

16 Importancia de la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en la inhibición de la replicación en células murinas

Sandra Marques¹, Jean-luc Veyrune¹, Ram Shukla¹, Silvio Urcuqui-inchima², Paula Velilla²⁻³, Ajit Kumar¹

PALABRAS CLAVE

EXPORTACIÓN
VIRUS
MODIFICACIÓN TRANSCRIPCIONAL
TRANSCRIPTOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre los obstáculos que existen para entender la infección y la respuesta inmune por el HIV-1 está la ausencia de modelos animales que permitan estudiar la patogénesis del SIDA. Modelos murinos han sido desarrollados, pero carecen de replicación productiva a largo término debido a que la glicoproteína de envoltura del HIV-1 no se une al receptor CD4 ni al correceptor CCR5 murino, o porque la transcripción directa del promotor es ineficiente debido a una actividad atenuada de Tat (1), que es rescatada por la ciclina T1 humana. La coexpresión de CD4, CCR5 humanas en cultivo de células murinas permite la entrada del virus sin viremia detectable. En animales transgénicos que expresan la ciclina T1, se observa un bloqueo postranscripcional que afecta la replicación. La proteína Rev es fundamental en el ciclo replicativo del HIV-1 (2); el bloqueo de su actividad explicaría la ausencia de replicación del virus en células murinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar y caracterizar el dominio de Rev implicado en el bloqueo de la exportación en células murinas.

METODOLOGÍA

Para determinar el dominio de Rev implicado en el bloqueo de su función, células A9 se cotransfectaron con pRSVRev, pRSVRev1-79, pRSVCRRev, pRSVRev79-95. La actividad de exportación de Rev se determinó mediante la actividad del gen cloranfenicol-acetil-transferasa. Por microscopía confocal se determinó la localización celular de Rev.

RESULTADOS

En células A9 la función de exportación de Rev está restringida, pero es recuperada utilizando la proteína Rev-Rex o pRSVCRRev con Rev, sugiriendo que posiblemente el dominio C-terminal de Rev está implicado en la interacción con algún factor celular. Rev localiza en el citoplasma después del tratamiento de las células A9 con cicloheximida y actinomicina D.

CONCLUSIONES

La cotransfección de células A9 con pRSVRev y pRSVCRRev permite recuperar la actividad de exportación. Ello sugiere la existencia de mecanismos diferentes al de exportación implicados en la disminución de la replicación de VIH-1 en células A9. Determinar la naturaleza del factor responsable del bloqueo funcional de Rev es fundamental para el desarrollo de un modelo murino.

BIBLIOGRAFÍA

1. ROEBUCK K, SAIFUNDDIN M. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expression* 1999; 8: 67-84.
2. HOPE TJ. The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochemistry Biophysics* 1999; 365: 186-191.

.....
¹ Profesor, George Washington University.
² Profesor, Facultad de Ciencias Agrarias/Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia
³ Bacterióloga, Joven Investigadora de Colciencias
pvelilla@carios.udea.edu.co

17 NF90 una proteína celular que se une a RNAs inhibe la transactivación del LTR del HIV-1 mediada por TAT

Christine E Traviss¹, James L. Mcardle¹, Sandra Mp. Marques¹, Sergei Nekhai¹, Wilson H. Birges¹, Ned Jc Lamb¹, Silvio Urcuqui-inchima², Ajit Kumar¹

PALABRAS CLAVE

FACTOR NUCLEAR
TRANSCRIPCIÓN
EXPORTACIÓN
RNAM

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La transactivación del LTR de HIV-1 requiere la interacción de la proteína Tat (*trans-activation transcription*) con la estructura TAR (*trans-activation response*), que se encuentra localizada en el extremo 5' de todos los transcritos virales. La interacción de la proteína Tat con TAR forma un precomplejo transcripcional indispensable para la eficiente transcripción del genoma viral. La interacción de diferentes factores celulares (cdk9 y ciclina T, entre otros) con el precomplejo Tat-TAR, constituye un complejo estable que facilita la fosforilación de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II, asegurando una eficiente elongación de los transcritos virales. No se han descrito proteínas capaces de regular negativamente la función de Tat con resultados nefastos para la replicación viral. También se ha descrito otro tipo de proteínas celulares con capacidad de interactuar con TAR. El ejemplo mejor caracterizado es la proteína-kinasa dependiente de RNA (PKR), se autofosforila y mediante fosforilación del factor eIF2, inhibe la síntesis de proteínas. Con el presente trabajo se pretendió aislar y caracterizar otras proteínas celulares capaces de interactuar con la estructura TAR y estudiar su efecto en la función de Tat.

METODOLOGÍA

Extractos celulares de células HeLa fueron utilizados para estudiar la interacción proteína-ácido nucleico y la capacidad de interacción se determinó por ensayos EMSA, usando TAR como sonda marcada radioactivamente. La proteína capaz de fijarse a TAR fue identificada por secuenciación de la región N-terminal. Esta se clonó y se expresó en *E. coli* fusionada a 6His. La región de TAR implicada en la interacción *in-vitro*, se determinó por mutaciones puntuales.

RESULTADOS

Nuestros resultados muestran que una proteína de 90KDa es capaz de formar complejos con TAR. Por secuenciación de la región N-terminal se demostró que se trata de la proteína NF90 (factor nuclear 90) (1,2). Mediante mutaciones puntuales en TAR, se determinó la región implicada en la interacción con NF90. Las implicaciones de dicha interacción en la regulación negativa de la replicación de HIV-1 se estudian en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

NF90 es una proteína celular capaz de interactuar con TAR. La interacción TAR-NF-90 regula negativamente la activación del promotor de VIH mediada por Tat.

BIBLIOGRAFÍA

1. KAO PN, CHEN L, BROCK G, NG J, KENNY J, SMITH AJ, CORTHÉSY B. Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506- sensitive nuclear factor of activated T-cell: NF45 and NF90. *J Biol Chem* 1994; 93: 20.682-20.690.
2. TING NS, KAO PN, CHAN DW, LINTOTT LG, LEES-MILLER SP. DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45. *J Biol Chem* 1998; 93: 2.136-2.145.

.....
¹ Profesor, George Washington University (USA)
² Profesor, Facultad de Ciencias Agrarias/ Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia.
usilvio@medicina.udea.edu.co