su crecimiento, el cultivo que expresaba *vpu* alcanzaba el mismo crecimiento que el control. Estos datos indicarían que la proteína Vpu puede provocar cambios en el metabolismo de las células pero sin conducir a su muerte. Nuestros resultados indican que la actividad de la proteína Vpu en *Saccharomyces* es sensible al pH del medio, a diferencia del estudio de Schubert en el que la proteína Vpu sintetizada en oocitos de *Xenopus*, mostraba una medida de conductancia independiente de pH (Schubert *et al.*, 1996).

Nuestros resultados muestran que la concentración de ión K^+ en el medio de cultivo afecta a la actividad de la proteína viral. A medida que su concentración aumenta en el medio de cultivo, la actividad Vpu disminuye en la cepa silvestre y es más fuerte en la cepa mutante. El efecto producido en la cepa silvestre podría deberse a que al aumentar la concentración de KCl del medio, se facilitaría la entrada de K^+ en la célula. Como consecuencia, quizá se produzca la salida de los H^+ intracelulares, perjudiciales para la célula, mediante su intercambio con el K^+ extracelular. Esto supondría una ventaja para la célula y podría explicar el aumento en la tasa de crecimiento celular en presencia de KCl 107 mM. En este trabajo se muestra que la expresión de la proteína Vpu en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en los transportadores de potasio, restituye la capacidad de crecimiento de los mismos. Por el contrario, cuando el medio de cultivo contiene hasta 107 mM de ión K^+ , los dobles mutantes $\Delta trk1,2$ que no expresan la proteína Vpu alcanzan menos del 50% del crecimiento de la cepa silvestre. El crecimiento de esta cepa, W Δ 3, resulta alterado por la actividad de la proteína Vpu independientemente de la concentración de K^+ en el medio, aunque cuando la

concentración de potasio era 107 mM la actividad de la proteína viral se apreciaba antes y duraba más tiempo. Esto podría ser porque en esta cepa la actividad de la proteína viral elimine la dependencia celular por K^+ , al modificar el transporte iónico a través de la membrana de la levadura. Anteriormente otros autores habían propuesto que la proteína Vpu produciría alteraciones del transporte iónico en bicapas lipídicas; si bien, la proteína viral tendría una actividad débil. (Mehnert *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, la supresión de los requerimientos de potasio en el mutante cuando la proteína Vpu es activa, nos podría sugerir que la toma de potasio en estas levaduras se estaría realizando a través de la proteína viral. Alternativamente, el efecto de Vpu sobre el transporte de este ión podría ser indirecto. El mantenimiento del potencial de membrana en *S. cerevisiae* está controlado por el flujo de los cationes H^+ y K^+ . En condiciones naturales la entrada masiva de K^+ produce despolarización de la membrana. Algunos canales de K^+ de la levadura, como Tok1, se activan en condiciones de despolarización y sacan K^+ fuera de la célula para regenerar el potencial de membrana. De hecho, se ha llegado a proponer este canal de K^+ como la diana de la toxina de origen viral K1 que produce muerte en la levadura por un exceso de salida de K^+ (Sesti *et al.*, 2001). De forma semejante podría actuar Vpu. Se sabe que la proteína Vpu induce despolarización de membranas en células de mamífero (Marassi *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2010) y se ha sugerido que Vpu podría interaccionar con TASK-1 (un canal rectificador de K^+ en células de mamífero) inactivando dicho canal (Hsu *et al.*, 2004). Por tanto proponemos que, en *S. cerevisiae*, la despolarización de membrana provocada por Vpu podría originar una activación de Tok1 que daría lugar a la pérdida de K^+ y consiguiente daño celular. Esto explicaría el retraso en el crecimiento de la cepa silvestre cuando sintetiza la proteína Vpu. En la cepa mutante, donde la delección de *trk1* y *trk2* produce hiperpolarización en la membrana plasmática (Madrid *et al.*, 1998), la despolarización provocada por Vpu podría regenerar el potencial de membrana contribuyendo a una mejora del crecimiento celular. Así, la liberación de las partículas virales observado en infecciones celulares cuando el VIH-1 es portador del gen *vpu*, podría estar mediado por la alteración del transporte de K^+ a través de la membrana celular inducida por la proteína Vpu (Fig. 27). Este efecto de la proteína viral podría ser directo, siendo la

propia proteína retroviral la que transporte el K^+ o bien transporte de otro catión que consiguientemente alteraría el transporte de K^+ para mantener la homeostasis celular. Alternativamente, el efecto de Vpu podría ser indirecto interaccionando con alguna proteína transportadora de K^+ celular, como TASK-1 con la que se ha descrito que interacciona *in vitro*, inhibiéndola. En ambos casos la desestabilización de la membrana celular inducida por Vpu permitiría la salida de los viriones fuera de la célula.

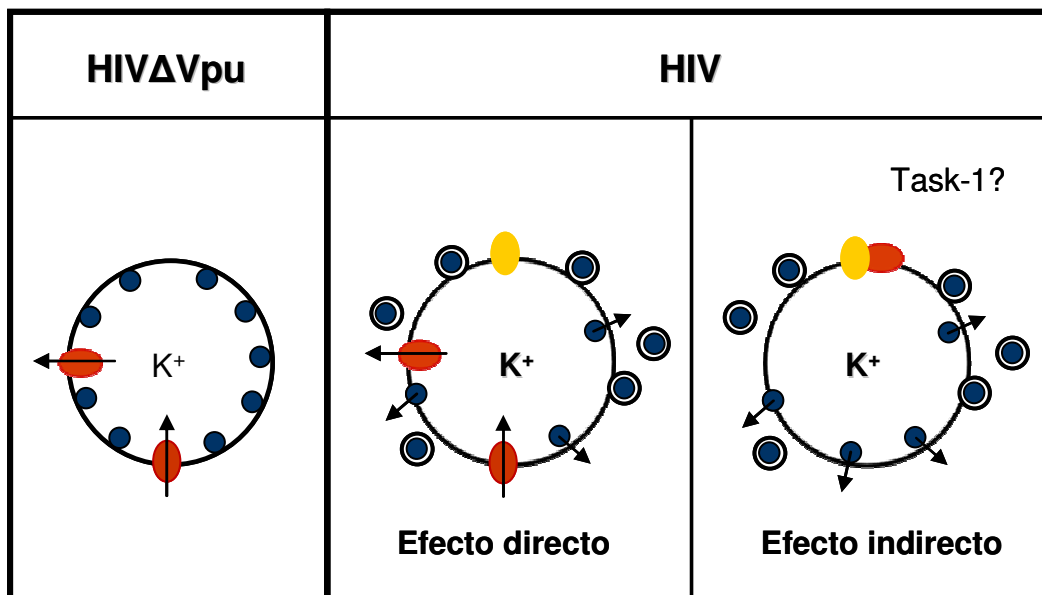


Figura 27: Modelo propuesto para la actividad de la proteína Vpu durante la salida del virus, mediante modificación del transporte de K^+ a través de la membrana de la célula infectada. Partículas virales: ●, Vpu: ●, canal celular de K^+ : ●.

En nuestros experimentos cuando el medio de cultivo contiene un exceso de adenina la actividad de la proteína Vpu aumenta en la cepa silvestre y disminuye en la cepa mutante. En *Saccharomyces cerevisiae* los genes de la ruta biosintética de la adenina son reprimidos transcripcionalmente por la presencia de purinas en el medio extracelular y activados por su ausencia

(Daignan-Fornier y Fink, 1992). La mutación que posee la cepa W303-1B en el locus 2 del gen *ade* impide la conversión del 5-(fosforibosil)aminoimidazol en un derivado carboxilado (Mortimer y Schild, 1980). Como consecuencia, cuando la célula crece en un medio extracelular con déficit de purinas, activa la ruta biosintética de la adenina. Esto provoca que un intermediario metabólico de la adenina, de color rojo, se acumule en el interior celular. Este metabolito resulta tóxico para las células, por lo que tras escasas generaciones celulares las células terminan muriendo. Por ello en estas células ya dañadas, el enlentecimiento del crecimiento inducido por la proteína Vpu podría no ser visible. Por el contrario, cuando las células crecen en un medio con exceso de adenina, al no sintetizarse este intermediario tóxico, las células estarían en mejor estado metabólico y serían más susceptibles de la actividad de la proteína viral. El mutante defectivo *trk1 trk2* no acumula este metabolito tóxico, por lo que el déficit de adenina aumenta la sensibilidad del cultivo a la proteína Vpu. La adenina contenida en el medio extracelular es incorporada a la célula por la permeasa de purinas-citosinas (PCP) por medio de un transporte simporte con H^+ (Polak y Grenson, 1973; Hopkins *et al.*, 1988). La abundancia del nucleótido en el medio podría favorecer su incorporación a través de las proteínas PCP. Esta entrada masiva de adenina podría provocar una acidificación intracelular como consecuencia de la entrada conjunta de H^+ . Para defenderse de la disminución del pH intracelular, la levadura podría activar la ATPasa de H^+ Pma1, responsable de generar el potencial de membrana en la célula y de la regulación del pH intracelular (Goffeau y Slayman, 1981; Serrano, 1988). El potencial de membrana creado por Pma1 es el responsable del transporte de iones llevado a cabo por transportadores específicos y podría provocar un aumento en la incorporación de K^+ . Esta cepa de levadura mutante, al tener delecionados sus principales transportadores de K^+ , podría incorporar K^+ de una manera inespecífica a través de canales de baja afinidad como NSC1. De esta manera, la proteína PCP facilitaría la incorporación de K^+ y rescataría el fenotipo de la levadura silvestre, siendo redundante la actividad de la proteína Vpu y no observándose su actividad en condiciones de crecimiento con exceso de adenina.

S. cerevisiae puede utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno. Si bien su fuente favorita es el amonio, puede utilizar también glutamina, asparagina, arginina, prolina o urea (Cooper, 1982; ter Schure *et al.*, 2000). El metabolismo del potasio está íntimamente relacionado con el del amonio. Así, se sabe que cuando la levadura crece en medios con bajo contenido en potasio, el amonio puede entrar en la célula a través de los transportadores de potasio (Hess *et al.*, 2006). Nuestros experimentos muestran que la proteína Vpu es capaz de complementar la toma de potasio en el mutante *trk1,2* independientemente de la presencia del amonio en el medio. Está descrito que cuando el amonio entra excesivamente en las células como consecuencia de su transporte a través de los transportadores de potasio, resulta tóxico. Esto provoca una disminución en el número de células de los cultivos. Sin embargo, esto no ocurre en las células $\Delta trk1,2$ que sintetizan la proteína Vpu, cuando crecen en un medio con amonio y poco potasio. Por tanto, podemos concluir que la proteína Vpu no funciona como un transportador de amonio. También podríamos plantearnos que la proteína Vpu estuviese alterando el transporte de la arginina y, como consecuencia, favoreciese la entrada del K^+ en la célula. Sin embargo, nuestros resultados muestran que, con la misma cantidad de arginina en el medio de cultivo, las células tienen un crecimiento más lento y menor cuando el medio carece de amonio. Esto indicaría que las células necesitan adaptarse a la nueva fuente de nitrógeno, independientemente de la presencia de la proteína Vpu y, por ello, tardan más tiempo en crecer. Además, la eficiencia de la arginina como fuente de nitrógeno es menor que la del amonio, no permitiendo las mismas tasas de crecimiento. Estos datos indican que la complementación de la toma de potasio que produce la proteína viral Vpu en la cepa $\Delta trk1,2$, no es la consecuencia indirecta de un transporte de amonio o de arginina.

5.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VPU EN PRESENCIA DE INHIBIDORES.

La HMA ha mostrado disminuir la replicación del VIH-1 en cultivos de macrófagos derivados de monocitos de sangre humana (Ewart *et al.*, 2004). También se han creado bicapas lipídicas que contenían un fragmento de la proteína viral Vpu₁₋₃₂, en los que se ha comprobado que la HMA inhibe la actividad como canal iónico del fragmento peptídico (Römer *et al.*, 2004). El único ensayo realizado directamente con la proteína, y no sobre un fragmento de ella, consistió en la producción de VLPs de proteína Gag que contenían la proteína Vpu. En este estudio también se comprobó que la HMA inhibía la liberación de VLPs en un cultivo de células Hela (Ewart *et al.*, 2002). Incluso se han realizado simulaciones por ordenador de la estructura de ambas moléculas que han mostrado que la HMA podría bloquear la actividad de un homooligómero proteico de Vpu (Lemaitre *et al.*, 2004). Sin embargo, no hay trabajos que muestren que la HMA pueda revertir, en un sistema celular vivo, la actividad de la proteína Vpu como canal iónico. Este trabajo es el primero que analiza la actividad de la proteína Vpu completa, aislada del resto de la partícula viral y en un sistema celular vivo. Nuestros resultados han mostrado que la HMA revierte la actividad de la proteína Vpu en ambas cepas de levadura: en la cepa silvestre contrarresta el retraso en el crecimiento, mientras que en el mutante compensa la estimulación del crecimiento. Esto confirma que en un sistema celular vivo la HMA también inhibe los cambios de transporte iónico inducidos por la proteína Vpu. Nuestros datos sugieren que la actividad de la proteína Vpu puede ser revertida por la HMA a concentraciones inferiores a 5 μ M, en el sistema celular aquí desarrollado, sin problemas de toxicidad. Este compuesto ha mostrado ser activo frente a otras viroporinas. En cultivos celulares infectados con el virus de la hepatitis murina, la HMA inhibe la replicación viral. Cuando la proteína E de este virus es expresada en bicapas lipídicas, la HMA hace que esta proteína pierda su actividad como canal iónico (Wilson *et al.*, 2006). También ha mostrado inhibir la actividad como canal

iónico de la proteína p7 del VHC expresada en bicapas lipídicas (Premkumar *et al.*, 2004). Todos estos resultados nos llevan a pensar que la HMA no tendría una actividad específica frente a la proteína Vpu, sino frente a una serie de proteínas virales con actividad como canal iónico.

Se ha demostrado que la proteína Vpu del VIH-1 facilita la salida de las partículas virales de nueva síntesis. También se ha demostrado que la expresión de la proteína Vpu del VIH-1 incrementa la liberación de otros virus como el virus Sindbis, el virus de la leucemia murina o el virus Visna (Göttlinger *et al.*, 1993; González y Carrasco, 2001). Esto sugiere que la proteína Vpu altera la estructura de la membrana celular para facilitar la salida de los viriones. Estudios previos han mostrado que la presencia de la proteína Vpu en células procariotas y en células COS produce un incremento en la permeabilidad a higromicina B, ONPG y lisozima (González y Carrasco, 1998). En nuestro trabajo hemos utilizado una cepa mutante de levadura *trk1,2*, muy útil en el estudio de canales iónicos por la ausencia de las principales proteínas transportadoras de potasio. Por ello, las células tienen una hiperpolarización en la membrana celular que facilita la entrada del antibiótico higromicina B (Perlin *et al.*, 1988). Nuestros resultados muestran que la presencia de una cantidad elevada de KCl (107 mM) en el medio de cultivo, parcialmente revierte la hipersensibilidad del mutante $\Delta trk1,2$ de *S. cerevisiae* a la higromicina B. Este hecho podría ser debido a una entrada inespecífica y en gran cantidad de ión K^+ en la célula. La entrada de iones con carga positiva disminuiría la hiperpolarización de la membrana celular y, como consecuencia, disminuiría la entrada del antibiótico. La presencia de la proteína retroviral Vpu también disminuye la sensibilidad celular a la higromicina. Esta tolerancia a sustancias tóxicas cuando la proteína viral es activa puede estar relacionada con una reducción del potencial de membrana, consecuencia de la alteración del transporte iónico a través de la misma. Cuando la concentración de KCl en el medio es 37 mM, inferior a los valores intracelulares, el efecto de la proteína viral es mayor que con KCl 107 mM. Nuestra opinión es que cuando el medio de cultivo contiene KCl 107 mM, la célula defectiva en el transporte de K^+ no precisa un transporte específico del catión para mantener homeostasis

intracelular y por ello no se detecta la actividad de la proteína Vpu. Algo similar ocurre con los canales iónicos AtCNGC1 y AtCNGC2 de *Arabidopsis thaliana*. La expresión en levaduras $\Delta trk1,2$ de estos canales iónicos complementa el crecimiento celular (Köhler *et al.*, 1999) y revierte parcialmente la sensibilidad a higromicina B de los mutantes (Mercier *et al.*, 2004). En la infección por VIH claramente existe una relación entre la capacidad de Vpu para formar canales iónicos y su capacidad para incrementar la liberación de partículas virales recién formadas. Los canales iónicos formados por esta proteína probablemente disminuyen el potencial de membrana en las células infectadas, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*. Esto podría producir una desestabilización en la estructura de la membrana celular que facilitaría la salida de los viriones.

En este trabajo se demuestra que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* proporciona un sistema adecuado para la expresión de la proteína viral Vpu, dando lugar a un fenotipo claramente distinguible. La proteína Vpu está directamente implicada en la salida de las partículas virales de nueva síntesis de la célula infectada. Su actividad de canal iónico contribuiría a desestabilizar la estructura de la membrana celular facilitando así la salida de los nuevos viriones. Los canales iónicos son proteínas estructurales de las membranas biológicas capaces de comunicar el medio intracelular con el extracelular. Se pueden encontrar en organismos procariontes como *Escherichia coli*, en organismos eucariotes inferiores como *Saccharomyces cerevisiae* y en eucariotes superiores como las plantas y los mamíferos. Han evolucionado de manera tal que no sólo catalizan el paso de los iones a través de las membranas biológicas sino que muchos de ellos son específicos para un ión determinado. Así se habla de canales de sodio, de potasio, de calcio, etc. Las células eucariotas utilizan los canales iónicos para producir cambios rápidos dentro de la célula en respuesta a estímulos externos (Haynes *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran que la proteína Vpu funciona como canal iónico débil en un sistema eucariota, alterando el transporte de iones a través de la membrana celular. Además, produce alteraciones en la permeabilidad celular a higromicina B y su actividad puede ser revertida por un inhibidor de canales iónicos, la HMA.

6. CONCLUSIONES

1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un excelente sistema de expresión para los genes accesorios del VIH-1. Permite reprimir e inducir la expresión de proteínas con actividad tóxica como Vpr y Vpu.
2. En este sistema eucariótico la actividad de las proteínas accesorias retrovirales producen cambios en el crecimiento de los cultivos celulares y estos cambios son detectables tanto cuantitativa como cualitativamente.
3. La detección óptima de la actividad de las proteínas retrovirales requiere que los cultivos de levadura se encuentren en crecimiento exponencial en el momento de inducir la síntesis de estas proteínas, así como utilizar en los ensayos un tamaño muy pequeño de población celular inicial.
4. La proteína Vpu del VIH-1 altera el transporte de iones a través de la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* y como consecuencia de esta alteración retrasa del crecimiento en la cepa silvestre, W303-1B. Por el contrario, en el mutante deficiente en la toma de potasio, WΔ3, la proteína Vpu restaura el crecimiento a un nivel similar al de la cepa silvestre.
5. La actividad producida por la proteína retroviral Vpu en la levadura es dependiente del pH del medio de cultivo, esta actividad es máxima cuando el valor del pH es 7,0 y disminuye progresivamente a pHs más ácidos.
6. La actividad de la proteína Vpu modifica el transporte de K^+ en la levadura; la complementación por Vpu de los defectos en la toma de K^+ de la cepa WΔ3 podría producirse mediante la alteración directa o indirecta del transporte de dicho catión. El transporte de NH_4^+ y de arginina no resultan afectados por la proteína Vpu.

7. La actividad de la proteína Vpu es dependiente de la concentración de nutrientes. En presencia de concentraciones saturantes de adenina, la actividad de la proteína retroviral resulta incrementada en la cepa silvestre mientras que resulta enmascarada en la cepa mutante.

8. El tratamiento con HMA, a concentraciones inferiores a 5 μM , revierte la actividad de la proteína Vpu en *Saccharomyces*. Estas concentraciones no presentan toxicidad para el sistema celular.

9. La actividad de la proteína Vpu disminuye la sensibilidad de la cepa W Δ 3 a la higromicina B. La alteración del transporte iónico provocado por la proteína Vpu posiblemente induce la despolarización de la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*, compensando la hiperpolarización de la membrana celular en el mutante.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adamec, T., Palková, Z., Velková, K., Stokrová, J. y Forstová, J.** (2005) Point mutation in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interactions with *Saccharomyces cerevisiae* cell structures. *FEMS Yeast Res.* 5: 331-340.
- Agirre, A., Barco, A., Carrasco, L. y Nieva, J.** (2002) Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.* 277: 40434-40441.
- Aiken, C. y Trono, D.** (1995) Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J. Virol.* 69: 5048-5056.
- Aldabe, R., Barco, A. y Carrasco, L.** (1996) Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J. Biol. Chem.* 271: 23134–23137.
- Ali, R., Zielinski, R. y Berkowitz, G. A.** (2006) Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast. *J. Exp. Bot.* 57: 125-138.
- Aloia, R., Tian, H. y Jensen, F.** (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5181-5185.
- Andersen, J. L., Le Rouzic, E. y Planelles, V.** (2008) HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 85: 2-10.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. y Gaber, R. F.** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3736-3740.
- Arthur, L. O., Bess, J. W. J., Sowder, R. C. I., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C. y Henderson, L. E.** (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science.* 258: 1935-1938.
- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I. y Guarente, L.** (1999) Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 9100-9105.
- Baltimore, D.** (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 226: 1209-1211.
- Banning C, Votteler J, Hoffmann D, Koppensteiner H, Warmer M, Reimer R, Kirchhoff F, Schubert U, Hauber J, Schindler M.** (2010) A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One.* 5: e9344.

- Bañuelos, M., Ruiz, M., Jiménez, A., Souciet, J., Potier, S. y Ramos, J.** (2002) Role of the Nha1 antiporter in regulating K(+) influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 19: 9-15.
- Bañuelos, M., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. y Potier, S.** (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*. 144: 2749-2758.
- Barco, A. y Carrasco, L.** (1998) Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J. Virol.* 72: 3560-3570.
- Barlow, K. L., Ajao, A. O. y Clewley, J. P.** (2003) Characterization of a Novel Simian Immunodeficiency Virus (SIVmonNG1) Genome Sequence from a Mona Monkey (*Cercopithecus mona*). *J. Virol.* 77: 6879-6888.
- Barré-Sinoussi, J. C., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. y Montagnier, L.** (1983) Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-871.
- Baur, A. S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, D., Cheng-Mayer, C. y Peterlin, B. M.** (1997) The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity*. 6: 283-291.
- Bentley, P.** (1968) A potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J. Physiol.* 195: 317-330.
- Bernacchi, S., Henriot, S., Dumas, P., Paillart, J. y Marquet, R.** (2007) RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: a fluorescence study. *J. Biol. Chem.* 282: 26361–26368.
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwing, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P. y Ljungdahi, P.** (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2*, and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* 47: 767-780.
- Bertl, A., Slayman, C. y Gradmann, D.** (1993) Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132: 183-199.
- Bihler, H., Slayman, C. y Bertl, A.** (2002) Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1558: 109-118.
- Blanco, R., Carrasco, L. y Ventoso, I.** (2003) Cell killing by HIV-1 protease. *J. Biol. Chem.* 278: 1086-1093.

Botstein, D. y Davis, R. W. (1982) Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. *En* "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolism and gene expression." (J. N. Strathern, E. W. Jones y J. R. Broach, Ed.), Vol. pp. 607-636. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

Bour, S., Geleziunas, R. y Wainberg, M. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol. Rev.* 59: 63-93.

Bour, S. y Strebel, K. (2000) HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system. *Adv. Pharmacol.* 48: 75-120.

Bour, S. y Strebel, K. (2003) The HIV-Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5: 1029-1039.

Bour S, S. U., Peden K, Strebel K. (1996) The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J. Virol.* 70: 820-829.

Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R. y Pietschmann, T. (2009) Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. *J. Virol.* 83: 11682-11693.

Cancio, R., Spadari, S. y Maga, G. (2004) Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates a basic site bypass. *Biochem. J.* 383: 475-482.

Carr, J., Coolen, C., Davis, A., Burrell, C. y Li, P. (2008) Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) virion infectivity factor (Vif) is part of reverse transcription complexes and acts as an accessory factor for reverse transcription. *Virology.* 372: 147-156.

Carrasco, L. (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus. Res.* 45: 61-112.

Cesareni, G. y Murray, A. H. (1987) Plasmid vectors carrying the replication origin of filamentous single-stranded phages. *En* "Genetic engineering. Principles and methods." (J. K. Setlow, Ed.), Vol. 9, pp. 135-154. Plenum Press New York, USA.

Chatelain, F., Gazzarrini, S., Fujiwara, Y., Arrigoni, C., Domigan, C., Ferrara, G., Pantoja, C., Thiel, G., Moroni, A. y Minor, D. J. (2009) Selection of inhibitor-resistant viral potassium channels identifies a selectivity filter site that affects barium and amantadine block. *PLoS. One.* 4: e7496.

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P., Wu, L., Mackay, C., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. y Sodroski, J. G. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 85:: 1135–1148.

Choi, B., Fermin, C. D., Cormardelle, A. M., Haislip, A. M., Voss, T. G. y Garry, R. F. (2008) Alterations in intracellular potassium concentration by HIV-1 and SIV Nef. *Virology*. 5: 60.

Chowers, M., Spina, C., Kwok, T., Fitch, N., Richman, D. y Guatelli, J. (1994) Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* 68: 2906-2914.

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. y Montagnier, L. (1986) Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. *Science*. 233: 343-346.

Cohen, E., Dehni, G., Sodroski, J. y Haseltine, W. (1990) Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64: 3097-3099.

Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Sodroski, J. G. y Haseltine, W. A. (1988) Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. 334: 532-534.

Conti, L., Rainaldi, G., Matarrese, P., Varano, B., Rivabene, R., Columba, S., Sato, A., Belardelli, F., Malorni, W. y Gessani, S. (1998) The HIV-1 vpr protein acts as a negative regulator of apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for the pathogenesis of AIDS. *J. Exp. Med.* 187: 403-413.

Cooper, T. G. (1982) Nitrogen metabolism in *S. cerevisiae*. En "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression." (J. N. Strathern, E. W. Jones y J. R. Broach, Ed.), Vol. 2, pp. 39-99. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

Cordes, F. S., Kukol, A., Forrest, L. R., Arkin, I. T., Sansom, M. S. y Fischer, W. B. (2001) The structure of the HIV-1 Vpu ion channel: modelling and simulation studies. *Biochim. Biophys. Acta*. 1512: 291-298.

Cordes, F. S., Tustian, A. D., Sansom, M. S., Watts, A. y Fischer, W. B. (2002) Bundles consisting of extended transmembrane segments of Vpu from HIV-1: computer simulations and conductance measurements. *Biochemistry*. 41: 7359-7365.

- Courgnaud, V., Abela, B., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Delaporte, E. y Peeters, M.** (2003) Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J. Virol.* 77:
- Courgnaud, V., Salemi, M., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Abela, B., Auzel, P., Bibollet-Ruche, F., Hahn, B. H., Vandamme, A., Delaporte, E. y Peeters, M.** (2002) Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J. Virol.* 76: 8298-8309.
- Daignan-Fornier, B. y Fink, G.R.** (1992) Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6746-50.
- Dazza, M. C., Ekwalinga, M., Nende, M., Shamamba, K. B., Bitshi, P., Paraskevis, D. y Saragosti, S.** (2005) Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J. Virol.* 79: 8560-8571.
- De Cock, K., Adjorlolo, G., Ekpini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doorly, R. y Gayle, H.** (1993) Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA.* 270: 2083-2086.
- de la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Lazo, P. y Ramos, S.** (1981) Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256: 10420-10425.
- de Noronha, C., Sherman, M., Lin, H., Cavrois, M., Moir, R., Goldman, R. y WC., G.** (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science.* 294: 1105-1108.
- Derisi, J. L., Iyer, V. R. y Brown, P. O.** (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* 278: 680-686.
- Desfarges, S., Salin, B., Calmels, C., Andreola, M., Parissi, V. y Fournier, M.** (2009) HIV-1 integrase trafficking in *S. cerevisiae*: a useful model to dissect the microtubule network involvement of viral protein nuclear import. *Yeast.* 26: 39-54.
- Douglas, J., Viswanathan, K., McCarroll, M., Gustin, J., Früh, K. y Moses, A.** (2009) Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β TrCP-dependent mechanism. *J. Virol.* 83: 7931-7947.

Dubé, M., Roy, B., Guiot-Guillain, P., Binette, J., Mercier, J., Chiasson, A. y Cohen, E. A. (2010) Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog.* 6: e1000856.

Dubé, M., Roy, B., Guiot-Guillain, P., Mercier, J., Binette, J., Leung, G. y Cohen, E. (2009) Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J. Virol.* 83: 4574-4590.

Durell, S. y Guy, H. (1999) Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel. *Biophys J.* 77: 789-807.

Elder, R., Yu, M., Chen, M., Zhu, X., Yanagida, M. y Zhao, Y. (2001) HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. *Virology.* 287: 359-370.

Erhart, E. y Hollenberg, C. (1983) The presence of a defective LEU2 gene on 2 mu DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J. Bacteriol.* 156: 625-635.

Evrard-Todeschi, N., Gharbi-Benarous, J., Bertho, G., Coadou, G., Megy, S., Benarous, R. y Girault, J. (2006) NMR studies for identifying phosphopeptide ligands of the HIV-1 protein Vpu binding to the F-box protein beta-TrCP. *Peptides.* 27: 194-210.

Ewart, G. D., Mills, K., Cox, G. B. y Gage, P. W. (2002) Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur. Biophys. J.* 31: 26-35.

Ewart, G. D., Nars, N., Naif, H., Cox, G. B., A.L., C. y Gage, P. W. (2004) Potential new anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds depress virus replication in cultured human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2325-2330.

Ewart, G. D., Shutherland, T., Gage, P. W. y Cox, G. B. (1996) The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation selective ion channels. *J. virol.* 70: 7108-7115.

Fairman, C., Zhou, X. y Kung, C. (1999) Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* 168: 149-157.

Farnet, C. y Bushman, F. (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell.* 88: 483-492.

- Farnet, C. y Haseltine, W.** (1991) Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* 65: 1910-1915.
- Fisher, A., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petteway, S., Ratner, L., Gallo, R. y Wong-Staal, F.** (1987) The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science.* 237: 888-893.
- Fitzpatrick, K., Skasko, M., Deerinck, T., Crum, J., Ellisman, M. y Guatelli, J.** (2010) Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. *PLoS Pathog.* 6: e1000701.
- Flajolet, M., Rotondo, G., Daviet, L., Bergametti, F., Inchauspe, G., Tiollais, P., Transy, C. y Legrain, P.** (2000) A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map. *Gene.* 242: 369-379.
- Foury, F.** (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene.* 195: 1-10.
- Freed, E., Myers, D. y Risser, R.** (1990) Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4650-4654.
- Fujiwara, T. y Mizuuchi, K.** (1988) Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell.* 54: 497-504.
- Fung, H. B. y Guo, Y.** (2004) Enfuvirtide: a fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin. Ther.* 26: 352-378.
- Gaber, R., Styles, C. y Fink, G.** (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2848-2859.
- Gallo, R., Wong-Staal, F., Montagnier, L., Haseltine, W. y Yoshida, M.** (1988) HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature.* 333: 504.
- Gan, S. W., Ng, L., Lin, X., Gong, X. y Torres, J.** (2008) Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. *Protein Sci.* 17: 813-820.
- Gancedo, J. M.** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- Garçon, N., Heppner, D. G. y Cohen, J.** (2003) Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines.* 2: 231-238.

Gazzarrini, S., Kang, M., Abenavoli, A., Romani, G., Olivari, C., Gaslini, D., Ferrara, G., van Etten, J., Kreim, M., Kast, S., Thiel, G. y Moroni, A. (2009) Chlorella virus ATCV-1 encodes a functional potassium channel of 82 amino acids. *Biochem. J.* 20: 295-303.

Gelderblom, H. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS.* 5: 617-637.

Goffeau, A., y Slayman, C.W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 639:197–223.

Goffinet, C., Allespach, I., Homann, S., Tervo, H., Habermann, A., Rupp, D., Oberbremer, L., Kern, C., Tibroni, N., Welsch, S., Krijnse-Locker, J., Banting, G., Kräusslich, H., Fackler, O. y Keppler, O. (2009) HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell. Host. Microbe.* 5: 285-297.

Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H. y Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.* 4: 65–71.

Goldsmith, M. A., Warmerdam, M. T., Atchison, R. E., Miller, M. D. y Greene, W. C. (1995) Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* 69: 4112-4121.

Gómez, L. M., Pacyniak, E., Flick, M., Hout, D. R., Gomez, M. L., Nerrienet, E., Ayoub, A., Santiago, M. L., Hahn, B. H. y Stephens, E. B. (2005) Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV_{cpz} strains. *Virology.* 335: 46-60.

González, A., Jiménez, A., Vázquez, D., Davies, J. y Schindler, D. (1978) Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta.* 521: 459-469.

González, M. E. y Alcamí, J. (2006) Retroviridae. *En "Virus patógenos".* (J. M. Almendral y L. Carrasco, Ed.), Vol. pp. 281-305. Hélice, Fundacion BBVA. Madrid, España.

González, M. E. y Carrasco, L. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrana permeabilization. *Virology.* 279: 201-209.

González, M. E. y Carrasco, L. (1998) The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry.* 37: 13710-13719.

González, M. E. y Carrasco, L. (2005) Viral proteins that enhance membrane permeability. *En "Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design"*. (W. B. Fischer, Ed.), Vol. 1, pp. 79-90. Kluwer Academic / Plenum Publishers New York.

González, M. E. y Carrasco, L. (2003) Viroporins. *FEBS Lett.* 552: 28-34.

Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. y Haseltine, W. (1993) Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7381-7385.

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

Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. y Rowlands, D. J. (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535: 34-38.

Gu, J., Emerman, M. y Sandmeyer, S. (1997) Small heat shock protein suppression of Vpr-induced cytoskeletal defects in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4033-4042.

Gupta, R., Hué, S., Schaller, T., Verschoor, E., Pillay, D. y Towers, G. (2009) Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog.* 5: e1000443.

Gupta, S. y Canessa, C. (2000) Heterologous expression of a mammalian epithelial sodium channel in yeast. *FEBS Lett.* 481: 77-80.

Hammer, S., Saag, M., Schechter, M., Montaner, J., Schooley, R., Jacobsen, D., Thompson, M., Carpenter, C., Fischl, M., Gazzard, B., Gatell, J., Hirsch, M., Katzenstein, D., Richman, D., Vella, S., Yeni, P. y Volberding, P. (2006) Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society--USA panel. *JAMA.* 296: 827-843.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hansen, J., Witzke, N., Nielsen, C., Mathiesen, L., Teglbjaerg, L., Nielsen, C. y Nielsen, J. (1990) Derivatives of amphotericin inhibit infection with human immunodeficiency virus in vitro by different modes of action. *Antiviral Res.* 14: 149-159.

Haro, R., Garciadeblas, B. y Rodríguez-Navarro, A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291: 189-191.

Hasenbrink, G., Schwarzer, S., Kolacna, L., Ludwing, J., Sychrova, H. y Lichtenberg-Fraté, H. (2005) Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changed in growth characteristics. *FEBS Lett.* 579: 1723-1731.

Hay, A. J. (1992) The action of adamantanamines against influenza A viruses: Inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin. Virol.* 3: 21-30.

Haynes, W., Vaillant, B., Preston, R., Saimi, Y. y Kung, C. (1998) The cloning by complementation of the pawn-A gene in *Paramecium*. *Genetics.* 191: 947-957.

Heinzinger, N., Bukinsky, M., Haggerty, S., Ragland, A., Kewalramani, V., Lee, M., Gendelman, H., Ratner, L., Stevenson, M. y 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. U.S.A.* 91: 7311-7315.

Henriet, S., Richer, D., Bernacchi, S., Decroly, E., Vigne, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Paillart, J. y Marquet, R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* 354: 55-72.

Hess, D., Lu, W., Rabinowitz, J. y Botstein, D. (2006) Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLOS Biol.* 4: e351.

Hill, M., Ruiz, A., Schmitt, K. y Stephens, E. (2010) Identification of amino acids within the second alpha helical domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu that are critical for preventing CD4 cell surface expression. *Virology.* 397: 104-112.

Holland, M. J. y Holland, J. P. (1978) Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry.* 17: 4900-4907.

Holloway, M. y Bram, R. (1998) Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J. Biol. Chem.* 273: 16346-16350.

Hopkins, P., Chevallier, M. R., Jund, R. y Eddy, A. A. (1988) Use of plasmid vectors to show that the uracil and cytosine permeases of yeast *Saccharomyces cerevisiae* are electrogenic proton symports. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 173-177.

Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H. y Ishizaka, Y. (2010) HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukoc. Biol.* 87: 1133-1143.

- Hrecka, K., Swigut, T., Schindler, M., Kirchhoff, F. y Skowronski, J.** (2005) Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *J Virol.* 79: 10650-10659.
- Hsu, K., Han, J., Shinlapawittayatorn, K., Deschenes, I. y Marban, E.** (2010) Membrane potential depolarization as a triggering mechanism for Vpu-mediated HIV-1 release. *Biophys. J.* 99: 1718-1725.
- Hsu, K., Seharaseyon, J., Dong, P., Bour, S. y Marbán, E.** (2004) Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host Task-1 channel. *Mol. cell.* 14: 259-267.
- Huet, T., R. C., A. M., G. R. y Wain-Hobson, S.** (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature.* 345: 356 - 359.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A.** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Métivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., Vieira, H., Loeffler, M., Belzacq, A., Briand, J., Zamzami, N., Edelman, L., Xie, Z., Reed, J., Roques, B. y Kroemer, G.** (2001) Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J. Exp. Med.* 193: 509–519.
- Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K. F., Vieira, H. L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S., Cointe, D., Xie, Z. H., Reed, J. C., Roques, B. y Kroemer, G.** (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* 191: 33–45.
- Johnston, M.** (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. rev.* 51: 458-476.
- Jowett JB, P. V., Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS.** (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J. Virol.* 69: 6304-6313.
- Kaletsky, R., Francica, J., Agrawal-Gamse, C. y Bates, P.** (2009) Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 2886-2891.
- Kataropoulou, A., Bovolenta, C., Belfiore, A., Trabatti, S., Garbelli, A., Porcellini, S., Lupo, R. y Maga, G.** (2009) Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic. Acids. Res.* 37: 3660-3669.

Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J., Yewdell, J., Hünig, T., Schimpl, A. y Schubert, U. (1997) The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J. Exp. Med.* 185: 1295-1305.

Khan, M., Aberham, C., S., K., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S. y Strebel, K. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J. Virol.* 75: 7252-7265.

Khoury, G., Ewart, G. D., Luscombe, C., Miller, M. D. y Wilkinson, J. (2010) Antiviral efficacy of the novel compound BIT225 against HIV-1 release from human macrophages. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54: 835-845.

Kim, H. E., Du, F., Fang, M. y Wang, X. (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 17545–17550.

Kino, T., Gragerov, A., Valentin, A., Tsopanomialou, M., Ilyina-Gragerova, G., Erwin-Cohen, R., Chrousos, G. y Pavlakis, G. (2005) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J. Virol.* 79: 2780-2787.

Kleyman, T. y Cragoe, E. J. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* 105: 1-21.

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M., Martin, M. y Orenstein, J. (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64: 621-629.

Klotman, M., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. y Wong-Staal, F. (1991) Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5011-5015.

Ko, C., Buckley, A. y Gaber, R. (1990) TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125: 305-312.

Ko, C. H., Liang, H. y Gaber, R. F. (1993) Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13: 638-648.

Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H. y Koyanagi, Y. (2011) Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85: 932-945.

- Köhler, C., Merkle, T. y Neuhaus, G.** (1999) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* 18: 97-104.
- Kolacna, L., Zimmermannova, O., Hasenbrink, G., Schwarzer, S., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H. y Sychrova, H.** (2005) New phenotypes of functional expression of the mKir2.1 channel in potassium efflux-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast.* 22: 1315-1323.
- Krylov, D. M., Nasmyth, K. y Koonin, E. V.** (2003) Evolution of eukaryotic cell cycle regulation: stepwise addition of regulatory kinases and late advent of the CDKs. *Curr. Biol.* 13: 173–177.
- Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A. y Banting, G.** (2003) Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic.* 4: 694-709.
- Kurtz, S., Luo, G., Hahnenberger, K., Brooks, C., Gecha, O., Ingalls, K., Numata, K. y Krystal, M.** (1995) Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel inhibitor of influenza virus.. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2204-2209.
- Le Tortorec, A. y Neil, S.** (2009) Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 83: 11966-11978.
- Lemaitre, V., Ali, R., Kim, C. G., Watts, A. y Fischer, W. B.** (2004) Interaction of amiloride and one of its derivatives with Vpu from HIV-1: a molecular dynamics simulation. *FEBS Lett.* 563: 75:81.
- Léonard, V., Kohl, A., Hart, T. y Elliott, R.** (2006) Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J. Virol.* 80: 9667-9675.
- Levy, D. N., Refaeli, Y., MacGregor, R. R. y Weiner, D.** (1994) Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10873-10877.
- Lopez, L. A., Yang, S. J., Hauser, H., Exline, C. M., Haworth, K. G., Oldenburg, J. y Cannon, P. M.** (2010) Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal. *J. Virol.* 84: 7243-7255.
- Luscombe, C. A., Huang, Z., Murray, M. G., Miller, M., Wilkinson, J. y Ewart, G. D.** (2010) A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhoea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res.* 86: 144-153.

Lv, M., Wang, J., Wang, X., Zuo, T., Zhu, Y., Kong, W., Yu, X. (2011) Polarity changes in the transmembrane domain core of HIV-1 Vpu inhibits its anti-Tetherin activity. *PLoS One*. 6: e20890.

Lynn, W. S., Tweedale, A. y Cloyd, M. W. (1988) Human immunodeficiency virus (HIV-1) cytotoxicity: perturbation of the cell membrane and depression of phospholipid synthesis. *Virology*. 163: 43-51.

Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Hewish, D. R., Kirkpatrick, A., Ward, A. C. y Azad, A. A. (1995) A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. *PNAS*. 92: 2770-2774.

Madrid, R., Gómez, M. J., Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A. (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* 273: 14838-14844.

Majumder, B., Venkatachari, N. J., O'Leary, S. y Ayyavoo, V. (2008) Infection with Vpr-positive human immunodeficiency virus type 1 impairs NK cell function indirectly through cytokine dysregulation of infected target cells. *J. Virol.* 82: 7189–7200.

Makutonina, A., Voss, T. G., Plymale, D. R., Fermin, C. D., Norris, C. H., Vigh, S. y Garry, R. F. (1996) Human immunodeficiency virus infection of T-lymphoblastoid cells reduces intracellular pH. *J. Virol.* 70: 7049-7055.

Manfredi, R. y Sabbatani, S. (2006) A novel antiretroviral class (fusioninhibitors) in the management of HIV infection. Present features and future perspectives of Enfuvirtide (T-20). *Curr. Med. Chem.* 13: 2369-2384.

Mangeat, B., Gers-Huber, G., Lehmann, M., Zufferey, M., Luban, J. y Pignet, V. (2009) HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog.* 5: e1000574.

Mansouri, M., Viswanathan, K., Douglas, J. L., Hines, J., Gustin, J., Moses, A. V. y Früh, K. (2009) Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 83: 9672-9681.

Marassi, F. M., Ma, C., Gratkowski, H., Straus, S. K., Strebel, K., Oblatt-Montal, M., Montal, M. y Opella, S. J. (1999) Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 14336-14341.

- Maresova, L., Urbankova, E., Gaskova, D. y Sychrova, H.** (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* 6: 1039-1046.
- Margottin, F., Bour, S., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. y Benarous, R.** (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell.* 1: 565-574.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. y Kabat, D.** (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* 9: 1398-1403.
- Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X. L., Culbertson, M., Bussey, H. y Kung, C.** (1990) Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6228-6232.
- M'Barek NB, A. G., Raoult D, Gluschankof P.** (2006) HIV-2 Protease resistance defined in yeast cells. *Retrovirology.* 3: 58.
- Mbisa JL, Bu W y VK., P.** (2010) APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J. Virol.* 4: 5250-5259.
- McNatt, M., Zang, T., Hatziioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I., Johnson, W., Neil, S. y Bieniasz, P.** (2009) Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog.* 5: e1000300.
- Megy, S., Bertho, G., Gharbi-Benarous, J., Evrard-Todeschi, N., Coadou, G., Ségéral, E., lehle, C., Quéméneur, E., Benarous, R. y Girault, J.** (2005) STD and TRNOESY NMR studies on the conformation of the oncogenic protein beta-catenin containing the phosphorylated motif DpSGXXpS bound to the beta-TrCP protein. *J. Biol. Chem.* 280: 29107-29116.
- Mehnert, T., Routh, A., Judge, P. J., Lam, Y. H., Fischer, D., Watts, A. y Fischer, W. B.** (2007) Biophysical characterization of Vpu from HIV-1 suggests a channel-pore dualism. *Proteins.*
- Melton, J. V., Ewart, G. D., Weir, R. C., Board, P. G., Lee, E. y Gage, P. W.** (2002) Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J. Biol. Chem.* 77(46923-46931).
- Mercier, R. W., Rabinowitz, N. M., Ali, R., Gaxiola, R. A. y Berkowitz, G. A.** (2004) Yeast hygromycin sensitivity as a functional assay of cyclic nucleotide gated cation channels. *Plant. Physiol. Biochem.* 42: 529-536.

Meusser, B. y Sommer, T. (2004) Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation. *Mol. Cell.* 14: 247-258.

Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O. y Keppler, O. (2005) The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr. Biol.* 15: 714-723.

Miller, M., Farnet, C. y Bushman, F. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* 71: 5382-5390.

Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C. y Feinberg, M. B. (1994) The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 179: 101-113.

Mitchell, R., Katsura, C., Skasko, M., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E., Margottin-Goguet, F., Benarous, R. y Guatelli, J. (2009) Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* 5: e1000450.

Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. y Roques, B. (2003) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J. Mol. Biol.* 327: 215-227.

Morikawa, Y., Goto, T., Yasuoka, D., Momose, F. y Matano, T. (2007) Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 81: 9911-9921.

Mortimer, R.K. y Schild, D. (1980) Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* 44: 519-571.

Mulet, J., Leube, M. P., Kron, S., Rios, G., Fink, G. y Serrano, R. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein Kinases modulate the trk1-trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3328-3337.

Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

Munis, J., Kornbluth, R., Guatelli, J. y Richman, D. (1992) Ordered appearance of human immunodeficiency virus type 1 nucleic acids following high multiplicity infection of macrophages. *J. Gen. Virol.* 73: 1899-1906.

Muthumani, K., Hwang, D. S., Choo, A. Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N. S., Thieu, K. P. y Weiner, D. B. (2004) HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells *in vitro*. *Int. Immunol.* 17: 103-116.

Muthumani, K., Hwang, D. S., Desai, B. M., Zhang, D., Dayes, N. S., Green, D. R. y Weiner, D. B. (2002) HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 277: 37820–37831.

Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M. y Adachi, A. (2010) Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *J. Med. Invest.* 57: 89-94.

Nakamura, R. y Gaber, R. (1998) Studying ion channels using yeast genetics. *Methods Enzymol.* 293: 89-104.

Nakazawa, J., Watanabe, N., Imoto, M. y Osada, H. (2005) Mutational analysis of growth arrest and cellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Vpr in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 245-256.

Neil, S., Zang, T. y Bieniasz, P. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 451: 425-430.

Neumann, M., Harrison, J., Saltarelli, M., Hadziyannis, E., Erfle, V., Felber, B. y Pavlakis, G. (1994) Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 10: 1531-1542.

Nguyen, D. y Hildreth, J. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* 74: 3264-3272.

Noble, B., Abada, P., Nunez-Iglesias, J. y Cannon, P. (2006) Recruitment of the adaptor protein 2 complex by the human immunodeficiency virus type 2 envelope protein is necessary for high levels of virus release. *J. Virol.* 80: 2924-2932.

Ogino, T., den Hollander, JA. y Shulman, R. (1983) 39K, 23Na, and 31P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 5185-5189.

Ong, E. B., Watanabe, N., Saito, A., Futamura, Y., Abd El Galil, K. H., Koito, A., Najimudin, N. y Osada, H. (2011) Vipirinin, a Coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of Vpr. *J. Biol. Chem.* 286: 14049-14056.

Ono, A. y Freed, E. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 13925-13930.

Ozel, M., Pauli, G. y Gelderblom, H. (1988) The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 100: 255-266.

Pacyniak, E., Gomez, M. L., Gomez, L. M., Mulcahy, E. R., Jackson, M., Hout, D. R., Wisdom, B. J. y Stephens, E. B. (2005) Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 21: 379-394.

Parissi, V., Caumont, A., de Soultrait, V., Calmels, C., Pichuantes, S., Litvak, S. y Dupont, C. (2000) Selection of amino acid substitutions restoring activity of HIV-1 integrase mutated in its catalytic site using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 295: 755-765.

Park, S. H., Mrse AA, AA, N., , M. M., Oblatt-Montal M, Montal M y SJ., O. (2003) Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein "u" (Vpu) from HIV-1. *J. Mol. Biol.* 333: 409-424.

Patargias, G., Barke, T., Watts, A. y Fischer, W. B. (2009) Model generation of viral channel forming 2B protein bundles from polio and coxsackie viruses. *Mol. Membr. Biol.* 26: 309-320.

Patel, C. A., Mukhtar, M. y Pomerantz, R. J. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis in human neuronal cells. *J. Virol.* 74: 9717-9726.

Patel, M. C., Patkar, K. K., Basu, A., Mohandas, K. M. y Mukhopadhyaya, R. (2009) Production of immunogenic human papillomavirus-16 major capsid protein derived virus like particles. *Indian J. Med. Res.* 130: 213-218.

Paul, M. y Jabbar, M. (1997) Phosphorylation of both phosphoacceptor sites in the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain is essential for Vpu-mediated ER degradation of CD4. *Virology.* 232: 207-216.

Paul, M., Mazumder, S., Raja, N. y Jabbar, M. (1998) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu transmembrane domain that promotes the enhanced release of virus-like particles from the plasma membrane of mammalian cells. *J Virol.* 72: 1270-1279.

Perales, C., Carrasco, L. y González, M. E. (2005) Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1743: 169-175.

Perez, M., Garcia-Barreno, B., Melero, J. A., Carrasco, L. y Guinea, R. (1997) Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology.* 235: 342-351.

Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R. y Yenush, L. (2007) Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* 27: 5725-5736.

- Perlin, D. S., Brown, C. L. y Haber, J. E.** (1988) Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 18118-18122.
- Pettersson, N., Hagström, J., Bill, R. y Hohmann, S.** (2006) Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 50: 247-255.
- Piller, S. C., Ewart, G., Premkumar, A., Cox, G. B. y Gage, P.** (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. sci.* 93: 111-115.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. y Lamb, R. A.** (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 69: 517-528.
- Plemenitas, A., Lu, X., Geyer, M., Veranic, P., Simon, M. y Peterlin, B.** (1999) Activation of Ste20 by Nef from human immunodeficiency virus induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology.* 258: 271-281.
- Poggi, A., Rubartelli, A. y Zocchi, M. R.** (1998) Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* 273: 7205-7209.
- Polak, A. y Grenson, M.** (1973) Evidence for a common transport system for cytosine, adenine and hypoxanthine in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* 32: 276-282.
- Poon, B., Chang, M. y Chen, I.** (2007) Vpr is required for efficient Nef expression from unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA. *J. Virol.* 81: 10515-10523.
- Popper, S., Sarr, A., Travers, K., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M. y Kanki, P.** (1999) Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J. Infect. Dis.* 180: 1116-1121.
- Premkumar, A., Horan, C. R. y Gage, P. W.** (2005) Dengue virus M protein C-terminal peptide (DVM-C) forms ion channels. *J. Membr. Biol.* 204: 33-38.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G. D. y Gage, P. W.** (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett.* 557: 99-103.
- Pronk, J.** (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2095-2100.

Ramos, J., Alijo, R., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176: 249-252.

Ramos, J., Contreras, P. y Rodríguez-Navarro, A. (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143: 88-93.

Ramos, J., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1029: 211-217.

Regan, J. y Laimins, L. (2008) Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J. Virol.* 82: 10042-10051.

Ritter, G. J., Yamshchikov, G., Cohen, S. y Mulligan, M. (1996) Human immunodeficiency virus type 2 glycoprotein enhancement of particle budding: role of the cytoplasmic domain. *J. Virol.* 70: 2669-2673.

Rodríguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 1-30.

Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159: 940-945.

Römer, W., Lam, Y., Fischer, D., Watts, A., Fischer, W. B., Göring, P., Wehrspohn, R., Gösele, U. y Steinem, C. (2004) Channel activity of a viral transmembrane peptide in micro-BLMs: vpu₁₋₃₂ from HIV-1. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 16267-16274.

Rossi, F., Gallina, A. y Milanesi, G. (1996) Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology.* 217: 397-403.

Roth, M., Schwartzberg, P. y Goff, S. (1989) Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence. *Cell.* 58: 47-54.

Ryan, J. P. y Ryan, H. (1972) The Role of Intracellular pH in the Regulation of Cation Exchanges in Yeast. *Biochem. J.* 128: 139-146.

Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Kawamura, M. y Adachi, A. (1993) Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.* 67: 1663-1666.

Sakai, H., Tokunaga, K., Kawamura, M. y Adachi, A. (1995) Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J. Gen. Virol.* 76: 2717-2722.

Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y. y Yasuda, J. (2009) Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J. Virol.* 83: 2382-2385.

- Sakuragi, S., Goto, T., Sano, K. y Morikawa, Y.** (2002) HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 7956-7961.
- Sambrook, J. y Russel, D.** (2001) Molecular cloning: a Laboratory Manual, 3^a ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 5463-5467.
- Sanz, M. A., Madan, V., Carrasco, L. y Nieva, J. L.** (2003) Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 278: 2051–2057.
- Sattentau, Q. J. y Weiss, R.** (1988) The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell.* 52: 631–633.
- Schaffner, C., Plescia, O., Pontani, D., Sun, D., Thornton, A., Pandey, R. y Sarin, P.** (1986) Anti-viral activity of amphotericin B methyl ester: inhibition of HTLV-III replication in cell culture. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4110-4113.
- Schim van der Loeff, M. y Aaby, P.** (1999) Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS.* 13 (Suppl. A): S69-S84.
- Schindler, M., Wurfl, S., Benaroch, P., Greenough, T. C. y Daniels R, E. P., Brenner M, Munch J, Kirchhoff F.** (2003) Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J. Virol.* 77: 10548-10556.
- Schubert, U., Ferrer-Montiel, A. V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K. y Montal, M.** (1996) Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1 infected cells. *FEBS Lett.* 398: 12-18.
- Schubert, U., Henklein, P., Boldyreff, B., Wingender, E., Strebel, K. y Porstmann, T.** (1994) The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted alpha-helix-turn-alpha-helix-motif. *J. Mol. Biol.* 236: 16-25.
- Schwartz, O., Maréchal, V., Danos, O. y Heard, J.** (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* 69: 4053-4059.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. y Heard, J. M.** (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* 2: 338-342.

Schwartz, S., Felber, B. K. y Pavlakis, G. N. (1991) Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology*. 183: 677-686.

Schwarzer, S., Kolacna, L., Lichtenberg-Fraté, H., Sychrova, H. y Ludwig, J. (2008) Functional expression of the voltage-gated neuronal mammalian potassium channel rat ether à go-go1 in yeast. *FEMS Yeast Res.* 8: 405-413.

Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochem. Biophys. Acta.* 947:1–28.

Serrano, R. (1991) Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *En "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics."* (J. R. Broach, J. R. Pringle y E. W. Jones, Ed.), Vol. 1, pp. 523-585. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

Sesti, F., Shih, T. M., Nikolaeva, N. y Goldstein, S. A. (2001) Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell.* 105: 637-644.

Sharkey, M., Teo, I., Greenough, T., Sharova, N., Luzuriaga, K., Sullivan, J., Bucy, R., Kostrikis, L., Haase, A., Veryard, C., Davaro, R., Cheeseman, S., Daly, J., Bova, C., Ellison, R. r., Mady, B., Lai, K., Moyle, G., Nelson, M., Gazzard, B., Shaunak, S. y Stevenson, M. (2000) Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* 6: 76-81.

Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. y Malim, M. H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 418: 646-650.

Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. y Malim, M. H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* 9: 1404-1407.

Simchowicz, L. y Cragoe, E. J. (1986) Inhibition of chemotactic factor-activated Na⁺/H⁺ exchange in human neutrophils by analogues of Amiloride: structure-activity relationships in the amiloride series. *Mol. Pharmacol.* 30: 112-120.

Skasko, M., Tokarev, A., Chen, C. C., Fischer, W. B., Pillai, S. K. y Guatelli, J. (2011) BST-2 is rapidly down-regulated from the cell surface by the HIV-1 protein Vpu: Evidence for a post-ER mechanism of Vpu-action. *Virology.* 411: 65-77.

Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B. M., Xie, Y. y Chen, I. S. Y. (1999) Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12039–12043.

- Stove, V., Van de Walle, I., Naessens, E., Coene, E., Stove, C., Plum, J. y Verhasselt, B.** (2005) Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha. *J Virol.* 79: 11422-11433.
- Strebel, K.** (2004) HIV-1 Vpu; putting a channel to the TASK. *Mol. cell.* 14: 150-152.
- Strebel, K., Klimkait, T. y Martin, M. A.** (1998) A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 KDa product. *Science.* 241: 1221-1223.
- Sturgeon, C. M., Kemmer, D., Anderson, H. J. y Roberge, M.** (2006) Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol. J.* 1: 289-298.
- Sumner, E. R. y Avery, S. V.** (2002) Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 148: 345-351.
- Swigut, T., Shohdy, N. y Skowronski, J.** (2001) Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.* 20: 1593-1604.
- Tang, W., Ruknudin, A., Yang, W. P., Knickerbocker, A. y Kurtz, S.** (1995) Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K⁺ channel in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 6: 1231-1240.
- ter Schure, E., van Riel, N. A. y Verrips, C. T.** (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 67-83.
- Tiganos, E., Yao, X., Friberg, J., Daniel, N. y Cohen, E.** (1997) Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J. Virol.* 71: 4452-4460.
- Tokarev, AA., Munguia, J., Guatelli, JC.** (2011) Serine-threonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2/tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu. *J Virol.* 85:51-63.
- Trible, R., Emert-Sedlak, L. y Smithgall, T.** (2006) HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J. Biol. Chem.* 281: 27029-27038.
- Trono, D.** (1998) When accessories turn out to be essential. *Nat. Med.* 4: 1368-1369.
- Turner, B. y Summers, M.** (1999) Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285: 1-32.

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter W, J., Ammerer, G. y Hall, B. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 298: 347-350.

Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E., Sharp, P., Shaw, G., Delaporte, E., Hahn, B. y Peeters, M. (2006) Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 444: 164.

Varthakavi, V., Heimann-Nichols, E., Smith, R., Sun, Y., Bram, R., Ali, S., Rose, J., Ding, L. y Spearman, P. (2008) Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand as a human host restriction to HIV-1 release overcome by Vpu. *Nat. Med.* 14: 641-647.

Varthakavi, V., Smith, R. M., Bour, S., Strebel, K. y Spearman, P. (2003) Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *PNAS*. 100: 15154-15159.

Varthakavi, V., Smith, R. M., Martin, K. L., Derdowski, A., Lapierre, L. A., Goldenring, J. R. y Spearman, P. (2006) The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release. *Traffic*. 7: 298-307.

Venzke, S., Michel, N., Allespach, I., Fackler, O. y Keppler, O. (2006) Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol*. 80(22):: 11141-11152.

Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. M. y Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev*. 12: 175–185.

Voss, T. G., Fermin, C. D., Levy, J., Vigh, S., Choi, B. y Garry, R. F. (1996) Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J. Virol*. 70: 5447-5454.

Waheed, A., Ablan, S., Soheilian, F., Nagashima, K., Ono, A., Schaffner, C. y Freed, E. (2008) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 assembly and release by the cholesterol-binding compound amphotericin B methyl ester: evidence for Vpu dependence. *J. Virol*. 82: 9776-9781.

Warbrick, E. y Fantes, P. A. (1988) A conserved eukaryotic cell cycle control. *Bioessays*. 8: 202–204.

Watanabe, N., Nishihara, Y., Yamaguchi, T., Koito, A., Miyoshi, H., Kakeya, H. y Osada, H. (2006) Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of Vpr activity. *FEBS Lett*. 580: 2598-2602.

- Werner-Washburne, M., Braun, E., Crawford, M. E. y Peck, V. M.** (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 19: 1159–1166.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C. y Singer, R. A.** (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57: 383-401.
- Willbold, D., Hoffmann, S. y Rösch, P.** (1997) Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution. *Eur. J. Biochem.* 245: 581-588.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. & Strebel, K. ().** (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66: 7193-7200.
- Wilson, L., Gage, P. y Ewart, G. D.** (2006) Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology.* 353: 294-306.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P. y Ewart, G.** (2004) SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology.* 330: 322–331.
- Wong, J., Hezareh, M., Günthard, H., Havlir, D., Ignacio, C., Spina, C. y Richman, D.** (1997) Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science.* 278: 1291-1295.
- Wright, M., Ramos, J., Gomez, M., Moulder, K., Scherrer, M., Munson, G. y Gaber, R.** (1997) Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272: 13647-13652.
- Wu, G., Xu, G., Schulman, B., Jeffrey, P., Harper, J. y Pavletich, N.** (2003) Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol. Cell.* 11: 1445-1456.
- Wu, L., Gerard, N., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. y J., S.** (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.* 384: 179-183.
- Yang, K., Li S, He, F., Zhang, J., Wei, M., Pan, H., Yang, C., Xiong, J., Zhang, J. y Xia, N.** (2009) Expression and purification of soluble HIV-1 envelope glycoprotein gp160 mutant from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 108: 5-10.
- Yao, X., Lemay, J., Rougeau, N., Clément, M., Kurtz, S., Belhumeur, P. y Cohen, E. A.** (2002) Genetic selection of peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Biol. Chem.* 277: 48816-48826.

Yao, X., Rougeau, N., Duisit, G., Lemay, J. y Cohen, E. (2004) Analysis of HIV-1 Vpr determinants responsible for cell growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Retrovirology*. 16: 1:21.

Yuan, H., Kamata, M., Xie, Y. y Chen, I. (2004) Increased levels of Wee-1 kinase in G(2) are necessary for Vpr- and gamma irradiation-induced G(2) arrest. *J. Virol.* 78: 8183-8190.

Zhao, R. Y., Bukrinsky, M. y Elder, R. T. (2005) HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian. J. Med. Res.* 121: 270–286.

Zhu, Y., Gelbard, H. A., Roshal, M., Pursell, S., Jamieson, B. D. y Planelles, V. (2001) Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J. Virol.* 75: 3791–3801.