

UNIVERSITAT POMPEU FABRA
FACULTAT DE CIÈNCIES DE LA SALUT I DE LA VIDA

TESIS DOCTORAL

Influencia de la cromatina en el lugar de integración
sobre la actividad del promotor del Virus de la
Inmunodeficiencia Humana y el establecimiento de
la latencia viral

Trabajo presentado por Edurne Gallastegui Calvache para optar al grado de Doctora.

Dirección a cargo del doctor Albert Jordan Vallès en el Instituto de Biología Molecular
de Barcelona (IBMB)-CSIC y en el Centro de Regulación Genómica (CRG)

Junio de 2010

Dr. Albert Jordan Vallès
Instituto de Biología Molecular
de Barcelona (IBMB)-CSIC

Edurne Gallastegui Calvache
Instituto de Biología Molecular
de Barcelona (IBMB)-CSIC

A mis padres

A Pablo

Abril de 2010, en algún lugar de Sants

Llegado a este punto es el momento de agradecer a todas las personas que han estado a mi lado durante todos estos años. Con algunos hemos vivido el día a día en el laboratorio, celebrando los buenos resultados y animándonos cuando las cosas no salían tan bien. Otros habéis tenido que aguantar que llegara tarde a todas partes porque había tenido que ir al laboratorio el fin de semana, o que os contara que tal técnica no salía sin tener ni idea de lo que os estaba hablando (todavía recuerdo las risas con los Westerns... porque eso es un tipo de películas ¿no?).

Primero que nada quería agradecer a Albert el haberme dado la oportunidad de poder hacer la tesis en su laboratorio. La verdad es que ha sido una grandísima experiencia y he aprendido mucho a su lado. Todavía recuerdo a aquella chica que llegó al laboratorio por primera vez durante las prácticas de la carrera y que ha cambiado tanto desde entonces...

A la gente del laboratorio de Albert, por ser grandísimas personas con las que he aprendido muchas cosas y que me han ayudado muchísimo, sobre todo en esta última etapa. A Lluís por ser como es, porque estoy segura que hay pocas personas en el mundo que sean tan buenas como él, siempre dispuesto a echarme una mano en lo que sea... y por enseñarme que en el sud de Catalunya, a las “orelles” se les llama “aurelles”! A Jean Michel por todo lo que ha hecho por mi durante todos estos meses... nunca olvidaré nuestras charlas y sus consejos. Y porque me ha ayudado tantas y tantas veces que le debo un montón de “cakes”. A Regi, porque es un encanto de persona y me encanta hablar con ella. Es una verdadera lástima que hayamos coincidido tan poquito en el laboratorio... a mis niños y niñas: Silvio, Gabry, Neus y Andrés, por haberse visto involucrados en mi proyecto en algún momento de sus vidas y por haber dado lo mejor de sí mismos. A Erika, porque aunque pasamos poco tiempo juntas, fue un grandísimo placer conocerla. Y por último (pero no por ello, menos importante) a la gente de los laboratorios de Marian, Tim y Bernat, porque los días en el trabajo no hubieran sido tan amenos sin ellos!

A mis niñas y niños del CRG, con los que empecé mis primeros pasos en el laboratorio y con los que me une una grandísima amistad. Alis, Moni, Vero (y Nievi!), Nacho, Jaume... ¡el laboratorio no hubiera sido ni de lejos lo mismo sin vosotros!

AGRADECIMIENTOS

Hemos vivido muchas cosas juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio... el viaje a Nueva York, a Sevilla, a Viena, a Peñíscola, los conciertos de Bruce, Port Aventura, las cenas, mi intento de traeros al lado oscuro de los juegos de mesa,... pero también las charlas sobre ciencia, los congresos, los lab meetings, y sobre todo, nuestros ánimos mutuos cuando los experimentos no salían bien... la vida nos está separando físicamente pero siempre nos seguiremos reencontrando.

A todo el laboratorio de Miguel Beato con los que hemos compartido charlas, comidas, y muchas otras cosas. Sobre todo quería agradecer a Cecita, que siempre tenía un momento para ayudarte en los experimentos con una sonrisa en los labios. A Silvina, que es un gran ejemplo de madre trabajadora. Y a Nora, que aunque ya no esté en el laboratorio, me dejó una gran huella (¡y por suerte ahora la tengo muy cerca!).

A mis amigos de tabalers y diables por haber tenido tanta paciencia conmigo estos últimos meses y por todas las cosas que hemos vivido juntos. Por las partidas de Catan, por los partidos de futbol que hemos visto donde fuera, por todos los correfoes y las tabaladas, por los fines de semana en Salou, por las horas y horas bajo el sol montando y empalmando pirotecnia (¡y las que nos quedan!), por los ensayos de los miércoles, por las partidas de rol hasta las tantas, por los vermutos con patatas bravas (con salsas separadas) y por tantas y tantas otras cosas que hemos compartido...

A mis amigas de la universidad, que aunque nuestros caminos hayan seguido caminos un poco diferentes y no nos veamos tan a menudo como nos gustaría, sabéis que sois parte de mí y siempre he pensado que juntas hemos crecido como personas.

A los que empecé llamando “los amigos de Pablo” y que con el tiempo ya llamo “mis amigos”. Porque hemos vivido muchas aventuras juntos, por los viajes a Esterri, a la casa rural y a Deltebre, por todas las celebraciones de cumpleaños (¡algunas con noticiones!), por las calçotadas, por los partidos de volei “playa” y por haberme dado ánimos para poder bajar una cascada de 40 metros (todavía ahora me pregunto cómo conseguisteis convencerme con el vértigo que tengo...).

A mi hermano y a mi cuñada, que aunque les vea poquito, siempre han estado a mi lado apoyándome y dándome muchos ánimos. Y ahora soy yo la que tiene que dar apoyo a mi cuñada, que desde hace unos meses se ha animado a empezar su tesis. Ya

verás que al final la recompensa es mucho mayor que los momentos difíciles, así que ¡ánimo!

A mis padres, por su entereza, por haberlo dado todo por sus hijos, porque sé que les va hacer tanta ilusión como a mí (¡o incluso más!) el tener esta tesis en las manos y porque lo son todo para mí. Soy incapaz de explicar con palabras lo agradecida que les estoy por todo lo que han hecho por mí...

Y finalmente, a Pablo, porque estoy segura que si hago algo bueno en esta vida es por él. Es la persona que me hace levantar cada día, me ayuda a luchar por lo que quiero derribando los muros que se me ponen por delante. Me hace reír cuando hace falta y está a mi lado siempre que lo necesito. Espero que nos vaya tan bien como hasta ahora en esta nueva hazaña que queremos emprender juntos...

A todos vosotros me gustaría dedicaros este trozo del musical “Mar i Cel”, adaptación de Dagoll Dagom de la obra con el mismo título de Àngel Guimerà.

El mar és com un desert d'aigua,
no té camins ni té senyals;
el mar és un desert d'onades,
una lluita sorda i constant;
és el mar la nostra terra ferma
on vivim arrelats en el vent.

Les veles s'inflaran,
el vent ens portarà
com un cavall desbocat per les ones.

El sol és el senyor del dia,
la lluna és reina de la nit;
però la reina ens dorm a les veles
i al matí no es pot amagar;
aleshores ens fa de bandera
i el sol vol fer-se enrere i fugir.

Les veles s'inflaran,
el vent ens portarà
com un cavall desbocat per les ones.

El mar serà tot per nosaltres,
ja som senyors i reis del mar;

tots voldran fugir de la lluna
que flameja al nostre estendard;
però per a ells no hi haurà pietat,
perquè Al·là ens ha volgut triomfants.

Les veles s'inflaran
el vent ens portarà
com un cavall desbocat per les ones.

I arribarà el dia de glòria,
quan ja no quedin cristians,
que cantarem la gran victòria
dels fidels valents fills d'Al·là;
i aquest mar estimat serà nostre,
serà el mar dels germans musulmans.

Les veles s'inflaran
el vent ens portarà
com un cavall desbocat per les ones.

ÍNDICE

Índice

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	7
1. El Virus de la Inmunodeficiencia humana (HIV)	7
1.1. Su Genoma y proteínas	8
1.2. El ciclo de replicación	11
1.3. Tratamiento antirretroviral	12
2. La latencia del HIV	14
2.1. Tipos de latencia: pre y postintegración del HIV	15
2.2. Factores que contribuyen a la latencia	18
2.2.1. El lugar de integración del HIV en el genoma huésped	18
2.2.2. Factores de transcripción celulares	22
2.2.3. La organización de la cromatina del HIV	25
2.2.4. La proteína Tat	27
2.2.5. MicroARNs	29
2.3. Modelos <i>in vitro</i> utilizados para estudiar la latencia	31
2.4. La latencia viral, ¿nuevas estrategias terapéuticas?	33
3. Factores implicados en la elongación de la ARN polimerasa II y en la organización de la cromatina	35
3.1. SPT6	38
3.2. CHD1	40
3.3. ASF1A	41
3.4. HIRA	42
3.5. SUPT16H	43
3.6. BRG1	46
3.7. TFIIS	48
3.8. YY1	49
3.9. HP1	50

III. OBJETIVOS	55
IV. RESULTADOS	59
1. Producción de líneas celulares con una integración latente o activa del HIV	59
1.1. Producción del modelo celular de latencia del virus HIV	59
1.2. Caracterización de la actividad transcripcional de clones latentemente infectados	61
2. Análisis del lugar de integración del HIV en clones latentemente infectados	65
2.1. PCR para localizar integraciones en regiones alfoideas	65
2.2. Secuenciación de los lugares de integración mediante ligación de adaptadores	68
3. Relación entre los transcritos virales y los generados por el gen donde se ha integrado el genoma del HIV: HIV en el gen UBXD8 en sentido co-transcripcional	75
3.1. Cuantificación de la expresión del gen huésped	75
3.2. Tipos de transcritos producidos	76
3.3. Cuantificación de los transcritos observados	86
3.3.1. Transcritos producidos en el promotor viral y en los alrededores de la integración	86
3.3.2. La integración del HIV afecta la expresión del gen huésped UBXD8	89
4. Relación entre los transcritos virales y los generados por el gen donde se ha integrado el genoma del HIV: HIV en el gen UTX en sentido contrario al de la transcripción del gen	92
4.1. Cuantificación de la expresión del gen huésped	92
4.2. Tipos de transcritos producidos	93
4.3. Cuantificación de los transcritos observados	96
5. Influencia de factores que controlan la estructura de la cromatina sobre el estado latente del virus del HIV	99
5.1. SPT6 y CHD1	100
5.1.1. Efecto de la depleción de SPT6 y CHD1 sobre la latencia del HIV	100
5.1.2. Depleción de factores de reensamblaje de la cromatina en	

un modelo de latencia en Hela	109
5.1.3. Especificidad de las secuencias de los shRNAs de SPT6 y CHD1	113
5.1.4. Efecto de la depleción de SPT6 sobre la síntesis de transcritos desde el promotor del HIV	115
5.1.5. Efecto combinado de inhibición de SPT6 y tratamientos con TNF o HMBA sobre la reactivación del HIV latente	117
5.1.6. Efectos globales de la depleción de SPT6 sobre la expresión génica	120
5.1.7. Relación entre los niveles de expresión del gen huésped y los del provirus del HIV integrado	126
5.1.8. Efectos a corto plazo de la inhibición de SPT6 sobre la expresión de HIV y UBXD8	133
5.1.9. Análisis mediante digestión con mononucleasa del efecto de la depleción de SPT6 sobre la estructura cromatínica del promotor viral integrado	134
5.2. ASF1A, HIRA y SUPT16H	142
5.3. TFIIS	144
5.4. BRG1	146
5.5. YY1	147
5.6. HP1 β	148
6. Cribado de moléculas químicas que puedan reactivar el virus HIV latentemente infectado	150
6.1. Análisis de los compuestos obtenidos por cribado de una librería de moléculas químicas	150
6.2. Cribado virtual y <i>target fishing</i>	157
6.3. Caracterización de un nuevo compuesto derivado de los compuestos positivos originales de clase I	162
6.3.1. Descubrimiento del compuesto A36	162
6.3.2. Cuantificación de la transcripción del HIV en respuesta a A36	165
6.3.3. Combinación de A36 con otros compuestos activadores	

del HIV	166
6.3.4. Búsqueda del mecanismo de acción mediante el cual está actuando A36	171
6.3.5. Análisis del efecto de A36 sobre un modelo de HIV en células 293T	174
6.3.6. Efecto de A36 sobre diversas vías de señalización celular	175
6.3.7. Estudio de la implicación de A36 sobre las vías de la quinasa PKC, de la MAP quinasa ERK y de la PI3K	176
6.3.8. Análisis del ciclo celular tras el tratamiento con el compuesto A36	179
6.3.9. Estudio del efecto de otros compuestos derivados de las moléculas originales de clase I	180
V. DISCUSIÓN	187
1. Generación de un modelo celular de latencia e influencia del lugar de integración en el estado latente del HIV	187
2. Caracterización de los transcritos producidos en clones cuya integración del HIV se localiza en intrones de genes activos	191
3. La estructura de la cromatina como factor represor del virus latentemente infectado	200
3.1. Complejos remodeladores de la cromatina	200
3.2. BRG1	213
3.3. TFIIS	214
3.4. YY1	215
3.5. HP1 β	215
4. Análisis de compuestos químicos que reactivan el virus HIV	217
VI. CONCLUSIONES	229
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	233
A. Material	233
1. Reactivos	233

2. Plásmidos	233
3. Oligonucleótidos	234
4. Anticuerpos	238
5. Secuencias de los shRNAs	238
B. Métodos 239	
1. Cultivo celular	239
2. Western Blot	239
3. Secuenciación de lugares de integración del HIV en el genoma humano	239
4. Detección de la integración del HIV en repeticiones alfoideas	240
5. Transformación de plásmidos en bacterias	241
6. Generación de líneas estables por infección retroviral/lentiviral	241
7. Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y PCR a tiempo real	241
8. Mapeo de nucleosomas por sensibilidad a MNasa	242
9. Ensayos de actividad luciferasa	242
10. Citometría de flujo	243
11. Separación celular	243
12. Análisis del ciclo celular	243
VIII. BIBLIOGRAFÍA	247
IX. ANEXO 1	
X. ANEXO 2	

RESUMEN

Resumen en castellano

El establecimiento de un reservorio latente del virus del HIV en células T CD4+ es la mayor barrera contra la erradicación de esta enfermedad, convirtiéndola en crónica. Para lograr su erradicación, se necesitaría combinar la terapia antirretroviral HAART con drogas capaces de reactivar los virus durmientes. El objetivo principal de este estudio es entender cómo se establece la latencia tras la integración del virus en el genoma, con el propósito de identificar factores involucrados que pudieran ser las dianas de una nueva terapia. Hemos generado una librería de clones que contienen un minigenoma latente del virus que expresa GFP como reportero cuando se reactiva. Esta librería permite estudiar la posible relación existente entre el estado de la cromatina en el lugar de integración y la actividad del promotor. También hemos estudiado la implicación de la interferencia transcripcional en el establecimiento de la latencia en los clones cuya integración del HIV ha tenido lugar en genes transcripcionalmente activos. Para investigar el mecanismo de represión durante la latencia, se han llevado a cabo depleciones de factores relacionados con el reensamblaje de la cromatina y proteínas relacionadas con represión transcripcional mediante expresión de shRNAs. Finalmente, hemos buscado drogas que puedan reactivar el virus latente como posible terapia a combinar con la terapia antiretroviral con el objetivo de erradicar completamente el virus en pacientes crónicos.

Resumen en inglés

The establishment of a latent HIV reservoir in CD4⁺ T cells is the main barrier to prevent the eradication of the virus and converts its infection in a chronic disease. To achieve its eradication, it would be needed to combine HAART with drugs able to reactivate the dormant viruses. The main objective of this study is to understand how latency is established after proviral integration into the genome, with the aim of identifying factors involved that could be targeted by new therapeutic approaches. We have generated a library of clones containing a latent HIV minigenome that expresses GFP as a reporter only when reactivated. This library allows the study of the relationship between the chromatin state at the site of integration and HIV promoter activity. We have also studied the implication of transcriptional interference in the establishment of latency in those clones where HIV has integrated in transcriptionally active genes. To further investigate the mechanism of transcriptional repression in latency we have performed knockdowns of known chromatin reassembly factors and repression-related proteins by using shRNA expression. Finally we have searched drugs that can reactivate the latent HIV as a possible therapy to combine with HAART directed to the complete clearance of HIV from chronic patients.

INTRODUCCIÓN

1. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) es el virus que causa el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y fue aislado por primera vez en 1983 (Barre-Sinoussi et al. 1983), dos años después de los primeros casos documentados de la enfermedad. Existen dos tipos de HIV: HIV-1 y HIV-2, ambos transmitidos por contacto sexual, sangre y de madre a hijo y tienen idéntica clínica. En cambio, el virus de tipo HIV-2 se transmite más difícilmente y su periodo entre la infección y la aparición de síntomas es mucho más amplio. El tipo predominante en el mundo es el de tipo HIV-1, mientras que el de tipo HIV-2 se concentra en el Oeste de África. Se cree que el HIV se transfirió de los chimpancés a los humanos a principios del siglo XX.

Actualmente se calcula que más de 33,4 millones de personas padecen esta enfermedad en todo el mundo. En el año 2007 hubo 2,7 millones de nuevas infecciones y 2 millones de muertes relacionadas con el SIDA, según datos del conjunto de las Naciones Unidas contra el SIDA (UNAIDS). Esta enfermedad tiene una extensión a nivel global, aunque los países con mayor número de infecciones se concentran en África subsahariana (Figura 1)

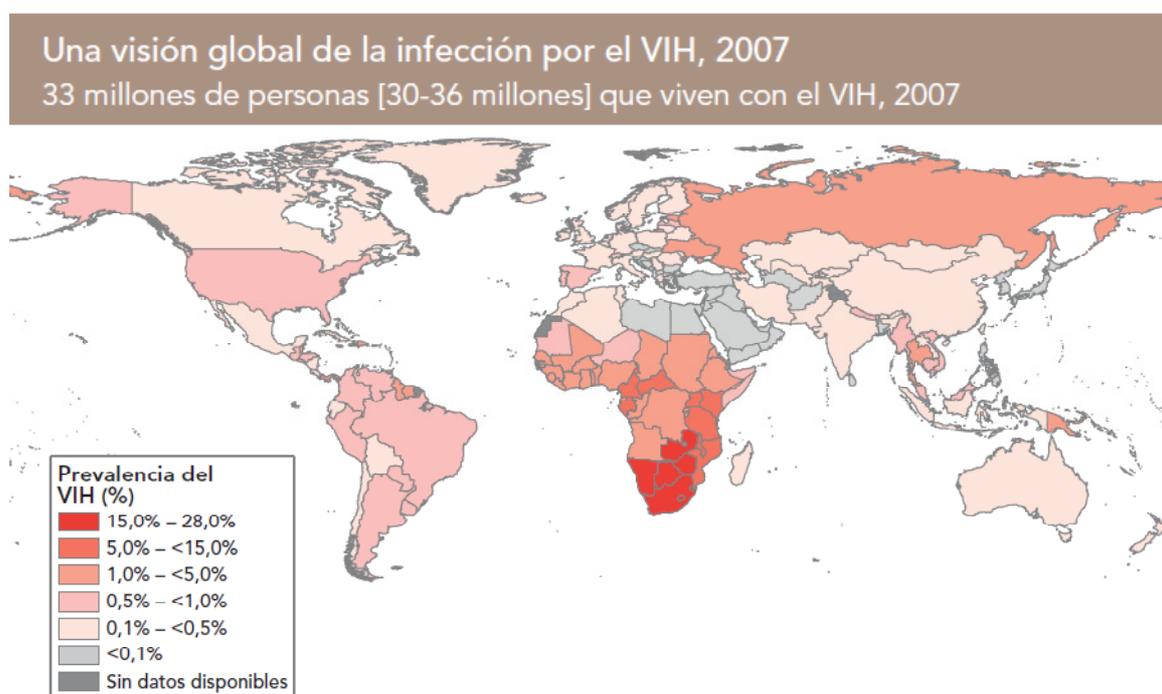


Figura 1. Datos de prevalencia del HIV a nivel mundial a finales del año 2007, extraídos de la UNAIDS (www.unaids.org).

1.1 SU GENOMA Y PROTEÍNAS

El HIV pertenece a la clase de virus llamada retrovirus, y dentro del subgrupo lentivirus, cuya traducción significa virus lento, debido al periodo largo de tiempo que pasa entre la infección y la aparición de los síntomas de la enfermedad. El virus tiene forma esférica y mide unos 100-120nm de diámetro y está compuesto por una bicapa lipídica externa, la cual pertenecía a la membrana plasmática de la célula huésped pero que contiene proteínas propias, una matriz y una nucleocápside que contiene el genoma viral y enzimas propias del virus (Figura 2).

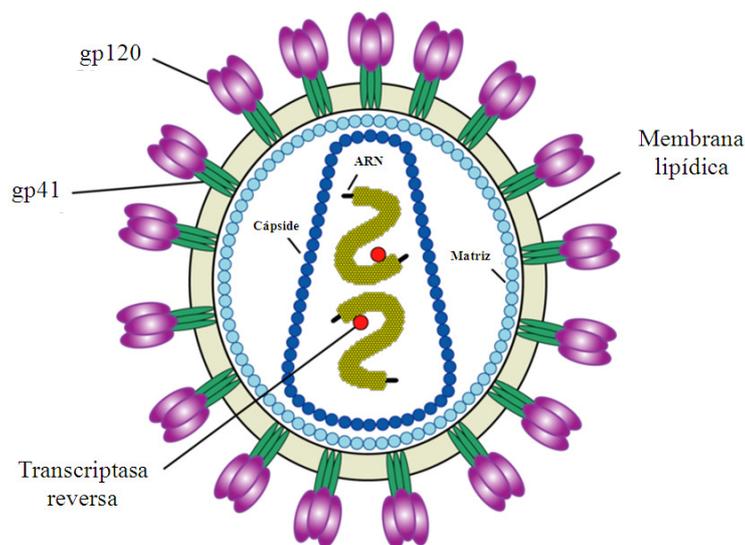


Figura 2. Representación de la estructura del virus del HIV.

La información genética del HIV está compuesta por dos copias de ARN de hebra simple, ARN que es retrotranscrito a ADN mediante la enzima transcriptasa inversa en el citoplasma celular. El ADN viral viaja entonces al núcleo donde se integra dentro del genoma huésped. El virus del HIV o provirus mide unos 9800 pares de bases y en ambos extremos se hallan los LTR (*long terminal repeat*) que son unas secuencias repetitivas que tienen como función ayudar a la integración del genoma viral en el genoma huésped. A parte, el extremo 5'LTR tiene función promotora. Dentro de la cápside, aparte de encontrar el genoma viral, se encuentran tres proteínas: la transcriptasa inversa, una proteasa y una integrasa. La secuencia del HIV tiene 9 genes, que codifican para proteínas de tres tipos: estructurales (gag, pol y env), reguladoras (Tat y rev) y accesorias (vif, vpr, vpu, nef) (Figura 3).

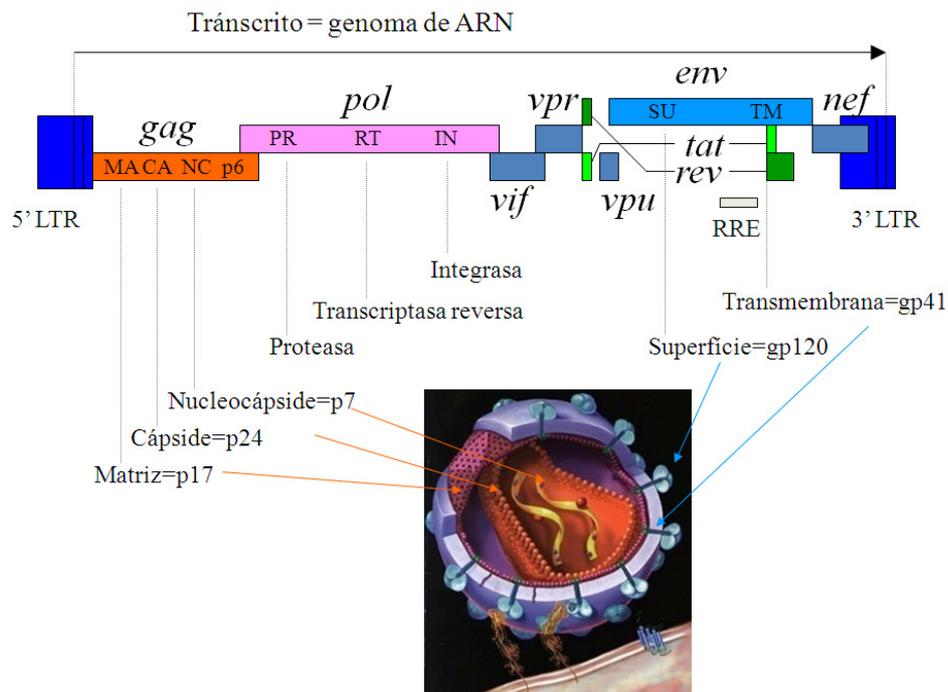


Figura 3. Estructura del genoma del virus del HIV

Las proteínas estructurales están codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*:

- El gen *gag* codifica para una poliproteína llamada p55, la cual es cortada por la proteasa codificada en la región *pol* en cuatro proteínas: **p17**, que forma la matriz del virus, **p24** la cual forma la cápside y **p6** y **p7**, que forman la nucleocápside (revisado por Kattenbeck et al. 1996).
- El gen *pol* es producido como una proteína precursora *gag-pol*, la cual es cortada por la proteasa vírica, formando las proteínas p55 y *pol*. A su vez, la proteína *pol* es digerida en tres proteínas: la **proteasa** que digiere las poliproteínas *gag-pol*, y posteriormente corta *gag* y *pol* para producir las proteínas virales finales, la **transcriptasa reversa**, que sintetiza una cadena de ADN de doble hebra a partir del ARN viral de cadena simple y la **integrasa** que integra el ADN de doble cadena en el genoma huésped una vez ha viajado al núcleo.
- El gen *env* codifica para una poliproteína p160 que será cortada formando las proteínas **gp41** y **gp120**. **gp41** es la proteína transmembrana del virus y **gp120** es una proteína de superficie, la cual está unida a **gp41** y es la que se encarga de unirse a las membranas de las células huésped previamente a la infección.

Las proteínas reguladoras codificadas a partir de la secuencia viral son **Tat** y **rev**:

- Tat (*transactivator of transcription*) es la proteína transactivadora del virus de la cual existen dos formas, una corta de 72 aminoácidos, la cual es poco abundante, y una larga de 101 aminoácidos la cual es más abundante y contiene los dos exones de la proteína. Su función es unirse a una secuencia de ARN llamada TAR y activa la transcripción a partir del promotor situado en el 5'LTR (revisado en Romani et. al. 2009).
- Rev (*regulator of virion expression*) a su vez se une a la región RRE presente en la secuencia de env y es la responsable de regular el exporte nuclear y la estabilización del ARN mensajero.

Las proteínas accesorias son **vif**, **vpr**, **vpu** y **nef**:

- Vif (*viral infectivity factor*) es la proteína responsable de promover la infectividad pero sin producir partículas virales. Es capaz de inactivar el complejo celular represor APOBEC3G (proteína de la célula huésped que disminuye la efectividad del ciclo viral tras la infección) ya que es capaz de aumentar su degradación mediada por el proteasoma.
- Vpr (*viral protein R*) interacciona con la proteína p6 de la nucleocápside y sus funciones están relacionadas con el transporte del complejo de preintegración al núcleo. Se cree que el gen Vpx presente en el virus de tipo HIV-2 y en el virus SIV es el resultado de la duplicación del gen Vpr, posiblemente por recombinación.
- Vpu (*viral protein U*) es única en HIV-1 y no se encuentra en HIV-2 o en SIV. Ha sido relacionada con la degradación de la proteína CD4 la cual es la responsable de interactuar con la poliproteína viral gp160 y retenerla en el citoplasma. La degradación de CD4 mediada por Vpu libera la proteína gp160, permitiendo el corte y formación de gp41 y gp120. Una segunda función de esta proteína es la de facilitar la liberación de los viriones.
- Nef (*negative expression regulatory factor*) es la proteína que aumenta la infectividad viral, reduciendo la presentación inmunogénica del virus y previniendo las células del ataque citotóxico de los linfocitos T.

1.2 EL CICLO DE REPLICACIÓN

Los virus no tienen capacidad de replicarse por sí mismo y por ello deben utilizar las células huésped para llevar a cabo su ciclo viral, utilizando la maquinaria de las células infectadas. El virus del HIV infecta principalmente los linfocitos T CD4+, pero también otros tipos celulares, como por ejemplo monocitos, macrófagos y células dendríticas, entre otros.

El ciclo de replicación del virus del HIV se divide en varias etapas (Figura 4):

- **Fusión.** La primera etapa en la infección del virus consiste en el reconocimiento y unión de las partículas virales a la célula diana. Para ello, las proteínas gp120 y gp41 del virus reconocen los receptores CD4 de los linfocitos T, ayudadas por los correceptores de membrana CXCR4 o CCR5 y permitiendo la fusión con la membrana de la célula huésped (Berger et al. 1999).
- **Transcripción inversa.** Después de la fusión, la cápside viral entra en el interior de la célula infectada y se libera su genoma formado por las dos cadenas sencillas de ARN. En el citoplasma de la célula huésped se lleva a cabo la producción de ADN de cadena doble a partir de las cadenas simples de ARN vírico, proceso que se lleva a cabo gracias a la enzima llamada transcriptasa inversa que viaja con el virión asociada al ARN.
- **Integración.** El ADN de doble cadena o ADN proviral que ha sido formado en el citoplasma de la célula es capaz de viajar hasta el núcleo, donde se integra en el genoma de la célula huésped gracias a la enzima integrasa, que viajaba dentro de la cápside del virión.
- **Transcripción.** Una vez el ADN viral ha sido integrado dentro del genoma, la célula huésped no puede reconocer el genoma viral como un ADN extraño así que la maquinaria de la transcripción de la célula infectada empieza a formar transcritos virales. Una vez que el ARN mensajero o ARNm se ha procesado, puede salir del núcleo utilizando los poros nucleares.
- **Ensamblaje.** El ARNm es traducido en el citoplasma de la célula y da como resultado poliproteínas que deben ser cortadas para poder ser activas. La enzima del HIV llamada proteasa es la que se encarga de esta función, es decir, es la responsable de digerir las poliproteínas en proteínas únicas procesadas que son funcionales. Las proteínas del virus se ensamblan juntamente con el ARN viral para formar los componentes internos del virión.

- **Gemación.** Por último, el material del virus se encapsula dentro de una gema que se forma gracias a la membrana citoplasmática de la célula huésped y se acaba desprendiendo de la célula, formando el nuevo virión.

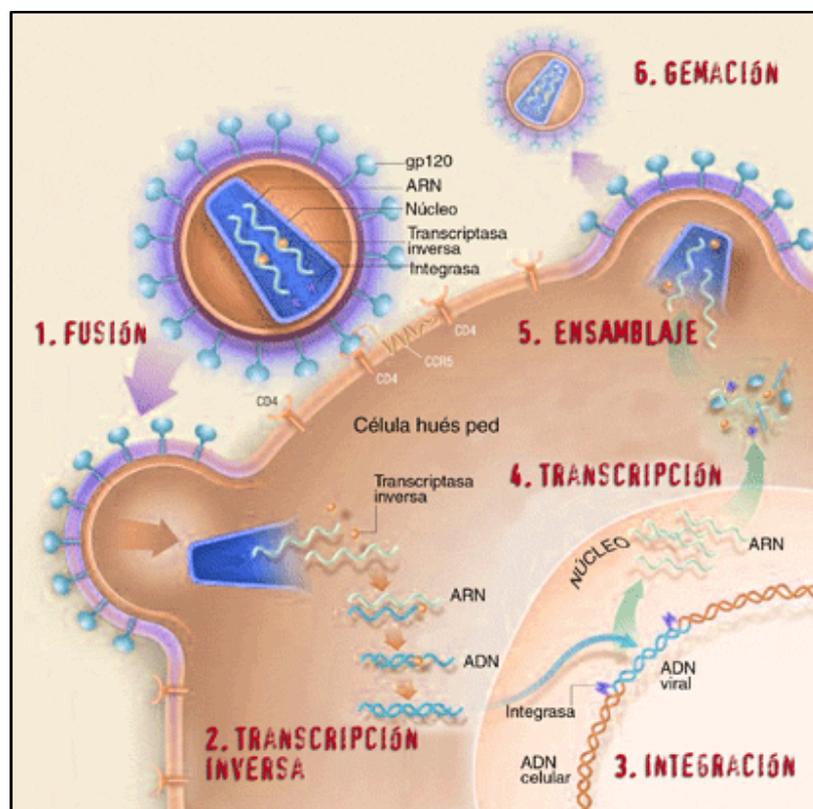


Figura 4. Ciclo de replicación del virus del HIV

1.3 TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Los linfocitos T CD4+ juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria. Normalmente, una persona sana tiene una cantidad de linfocitos T de entre 800 y 1200 por milímetro cúbico de sangre. Debido a que estas células son destruidas por la infección del virus del HIV, su número disminuye en personas infectadas. Una vez los valores de linfocitos T CD4+ han llegado a valores entre 350 y 500 por milímetro cúbico se empieza la terapia antirretroviral, también dependiendo de los síntomas padecidos por el paciente. Una vez que el paciente llega a números de unos 200 linfocitos por milímetro cúbico, éste es mucho más propenso a tener infecciones por enfermedades oportunistas graves.

El tratamiento antirretroviral se basa en atacar las enzimas y las vías esenciales del ciclo de replicación del virus del HIV. Los tipos de tratamientos se pueden separar según sus dianas de acción:

- **Inhibidores de la transcriptasa reversa.** Este tipo de tratamiento se caracteriza por bloquear la síntesis de ADN de doble cadena que crea la transcriptasa reversa del virus a partir del RNA viral. Para ello, se utilizan 3 sistemas: 1) Inhibidores nucleósidos, 2) Inhibidores nucleótidos y 3) Inhibidores no nucleósidos. Los dos primeros bloquean la enzima a través de una interacción con el centro catalítico, mientras que el tercero lo hace a través de un dominio alosterico cercano al centro catalítico. Los dos primeros actúan como inhibidores competitivos de los sustratos normales de la enzima, los deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), no obstante los inhibidores nucleótidos tienen la ventaja de tener un grupo fosfonato (C-PO(OH)₂) que no puede ser cortado por las hidrolasas, haciendo que su unión en el extremo 3'-terminal sea más fuerte. El mecanismo de acción de los inhibidores no nucleósidos no es muy conocido, pero se sabe que interaccionan con un dominio de unión cercano al centro catalítico y se sospecha que esa unión, al ser tan próxima, interfiere con el centro catalítico perturbando el funcionamiento normal de la transcriptasa reversa.
- **Inhibidores de la proteasa.** Casi todos los inhibidores de proteasas se basan en mimetizar el enlace entre péptidos, el cual es cortado por la proteasa viral. Para ello contienen una estructura hidroxietileno que se parece al enlace del polipéptido del virus, pero esta unión no puede ser cortada por la proteasa. Es por esta razón que previenen que la proteasa realice su función en el procesamiento proteolítico del polipéptido viral, precursor de las proteínas virales maduras.
- **Inhibidores de la fusión.** Existe un inhibidor de la fusión entre la célula huésped y el virus. Esta droga es homóloga a una región de la glicoproteína viral gp41, y es capaz de unirse a esta región, impidiendo la fusión del virus con la membrana celular.
- **Inhibidores de los coreceptores.** Estos inhibidores interaccionan con los coreceptores CCR5 y CXCR4 usados, respectivamente, por las cepas de HIV M (macrófago) y T (linfocito) trópicas, para entrar en las células diana. De todo el proceso de entrada del virus, la interacción de la glicoproteína viral gp120 con

los correceptores se produce entre la interacción de la misma glicoproteína con el receptor CD4 y la fusión de gp120 con la membrana celular externa.

- **Inhibidores de la integrasa.** Aunque la integrasa ha sido estudiada durante muchos años como una diana potencial en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el HIV, sólo recientemente se ha conseguido obtener un compuesto eficaz. La integrasa tiene dos funciones catalíticas importantes: procesado 3' y transferencia de cadenas. El mecanismo de acción de estos compuestos no está descrito.

La enzima transcriptasa reversa del virus del HIV no tiene la capacidad de corregir los errores que va introduciendo, la cual cosa va aumentando la cantidad de mutaciones que se van introduciendo en la secuencia viral. La gran mayoría de estas mutaciones hacen que el virus no pueda reproducirse de manera correcta o no dan ningún tipo de ventaja a la secuencia comparando con la secuencia original del virus. Aun así, existe una pequeña cantidad de mutaciones que producen resistencias a los fármacos utilizados en la terapia antirretroviral. Desde 1996 se empezó a ver la importancia de combinar los diferentes tipos de drogas antirretrovirales, tal y como se había hecho con pacientes que padecían tuberculosis. Esta terapia se llamó HAART (*highly active antiretroviral therapy*) y su administración obtenía un sinergismo entre los diferentes compuestos al actuar sobre diversas dianas de acción, se podían disminuir las dosis de las diferentes drogas reduciendo los efectos secundarios tóxicos y se disminuía el desarrollo de resistencias a las drogas, debido a que disminuían mucho el número de copias virales en sangre.

2. La latencia del HIV

Aunque el virus del HIV replica continuamente durante la infección en pacientes no tratados, se ha descrito un estado de latencia del virus del HIV a nivel celular. Este estado de latencia es reversible y se caracteriza por un estado de infección no productivo que permite a algunos virus evadir las respuestas inmunes del huésped. Durante la latencia, el virus no se transcribe y por lo tanto no expresa sus propias proteínas. Esto hace que las células infectadas latentemente sean inmunológicamente indistinguibles de una célula no infectada, y son insensibles al tratamiento con la terapia antirretroviral, la cual es únicamente capaz de atacar las proteínas virales durante el ciclo de replicación.

A pesar de que la frecuencia de células latentemente infectadas sea de 1 entre un millón de células T CD4+ en reposo, el hecho que persistan incluso después de haber inhibido la replicación viral mediante la terapia antirretroviral y de que creen un reservorio de células latentes no distinguibles de las células no infectadas hace de estas células la gran barrera para la erradicación del virus del HIV.

2.1 TIPOS DE LATENCIA: PRE Y POSTINTEGRACIÓN DEL HIV

Se han descrito dos tipos de latencia del HIV: la latencia pre y la latencia post-integración del HIV.

La latencia pre-integración del HIV se observa tras la infección del HIV en células en reposo, las cuales están inactivadas. El genoma viral se queda en el citoplasma de la célula huésped libremente, sin llegar a ir al núcleo e integrarse (Figura 4). Este estado latente se caracteriza por una transcripción reversa incompleta del genoma viral debido a la acción de la proteína APOBEC3G. Esta proteína es una deaminasa que actúa como restricción tras el paso del HIV por la membrana citoplasmática debido a su capacidad de añadir mutaciones en el ADN que se está formando durante la transcripción reversa tras la infección (Chiu et al. 2005). La proteína Vif viral es la responsable de aumentar la degradación de esta proteína, protegiendo así la integridad del genoma viral. La ineficiencia de la transcripción reversa en las células en reposo también se debe a una reducción de la cantidad de dNTPs presentes en células metabólicamente inactivas (Gao et al. 1993) así como una disminución en el importe del genoma del HIV retro-transcrito al núcleo debido a las reducidas cantidades de ATP presentes en las células en reposo (Chiu et al. 2005). Aún así, la latencia pre-integración del virus no es clínicamente importante ya que la vida media del genoma viral incompletamente retro-transcrito y no integrado es de un día, la cual cosa no crea un población de células latentemente infectadas.

La latencia post-integración del HIV ocurre cuando una célula T CD4+ activa es infectada con el virus del HIV, el genoma viral se integra en el genoma huésped y tras la infección y la integración, esta célula se revierte a un estado de célula de memoria en reposo (Figura 5). Durante este estado de latencia, el genoma del provirus no se puede expresar y está en un estado reversiblemente silenciado.

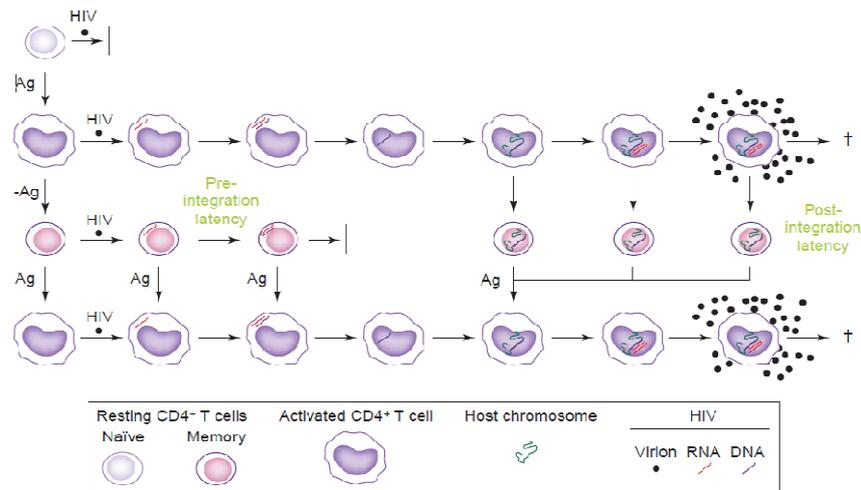


Figura 5. Representación de los dos tipos de latencia: latencia pre y post-integración. Figura extraída de Lassen et al. 2004

Este modelo de latencia post-integración sugiere que las células infectadas de forma activa estarían revertiendo a un estado de latencia continuamente, añadiendo células al reservorio latente de manera dinámica. Los virus también saldrían del reservorio como células en reposo que se activan (Figura 6A). Cuando los pacientes son tratados con la terapia antirretroviral HAART, la disminución de la viremia en sangre disminuye mucho la cantidad de nuevas células infectadas que revierten a un estado de latencia. En este tipo de casos, se observa una salida del reservorio también disminuida debido a que la terapia antirretroviral revierte el fenómeno de hiperactivación inmune que es característico de las infecciones no tratadas con HAART (Figura 6B).

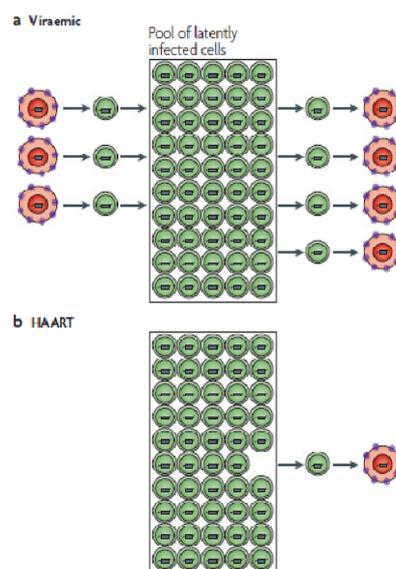


Figura 6. Dinámica del reservorio de células latentes, en un estado de no tratamiento (A) y de células tratadas con antirretrovirales (B). Figura extraída de Han et al. 2007.

Durante este tipo de latencia el genoma viral no se expresa ya que está silenciado, pero esta situación se puede revertir y dar lugar a una expresión activa del promotor viral, mediante la estimulación antigénica y mediante la inducción con citoquinas, mitógenos o ésteres de forbol (Figura 7).

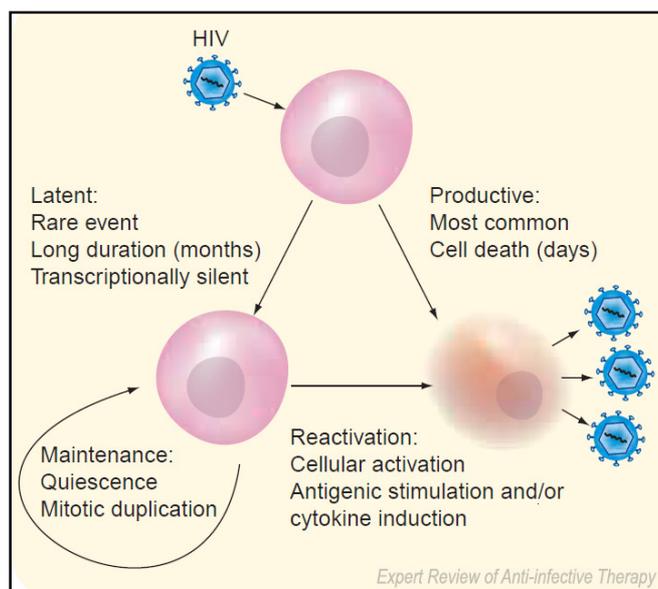


Figura 7. Infección activa y latente del promotor del HIV. Reactivación de la infección latente. Figura extraída de Bisgrove et al. 2005.

Tras el tratamiento con la terapia antirretroviral, la viremia en sangre disminuye 100 veces durante las dos primeras semanas. Esta disminución inicial tan rápida se debe a que la gran mayoría de virus que hay en plasma se producen en los linfocitos T CD4+, los cuales tienen un periodo de vida muy corto ($t_{1/2} = 1$ día). Una segunda disminución de células infectadas se observa posteriormente, las cuales corresponden a los macrófagos ($t_{1/2} = 2$ semanas). Esta segunda fase lleva a un nivel de viremia por debajo de 50 copias de ARN viral por ml de plasma. La presencia de un reservorio de células latentes fue estudiada de manera longitudinal en un grupo de pacientes tratados largamente con la terapia antirretroviral. Estos estudios mostraron que los reservorios de células latentes eran estables, observándose una $t_{1/2}$ de 44 meses. A esta velocidad de disminución, la erradicación de un reservorio consistente en 10^6 células llevaría un periodo de tiempo de 73 años (revisado en Persaud et al. 2003) (Figura 8).

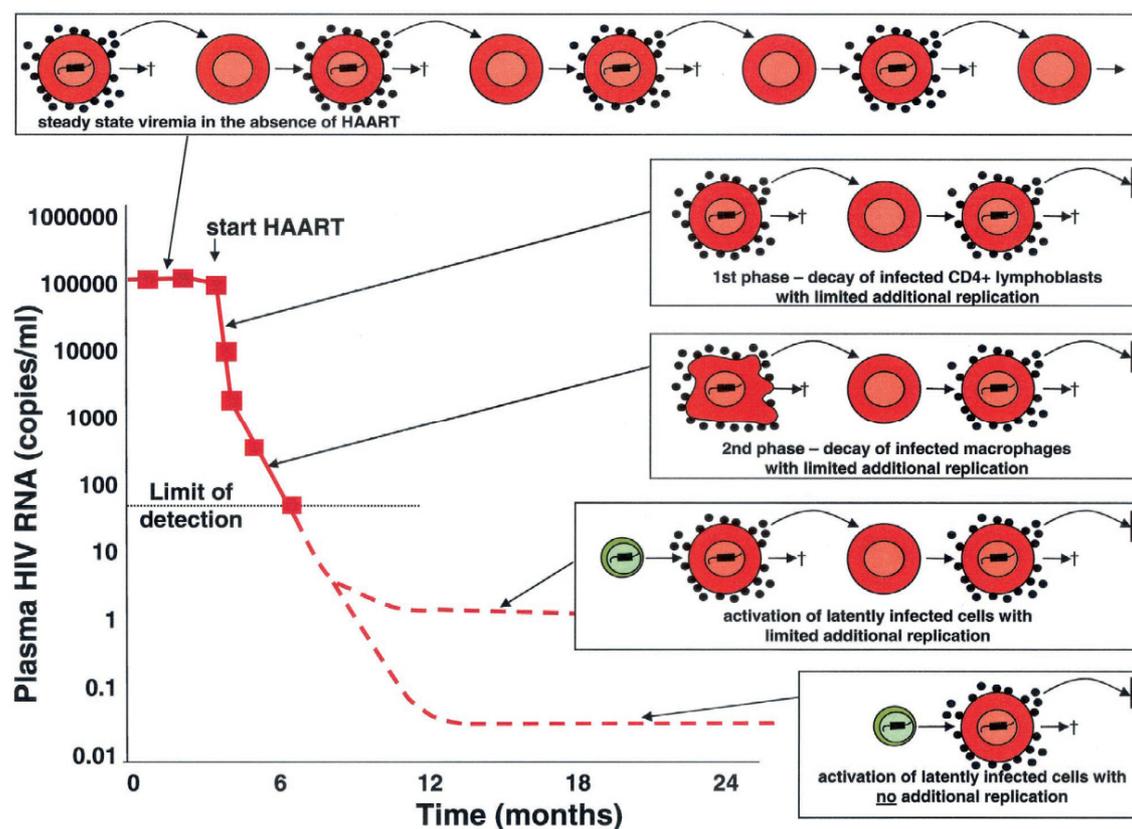


Figura 8. Esquema de la disminución de viremia en sangre tras el tratamiento con la terapia antiretroviral durante el tiempo. Figura extraída de Persaud et al. 2003.

2.2 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA LATENCIA

Durante todos estos años se ha hecho un gran esfuerzo en entender los mecanismos que llevan al estado de latencia de un genoma integrado latentemente. Se han propuesto varios mecanismos para establecer y mantener la latencia post-integración en una infección mediada por el virus del HIV. Algunos de los mecanismos más importantes son el lugar de integración del HIV, la falta o presencia de factores de transcripción, el ambiente cromatínico alrededor de la integración, la proteína Tat y los factores asociados a ella y el ARN interferente. A continuación se detallan cada uno de ellos.

2.2.1. El lugar de integración del HIV en el genoma huésped

El virus del HIV se integra de una manera no aleatoria dentro del genoma de la célula huésped. Varios estudios han revelado que el lugar de integración viral en el genoma juega un papel muy importante en el establecimiento de la latencia post-integracional. Utilizando unas células de linfocitos T con una integración latente del promotor del HIV

se vio que el provirus latente se integraba en regiones de secuencias repetitivas dentro del genoma, tales como las regiones alfoideas, las cuales se situaban en heterocromatina centromérica (Jordan et al. 2003). Un artículo reciente mostró una correlación entre la represión transcripcional del virus del HIV y su interacción con una región pericentromérica del cromosoma 12 en varios clones de linfocitos T CD4+ latentes en la periferia del núcleo (Dieudonné et al. 2009). Tras la activación del promotor viral, se seguía observando la localización pericentromérica del promotor viral, sugiriendo que ciertas regiones de la periferia nuclear pueden ser el lugar donde se produce una reactivación del virus.

Un análisis de los lugares de integración en células en reposo T CD4+ de pacientes tratados con HAART demostró que un 93% de las integraciones latentes se localizaban en regiones codificantes de genes (Han et al. 2004). A tener en cuenta de este estudio es el hecho que no pudieron ser capaces de diferenciar entre los provirus latentes o los defectuosos. Los provirus defectuosos tienen mutaciones que inhiben la replicación viral, y se ha estimado que hay 100 provirus defectuosos por cada provirus latente en el genoma huésped.

Al comparar un gran número de lugares de integración del HIV que llevaban a un estado latente o productivo (activo) del promotor, se observó que las células latentes se asociaban con una integración del HIV en heterocromatina centromérica (4.3% del total) pero también se encontraban en secuencias largas del genoma que no tienen genes que expresen proteínas (desiertos génicos) así como en intrones de genes altamente expresados (Lewinski et al. 2005).

El hecho de descubrir que una integración latente se está produciendo en un gen transcripcionalmente activo puede parecer paradójico pero se puede explicar por el fenómeno de interferencia transcripcional. La interferencia transcripcional (TI) se describe como el efecto negativo que se observa cuando una actividad transcripcional iniciada en un promotor suprime la transcripción de un promotor situado en una región corriente abajo, cercano al primero. En el caso del promotor del HIV, el hecho de estar integrado dentro de un gen activo, llevaría a su silenciamiento y al establecimiento del estado de latencia.

Se han descrito varios mecanismos que pueden llevar a producir la interferencia transcripcional:

1. **Estorbo o impedimento estérico.** Se produce cuando un provirus se integra en el mismo sentido transcripcional que el gen huésped. La ARN polimerasa II del gen pasa a través de la secuencia del promotor viral impidiendo la unión de factores de transcripción y de la ARN polimerasa al promotor del HIV (Figura 9).

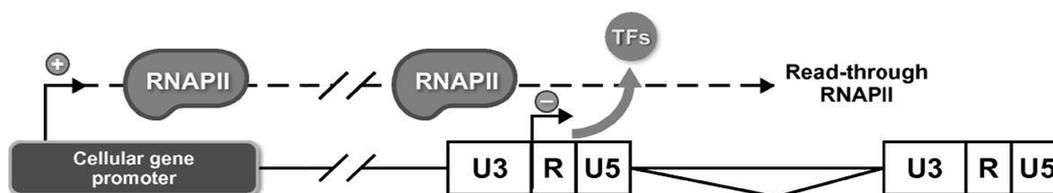


Figura 9. Interferencia transcripcional por impedimento estérico. Se produce cuando un promotor activo silencia la transcripción de un promotor secundario que se encuentra corriente abajo del primero. Figura extraída de Colin et al. 2009.

En un modelo de Hela en el que había dos promotores del HIV en tándem, el segundo promotor quedaba silenciado por la acción de la polimerasa del primer promotor (situado corriente arriba respecto al primero). Este silenciamiento se aliviaba tras añadir una secuencia terminadora entre dos promotores. En este modelo se vio que la represión que se observaba en el segundo promotor era debida a que no se podían unir correctamente las proteínas SP1 debido a los complejos de transcripción que venían del primer promotor (Greger et al. 1998).

Estudios llevados a cabo utilizando un sistema de levadura han demostrado que factores relacionados con la elongación, tales como SPT6, son los responsables de inhibir la iniciación de la transcripción de promotores crípticos. Estos factores de elongación serían los responsables de ayudar al replegado de las histonas y formar una estructura cerrada de la cromatina que no permitiría la transcripción de los promotores crípticos (Kaplan et al. 2003).

El hecho que la ARN polimerasa II pase por encima del promotor viral, silenciando su transcripción hizo pensar que el provirus integrado se estaba transcribiendo con otras regiones intrónicas del gen huésped, pero que simplemente se estaba perdiendo durante el proceso de *splicing*. Este mecanismo se ha descrito en un artículo en el cual utilizaban unas células latentes en linfocitos T CD4⁺ (Lenasi et al. 2008). En este estudio se demostró que la inhibición de la expresión del gen donde estaba integrado el HIV revertía la interferencia transcripcional. Han et al. en 2008, utilizaron un sistema de recombinación homóloga para insertar el HIV en un intrón en la misma orientación que

el gen endógeno o en el sentido contrario. Con este sistema mostraron que la expresión del promotor viral integrado en el mismo sentido del gen se veía aumentada, mientras que si la integración se daba en sentido contrario a la transcripción del gen, la transcripción del HIV se inhibía.

Otros estudios han mostrado que se puede revertir el estado de interferencia transcripcional tras la expresión de la proteína viral Tat (De Marco et al. 2008).

2. Oclusión del promotor. Se produce cuando el virus del HIV está integrado en sentido contrario a la transcripción del gen endógeno y se produce una colisión entre las ARN polimerasas que van transcribiendo (Crampton et al. 2006) (Figura 10). El resultado es una terminación temprana de la transcripción de ambos promotores o del promotor más débil.

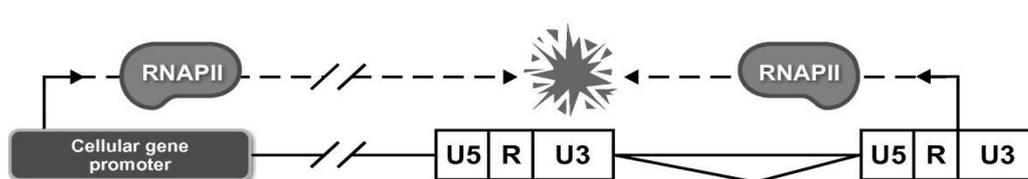


Figura 10. Representación del mecanismo de latencia mediante interferencia transcripcional del tipo oclusión del promotor. Figura extraída de Colin et al. 2009.

Prescott et al. en 2002 mostraron que en los genes *gal7* y *gal10* orientados de manera convergente y cuya transcripción coincidía en parte, la elongación se veía restringida y daba como resultado una disminución en la acumulación de ARNm total.

Este tipo de mecanismo también podría dar como resultado transcripción en ambos sentidos, formándose así ARNs de doble cadena que podrían silenciar la transcripción viral mediante la vía del ARN interferente.

3. Trampa del *enhancer*. Este tipo de interferencia transcripcional se puede llevar a cabo cuando un *enhancer* está situado cerca de un segundo promotor (Figura 11). En estos casos, la latencia del HIV se podría producir mediante la disminución en la transcripción por falta de un *enhancer* que estaría siendo utilizado por otro promotor cercano al promotor del HIV.

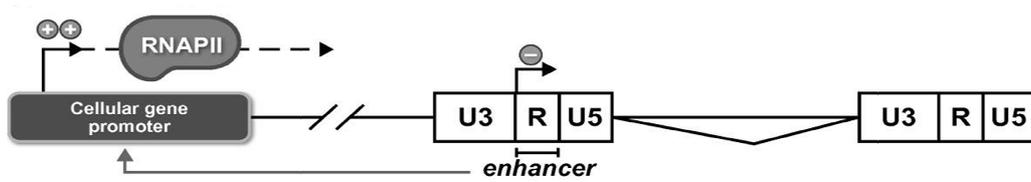


Figura 11. Esquema del mecanismo de interferencia transcripcional llamado “trampa del enhancer”. Figura extraída de Colin et al. 2009.

2.2.2. Factores de transcripción celulares

La activación del promotor viral se puede inducir por una gran cantidad de estímulos, tales como la unión de anticuerpos anti-CD3 al receptor de las células T, citoquinas (TNF α , IL-1 β , IL-7) y mitógenos como el éster de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) o la prostatina. Estos estímulos provocan cambios durante la activación de las células T y afectan la expresión génica mediante la activación de diferentes vías de señalización (Figura 12). Estas vías activan la transcripción del promotor viral debido a la inducción de factores de transcripción, tales como NF κ B, NFAT o AP1, los cuales se unen a lugares de unión presentes en la secuencia del virus del HIV.

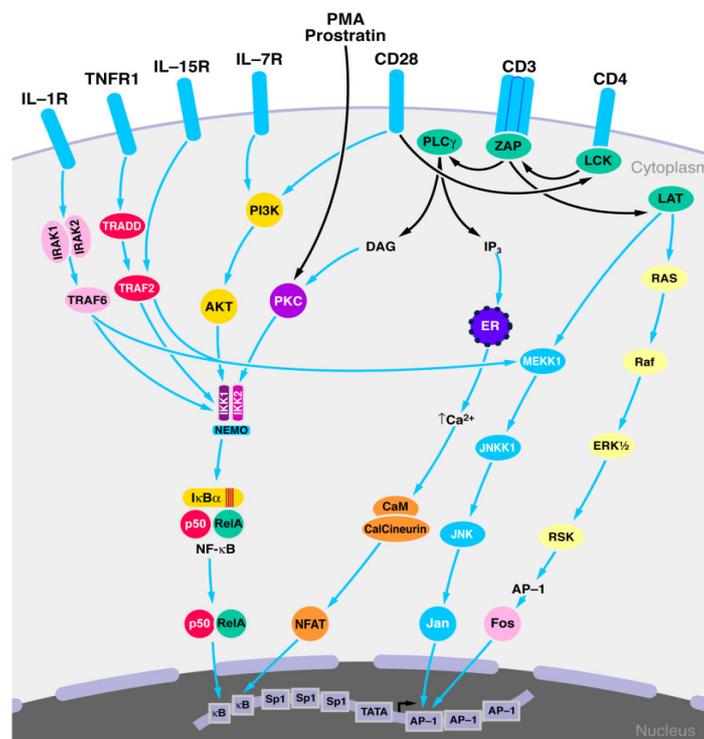


Figura 12. Diferentes vías de activación tras la activación de las células T. La activación de las células con varios estímulos es capaz de activar las vías de NF κ B, NFAT y AP1, promoviendo la activación del HIV. Figura extraída de Williams et al. 2007.

El LTR viral contiene dominios de unión para otros factores de transcripción, como LEF-1, COUP-TF, Ets1, SP1, USF, entre otros (Figura 13) (revisado en Rohr et al. 2003).

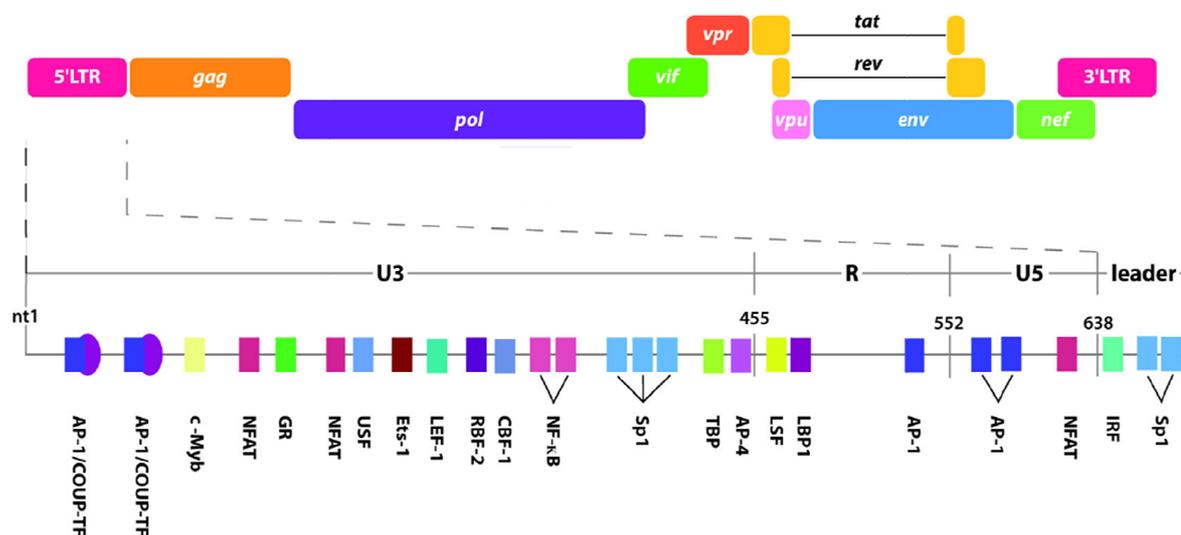


Figura 13. Dominios de unión de los diferentes tipos de factores de transcripción al promotor del HIV. Figura extraída de Colin et al. 2009.

Uno de los factores de transcripción cuya implicación con la activación del promotor del HIV ha sido más ampliamente estudiado es NFκB. En un modelo de latencia en linfocitos se observó que en un estado de no estimulación de las células, los homodímeros p50-p50 se unen al promotor viral, reclutando HDAC1, la cual lleva a un estado de silenciamiento mediado por deacetilación y a una estructura cromatínica represiva (Figura 14A) (Williams et al. 2006). En ausencia de estímulo, el complejo activador p65-p50 de la vía de señalización de NFκB está secuestrado en el citoplasma, unido a la proteína inhibidora IκB. Tras la estimulación de las células T, la proteína IκB es fosforilada por IKK y esta fosforilación disocia su unión a p65-p50 y lleva a la degradación a IKK. P65-p50 viaja hasta el núcleo y desplaza p50-p50 unido a HDAC1 (Figura 14B). A su vez, esta unión a los lugares para NFκB recluta histona acetiltransferasas, como CBP y p300, llevando a un estado de acetilación de la zona (Gerritsen et al 1997).

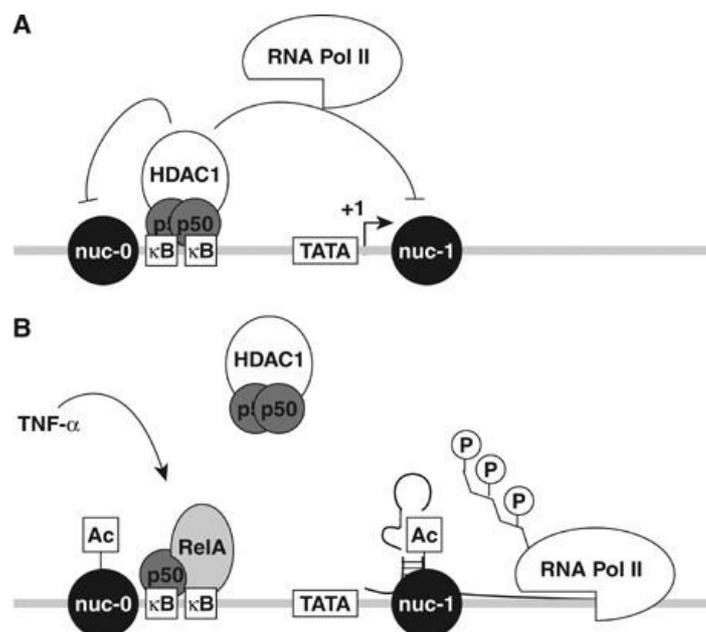


Figura 14. (A) El homodímero p50-p50 asociado a HDAC1 está unido a los lugares NFκB en el promotor viral en un estado no estimulado de las células (B) Tras la activación, p65-p50 se une a los lugares de unión para NFκB, desplazando a p50-p50. Figuras extraídas de Williams et al. 2006.

La subunidad p65 también es capaz de promover elongación de la ARN polimerasa II debido a su capacidad de reclutar quinasas que fosforilan y activan la polimerasa, tales como Cdk7/TFIIH (Kim et al. 2006) y pTEFb (Barboric et al. 2001). Cdk7/TFIIH fosforila la cola CTD (dominio carboxi-terminal) de la ARN polimerasa en su serina 5 y pTEFb la fosforila en la serina 2, fosforilaciones que son necesarias para la activación de la elongación de la polimerasa. La activación de la vía de NFκB parece ser muy importante para promover la iniciación de la transcripción. Se ha visto que niveles bajos de p65-p50 en el núcleo se correlacionan con bajos niveles de transcripción del HIV (Nabel et al. 1987).

La activación de las células T y el posterior aumento de Ca^{2+} en el citoplasma promueve la defosforilación del factor de transcripción NFAT mediante la acción de la Calcineurina, defosforilación que le permite viajar al núcleo de forma activa. NFAT tiene varios sitios de unión en la región U3 del LTR y un sitio de unión en el U5. Se ha descrito un papel de ayuda de NFAT a la activación del promotor viral mediada por NFκB en un modelo de latencia en linfocitos (Williams et al. 2004). El reclutamiento de coactivadores tales como p300 y CBP tras la activación mediada por NFAT (García-Rodríguez et al. 1998) sugieren que tal y como pasaba con NFκB, los miembros de la

familia de NFAT también podrían promover el remodelamiento de la cromatina en el promotor viral.

La activación de las células T también promueve la activación de los dímeros de AP1 (formados por los miembros de las familias Jun, Fos y ATF) mediante la activación de las quinasas JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y ERK (*extracelular signal-related kinase*) (Karin et al. 1997). La inhibición de la activación de AP1 con inhibidores de MAP quinasas suprime la expresión del promotor del HIV mediada por la activación del receptor de las células T (Yang et al. 1999)

2.2.3. La organización de la cromatina del HIV

Se han descrito dos nucleosomas bien posicionados en la región del 5'LTR, los cuales se llamaron nucleosoma 0 (nuc-0) y nucleosoma 1 (nuc-1) (Verdin et al. 1993) (Figura 15). Tras la activación de las células con $TNF\alpha$ o con agentes mitogénicos como el TPA se vio que el nuc-1 se remodelaba rápidamente, la cual cosa hizo pensar que este nucleosoma era el modulador de la actividad transcripcional del HIV.

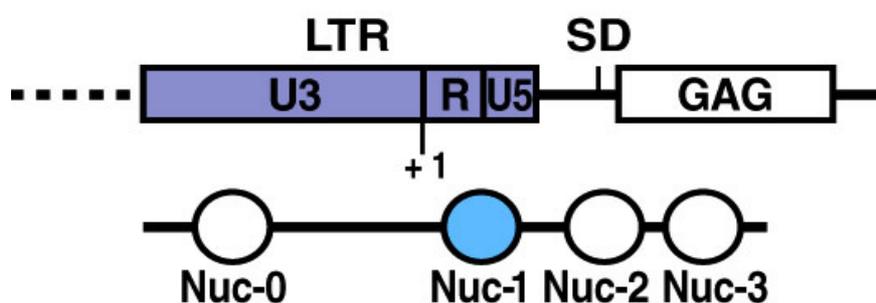


Figura 15. Distribución de los nucleosomas 0 y 1 dentro del LTR viral

El tratamiento con inhibidores de histonas deacetilasas (HDACs), tales como butirato sódico, tricostatina A (TSA) o ácido valproico resultó en el remodelamiento del nucleosoma 1 y la activación transcripcional del HIV (Laughlin et al. 1993, Van Lint et al. 1996). Estos resultados sugerían que el nuc-1 en células latentes está constitutivamente deacetilado por HDACs. La función positiva de la acetilación en la activación transcripcional del promotor del HIV latente se confirmó mediante ensayos con histonas acetiltransferasas (HATs). HATs purificadas estimulaban *in vitro* la actividad transcripcional de un ADN proviral plegado en estructura de cromatina (Steger

et al. 1998). Tras la activación de las células T, HATs incluyendo PCAF, GCN5 o CBP se reclutan al promotor, acetilando las histonas H3 y H4 (Lusic et al. 2003).

Se han descrito varios factores de transcripción que se unen al 5'LTR y que son capaces de reclutar HDACs al promotor viral, hecho que desfavorece la unión de la maquinaria de transcripción al promotor. La proteína LSF (Late SV40 Factor) se une al 5'LTR y es capaz de reclutar YY1 (Ying Yang 1) mediante la interacción con un dominio de dedos de Zinc, y YY1 a su vez recluta la HDAC1 al promotor viral (Coull et al. 2000). La forma no ligada del receptor de hormonas tiroideas (TR) disminuye la acetilación de histonas tras el reclutamiento de HDACs, mientras que el tratamiento con hormonas tiroideas revierte este efecto (Hsia et al. 2002). La unión de los homodímeros p50-p50 a los lugares de unión de NFκB recluta HDAC1, tal y como se ha comentado anteriormente (Williams et al. 2006). La proteína CBF-1 (*C-promoter binding factor*) contribuye a la represión mediante la unión al promotor del HIV. La inhibición de este factor de transcripción mediante la utilización de shRNAs da como resultado la reactivación del HIV latente, el reclutamiento de la ARN polimerasa II y un aumento en la acetilación de las histonas (Tyagi et al. 2007). c-Myc se recluta en el 5'LTR del promotor viral mediante su unión a Sp1, y a su vez, recluta HDAC1 con la finalidad de silenciar el promotor. shRNAs inhibiendo la expresión de c-Myc reducen la ocupación de c-Myc y HDAC1 en el promotor del HIV, aumentando la expresión del LTR (Jiang et al. 2007). Sp1 unido a sus 3 lugares de unión en el LTR del HIV está relacionado con la represión mediada por HDAC1 y 2. En células de la microglia, el reclutamiento de HDACs mediado por Sp1 necesita de la ayuda de un cofactor llamado CTIP2 (*COUP-TF interacting protein 2*), el cual se asocia a HDACs, a la histona metiltransferasa Suv39H1 y a la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9). Al disminuir la expresión de CTIP2, el reclutamiento de HDACs se ve disminuido, llevando así a un aumento en la acetilación del promotor viral con su consecuente activación (Marban et al. 2007).

La metilación de las islas CpG del promotor del HIV también parecen ser importantes para el mantenimiento de la latencia viral. La metilación del ADN probablemente inhibe la expresión del promotor viral impidiendo la unión de factores de transcripción al 5'LTR, tales como NFκB o Sp1 (Bednarik et al. 1991). Aun así, la metilación del ADN relacionada con la latencia viral es un tema controvertido, ya que también se ha visto que la metilación en islas CpG no se correlaciona con el silenciamiento de la

transcripción del HIV (Pion et al. 2003). Recientemente varios grupos han visto la relación entre la metilación del ADN y el estado de latencia. Se observó que dos islas CpG en el 5'LTR estaban hipermetiladas en células latentes de linfocitos. MBD2 (*methyl-binding domain protein 2*) y HDAC2 se reclutan al promotor latente mediante la segunda isla CpG. MBD2 sería la responsable de reclutar el complejo represor NuRD, complejo al cual pertenece la HDAC2 (Kauder et al. 2009). La metilación en las islas CpG en el 5'LTR, juntamente con otras modificaciones epigenéticas relacionadas con represión como la disminución de la dimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), la disminución de la acetilación de la histona 3 o altos niveles de trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9) contribuyen al silenciamiento del LTR viral, impidiendo su reactivación (Blazkova et al. 2009).

2.2.4. La proteína Tat

Una de las proteínas que se expresan primero en el genoma viral es la proteína transactivadora Tat. La transcripción del virus del HIV se puede dividir en dos etapas:

- Etapa tat-independiente o temprana. Durante esta fase de ausencia de Tat, la transcripción se inicia normalmente pero la elongación de la ARN polimerasa II es muy ineficiente. Esto se debe a que la ARN polimerasa II está siendo inhibida por el complejo N-TEF (*negative elongation factor*) el cual está formado por dos subunidades llamadas NELF (*negative elongation factor*) y DSIF (*DRB-sensitive inducing factor*). A la inhibición de la elongación mediada por estas proteínas se suma también el hecho que hay un ambiente cromatínico represivo (Figura 16A). Aunque la gran mayoría de transcritos que se producen en ausencia de Tat son transcritos cortos de aproximadamente 60 nucleótidos que se acumulan en el citoplasma (Kao et al. 1987), una pequeña cantidad de transcritos salvajes enteros se puede llegar a producir, codificando la proteína Tat y mediando la transcripción viral.

- Etapa tat-dependiente o tardía. Esta fase empieza cuando se produce suficiente acumulación de la proteína Tat, la cual se une a una estructura de ARN de forma curva que se está formando en el extremo 5' de los transcritos nacientes llamada TAR. La unión de Tat a TAR promueve el reclutamiento de pTEFb (*positive transcription elongation factor b*), el cual está formado por la quinasa CDK9 y la Ciclina T1. Esta unión de pTEFb y Tat se ve favorecida gracias a la acetilación de la lisina 28 de Tat,

acetilación mediada por la acetiltransferasa PCAF (Kiernan et al. 1999). La proteína CDK9 es la responsable de la fosforilación de la cola CTD (dominio carboxi-terminal) de la ARN polimerasa II, aumentando así la correcta transcripción del transcrito viral, promoviendo una elongación eficiente (Figura 16B). pTEFb también es capaz de fosforilar el complejo N-TEF, liberándose así el bloqueo de la elongación que mediaba dicho complejo (Fujinaga et al. 2004). La actividad de pTEFb está constitutivamente restringida por su asociación con un ARN celular llamado 7SK, al cual se une HEXIM1, una proteína con un dominio de inhibición de pTEFb situado en su región C-terminal (Yik et al. 2003). En el momento en que la célula se activa se promueve la liberación y activación de pTEFb, ayudando al inicio de la expresión del promotor viral.

La proteína Tat también se puede acetilar en su lisina 50 mediante las acetiltransferasas p300 y Gcn5 (Kaehlcke et al. 2003). Esta acetilación es la responsable de disociar la proteína Tat de TAR y del reclutamiento de Tat al complejo de la ARN polimerasa que está empezando a elongar. Tat es capaz de reclutar la proteína PCAF al complejo que viaja con la ARN polimerasa y así ayudar al remodelamiento y apertura de la cromatina tras la activación (Bres et al. 2002) (Figura 16B). Tat también es capaz de reclutar el complejo remodelador ATP-dependiente SWI/SNF al complejo que se forma cuando la ARN polimerasa está elongando (Figura 16B). Esta unión a Tat se produce mediante las subunidades Brg1 y Ini1, iniciándose así el remodelamiento del nucleosoma 1 (Mahmoudi et al. 2006). Tat no solo puede ser acetilada, sino también metilada. La metiltransferasa SETDB1, la cual metila Tat en sus residuos de lisina 50 y 51, es capaz de reclutar otras metiltransferasas e histonas deacetilasas para promover silenciamiento génico (Li et al. 2006). Al final del proceso de elongación durante la transcripción viral, Tat es deacetilada mediante la deacetilasa Sirtuin 1 (SIRT1), hecho que permite su disociación de la ARN polimerasa II. Tat deacetilada es reciclada y puede iniciar un nuevo ciclo de activación de la transcripción (Pagans et al. 2005) (Figura 16C). Todo esto concluye que Tat promueve la elongación de la transcripción mediando la fosforilación de la ARN polimerasa II y estimulando el remodelamiento de la cromatina.

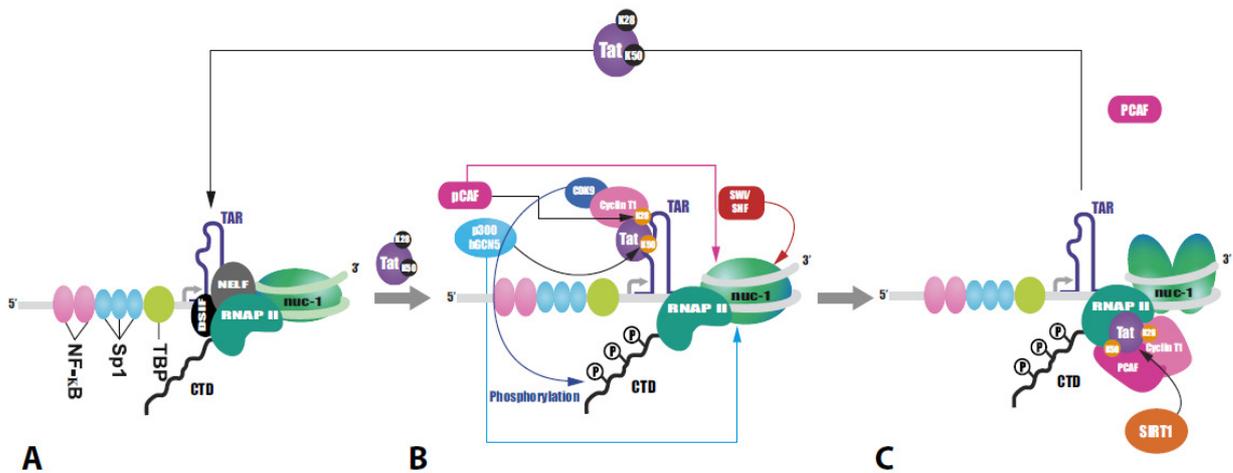


Figura 16. Representación esquemática de las etapas del HIV desde su fase temprana hasta su fase tardía dependiente de Tat. Al final del ciclo de transcripción del HIV, Tat es reutilizada para empezar un nuevo ciclo de transcripción. Figura extraída de Colin et al. 2009.

2.2.5. MicroARNs

Los microARNs o miARNs son ARNs no codificantes de cadena sencilla, que miden entre 19 y 25 nucleótidos y su función es la de reguladores génicos y la de defender la célula huésped de la infección de virus de ADN y ARN. Los miARNs primarios producidos en el núcleo son digeridos por la ARNasa de tipo III Drosha, formándose así los miARNs precursores o pre-miARN. Estos pre-miARNs salen del núcleo y en el citoplasma son digeridos por la ARNasa de tipo III Dicer, formándose los miARNs maduros. Los productos maduros son capaces de unirse a la región 3' no traducida (3'UTR) de los ARNm, uniéndose de manera parcial a ellos debido a su secuencia complementaria parcial. El resultado de esta unión es la inhibición de la traducción y la degradación del ARNm (revisado en Kim et al. 2007) (Figura 17).

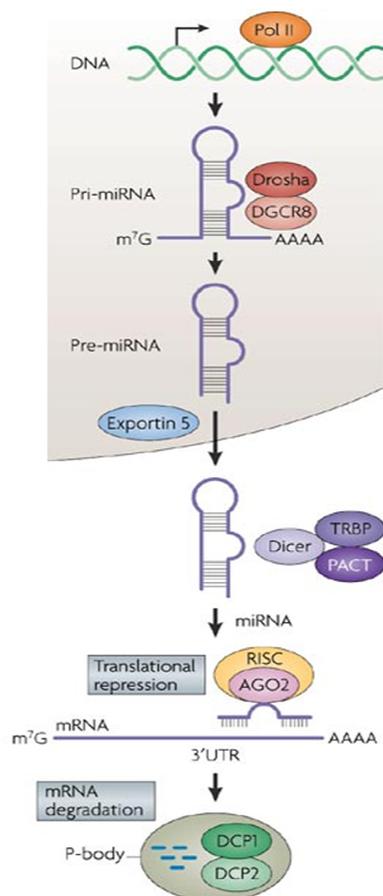


Figura 17. Proceso de formación de miARNs maduros, los cuales reprimen la traducción y se encargan de la degradación del ARNm. Imagen extraída de Kim et al. 2007.

Los miARNs constituyen un nivel más de complejidad en la interacción huésped-virus y son otro nivel de regulación del silenciamiento durante el estado de latencia viral. Huang et al en 2007 demostraron que una serie miARNs celulares eran capaces de inhibir la producción de HIV en células T CD4+ en reposo, inhibiendo la traducción de varias proteínas virales, tales como Tat o Rev, pero no Nef. Recientemente se ha descrito el miARN hsa-miR29 a como un regulador negativo de la expresión de Nef, la cual cosa interfiere con el ciclo de replicación del HIV (Ahluwalia et al 2008). El virus del HIV puede a su vez suprimir el silenciamiento mediado por los miARNs durante la infección de las células debido a que es capaz de reducir la expresión de algunos miARNs, tales como el miR-17-5p y miR-20a, aumentando la expresión de PCAF (proteína que normalmente está silenciada por el miR-17-5p) y promoviendo la expresión viral (Triboulet et al. 2007). Los transcritos de HIV también pueden ser procesados en microARNs, y más concretamente las regiones de TAR (Klase et al. 2007) y nef (Omoto et al. 2005). En ambos casos, los microARNs formados

contribuyen en parte al establecimiento de la latencia regulando negativamente la expresión del virus del HIV.

2.3 MODELOS *IN VITRO* UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LA LATENCIA

Desde el descubrimiento de las células latentemente infectadas en los pacientes con SIDA y su papel en impedir la completa erradicación de la enfermedad se vio la necesidad de desarrollar modelos celulares y en animales que pudieran ayudar al estudio de la latencia.

Unos de los primeros modelos celulares de latencia que aparecieron fueron las células promonocíticas U1 y las células ACH2, derivadas de linfocitos T. Estas células fueron útiles para estudiar unos conocimientos tempranos sobre la latencia del virus del HIV, a pesar que posteriormente se descubrió que una mutación en Tat en las células U1 (Emiliani et al. 1998) y una mutación en TAR en las células ACH2 (Emiliani et al. 1996) eran las responsables del fenotipo latente en estos modelos.

Otro modelo celular derivado de linfocitos T es el JΔK. Estas células se aislaron de una infección crónica en Jurkat que se había realizado con un HIV con una delección de los lugares de unión de NFκB en el LTR viral. Estas células se caracterizaban por no expresar los genes del HIV a no ser que fueran tratadas con citoquinas o mitógenos, pero no con TNFα, la cual cosa indicó el papel importante de la vía de NFκB mediada por la inducción de TNFα (Antoni et al. 1994).

Posteriormente se diseñó una línea estable conteniendo la variante HIV-rtTA, en la cual la secuencia Tat/TAR fue reemplazada por el sistema inducible Tet-ON (Verhoef et al. 2001). El provirus HIV-rtTA es completamente dependiente de la adición de doxiciclina en el medio para la activación viral. Contiene los lugares de unión originales para los factores de transcripción en el 5'LTR y las células se obtienen sin tener que hacer ningún paso de selección, impidiendo tener que activar las vías de señalización del HIV para obtener las células infectadas latentemente.

Una línea celular de Jurkat infectada latentemente con un vector conteniendo Tat/TAR y GFP bajo el promotor del HIV se desarrolló por Jordan et al. en el año 2003. En este mismo estudio también se describieron unas células con el genoma entero del virus pero

con la secuencia de GFP en lugar de *Nef* (Bieniasz and Cullen et al. 2000) y con una mutación en el gen *env*. A estos modelos celulares se los llamó J-lat y permitían un cálculo rápido de la actividad transcripcional del HIV mediante la detección de la fluorescencia de GFP.

La necesidad de hacer un modelo celular lo más parecido a la situación *in vivo* para poder estudiar la latencia de una manera más fisiológica llevó a generar modelos basados en células primarias T CD4+ y células primarias derivadas de macrófagos. En uno de estos modelos se partió de linfocitos T CD4+ de donantes sanos los cuales se pusieron en condiciones que los llevaban a convertirse en células de memoria. Estas células de memoria se infectaban con un virus del HIV defectivo en Env, partícula que se ponía en trans mediante un plásmido expresando Env (Bosque et al. 2009). Otro modelo *in vitro* de latencia fue desarrollado utilizando células primarias de linfocitos T CD4+. En estas células se expresó la proteína anti-apoptótica Bcl2 la cual aseguraba la supervivencia de las células de memoria y fueron infectadas con un vector con la secuencia del HIV. Este vector preservaba el LTR, *tat* y *rev* (éstas últimas proteínas son necesarias para la expresión viral de los genes) y las vías de señalización que permitían la reactivación viral desde el estado de la latencia, pero no los genes *gag*, *vif*, *vpr*, *vpu*, y *nef* debido a sus efectos citopáticos descritos previamente (Yang et al. 2009).

A nivel de modelos animales, se han utilizado dos tipos de modelos, uno en ratón y otro en primates. En ratón se desarrollaron los ratones llamados SCID (*severe combined immunodeficiency*)-hu (Thy/Liv) en los cuales células de memoria T CD4+ con un HIV latente se pueden generar en altas frecuencias durante la timopoyesis (Brooks et al. 2001). Se generaron co-transplantando timo fetal humano y tejido del hígado en ratones los cuales no tenían células T y B funcionales. Las células del hígado eran una fuente de células hematopoyéticas humanas y las células fetales tímicas creaban un microambiente que permitían la linfopoyesis de células T. En este modelo, los implantes de hígado y timo se infectan con el virus del HIV directamente en el injerto y vieron que algunas de las células quiescentes T CD4+ tenían genomas del HIV latentemente infectados que se podían activar mediante la estimulación del receptor de células T TCR (*T-cell receptor*) (Brooks et al. 2001).

La utilización de primates no humanos infectados con el virus SIV (*simian immunodeficiency virus*) han sido de mucha importancia para entender la patología del

HIV. Se describió la persistencia de células de memoria CD4+ muy similares a las que hay en humanos, la cual cosa era un paso adelante para el estudio de la latencia del HIV en primates (Shen et al. 2003). Tras el tratamiento con 4 drogas antirretrovirales en macacos infectados con SIV se observó una caída de la viremia en sangre (Dinso et al. 2009). Aún así, los modelos de SIV en primates tienen grandes desventajas, la primera de ellas por el alto costo de los macacos, por haber una gran demanda y por la necesidad de tener unas instalaciones adaptadas, y la segunda desventaja reside en que aunque el virus SIV es altamente parecido al virus humano, hay diferencias genéticas importantes las cuales podrían ser un impedimento a la hora de encontrar medicamentos que funcionaran en humanos.

2.4 LA LATENCIA VIRAL, ¿NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS?

Tras el tratamiento con la terapia antirretroviral HAART se observó que disminuía la viremia en sangre pero incluso tras años con una cantidad de virus por debajo de los límites de detección, la cantidad de células latentes (aproximadamente de 1 célula infectada cada millón de células T CD4+ en reposo y cuya $t_{1/2}$ es de 44 meses) apenas disminuía. Por esta razón, los compuestos ideales para erradicar esta enfermedad deberían constar de la terapia antirretroviral clásica y compuestos que fueran capaces de reactivar los virus en estado latente, pero sin causar una activación masiva de las células T (Figura 18).

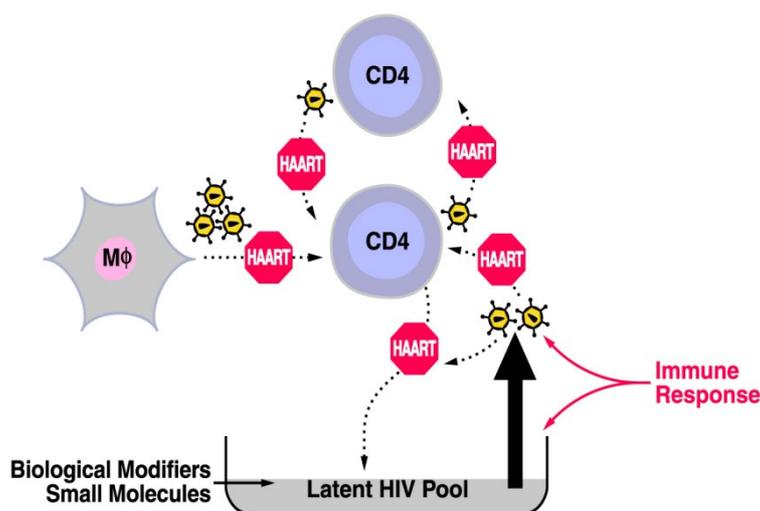


Figura 18. La terapia combinada formada por fármacos antirretrovirales clásicos HAART y fármacos que puedan reactivar los virus latentes podría ser de gran ayuda para disminuir la viremia en sangre, tanto de virus activos como los latentes.

La administración de interleuquina 2 (IL-2) juntamente con HAART ha mostrado una reducción en las células T CD4+ que contenían provirus del HIV. Aun así, en estos estudios se observó un aumento de nuevo de la viremia en plasma tras 2-3 semanas de parar el tratamiento, sugiriendo que solo una parte de las células infectadas latentemente habían podido ser eliminadas pero quedaba todavía parte del reservorio (Chun et al. 1999, Stellbrink et al. 2002). En un modelo de ratón se observó que la administración de interleuquina 7 (IL-7) era capaz de reactivar los virus latentes (Brooks et al. 2003). También se ha observado que se inducía la expresión de virus latentes en células en reposo CD4+ de pacientes tratados con HAART (Lehrman et al. 2004). En otros estudios se utilizaron anticuerpos OKT3, los cuales se unen y activan a los receptores de las células T, con el fin de activar las células en reposo. Se observó un aumento de la expresión del HIV, pero sin ningún efecto sobre los reservorios de infecciones latentes (Ellenhorn et al. 1990). El problema de este tipo de terapias que inducen las células T en reposo, infectadas y no infectadas, es que se disminuye una gran cantidad de la memoria inmunológica de los pacientes.

Los inhibidores de histona deacetilasas (HDACs) también se están considerando como terapia combinada a la terapia HAART. Una de las grandes ventajas de este sistema es que no posee toxicidad asociada a la activación masiva de las células T. Un problema en contra de este tratamiento es el efecto general sobre la transcripción que tienen los inhibidores de HDACs. El ácido valproico o VPA es un inhibidor de HDACs que era capaz de reactivar el promotor latente sin activar masivamente los linfocitos T (Ylisastigui et al. 2004). Otros estudios más recientes mostraron que el tratamiento con VPA de pacientes tratados con HAART no disminuía la población de células latentes de manera considerable (Siliciano et al. 2007, Sagot-Lerolle et al. 2008). Debido al hecho que VPA es un inhibidor de HDACs débil, otros inhibidores más potentes y selectivos se han utilizado como herramientas terapéuticas. SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) es un inhibidor selectivo de HDACs de clase 1. Es capaz de inducir la transcripción del HIV en modelos de latencia celulares (Archin et al. 2009) y en células T CD4+ en reposo de pacientes tratados con HAART (Contreras et al. 2009), y no parece tener efecto sobre la activación de los receptores de membrana de las células T. Este inhibidor selectivo parece ser un buen candidato, aun así, se necesitan más estudios.

La prostratrina (un éster de forbol) y el DPP (12-deoxiforbol 12-fenilacetato) han sido descritos como activadores de la vía de la proteína quinasa C o PKC. La prostratrina activa la expresión del HIV latente en células linfoides o mieloides (Korin et al. 2002, Kulkosky et al. 2001). La combinación de ácido valproico y prostratrina o SAHA y prostratrina han demostrado una mayor eficiencia al reactivar el HIV en modelos celulares y en células de pacientes largamente tratados con HAART (Reuse et al. 2009). Aun así, son necesarios más estudios sobre prostratrina y DPP sobre su toxicidad y seguridad.

3 Factores implicados en la elongación de la ARN polimerasa II y en la organización de la cromatina

El ciclo de la transcripción está formado por las fases de preiniciación, iniciación, escape del promotor, elongación y terminación. La transcripción empieza con la formación del complejo de preiniciación (PIC) en el promotor. El complejo PIC está formado por la ARN polimerasa II, formada por doce subunidades conocidas como RPB1-RBP12 (Cramer et al. 2002), así como por los factores generales de la transcripción (GTFs) TFIID, TFIIB, TFIIE, y TFIIH. La función principal de estos factores es posicionar correctamente la ARN polimerasa II sobre el lugar donde debe darse el inicio de la transcripción. Durante la fase de iniciación de la transcripción es condición necesaria que se abra la doble cadena de ADN formándose así una burbuja en un proceso dependiente de ATP la cual permite la formación de un complejo abierto entre la polimerasa y el ADN en la región alrededor del +1 de la transcripción. En este proceso participan los factores TFIIE y TFIIH (Holstege et al. 1996, Kim et al. 2000).

Durante la iniciación se empiezan a añadir nucleótidos a la secuencia naciente de ARN. Entre las etapas de iniciación y elongación se encuentra un proceso llamado escape del promotor. Los primeros estadios de la transcripción se caracterizan por una inestabilidad del complejo de transcripción, en los que se forman pequeñas secuencias de ARN de unos pocos nucleótidos. Una vez que el ARN sintetizado llega a tener una longitud de unos 23 nucleótidos, la ARN polimerasa se estabiliza y empieza a elongar. Los GTFs TFIIH y TFIIF se han descrito como factores que suprimen la frecuencia de esta transcripción abortiva durante la fase de escape del promotor (Dvir et al. 1997, Yan et al. 1999). Se ha sugerido que la inestabilidad de la polimerasa en el proceso de escape

del promotor se debe en parte a la presencia del factor TFIIB, el cual una vez no está presente ayuda a la escapada del promotor y al inicio de la elongación (Bushnell et al. 2004). La cola CTD de la ARN polimerasa II está formada por un heptapéptido de secuencia Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7, repetido 52 veces en la ARN polimerasa II humana (Chapman et al. 2008). Es conocido que durante esta fase de escapada del promotor, dicha cola CTD de la polimerasa está fosforilada en su residuo de serina 5, gracias a la acción de la CDK7/TFIIH.

Una vez la estructura de la ARN polimerasa II es estable, se van añadiendo nucleótidos a la cadena de ARN que se está transcribiendo. Una serie de proteínas forman el complejo TEC (*transcription elongation complex*), las cuales pueden afectar la elongación de la polimerasa de manera positiva o negativa. Estos factores son TFIIIS, pTEFb, FCP1, DSIF, NELF, Elongin, ELL, Elongator, FACT y en el caso del HIV, también la proteína Tat (revisado en Sims et al. 2010, Gnatt et al. 2002). Durante esta fase, la quinasa CDK9 fosforila el residuo de serina 2 de la cola CTD de la polimerasa, por tanto, durante la elongación la polimerasa tiene fosforilados los residuos 2 y 5 de serina. Es conocido que la elongación de la ARN polimerasa II se produce de manera discontinua, hecho debido a la existencia de los procesos de pausa y de arresto de la polimerasa. La pausa de la polimerasa ocurre cuando la polimerasa detiene la adición de nucleótidos al transcrito naciente durante un tiempo antes de seguir la elongación. Se cree que este proceso es debido a un ligero mal alineamiento de la polimerasa y de la región 3'-OH del transcrito naciente (Figura 19). El arresto de la transcripción se define como un paro irreversible en la síntesis del ARN, de modo que la polimerasa no puede volver a empezar la elongación sin factores accesorios. Esto es debido a que se produce un mal alineamiento del centro catalítico de la polimerasa y del 3'-OH del transcrito naciente (Figura 19). La ARN polimerasa arrestada puede salir de esta situación mediante un corte endonucleolítico en el ARN naciente y tras este corte, la polimerasa retrocede algunos nucleótidos en el ADN, se reposiciona correctamente y continúa la síntesis del ARNm (revisado en Sims et al. 2010).

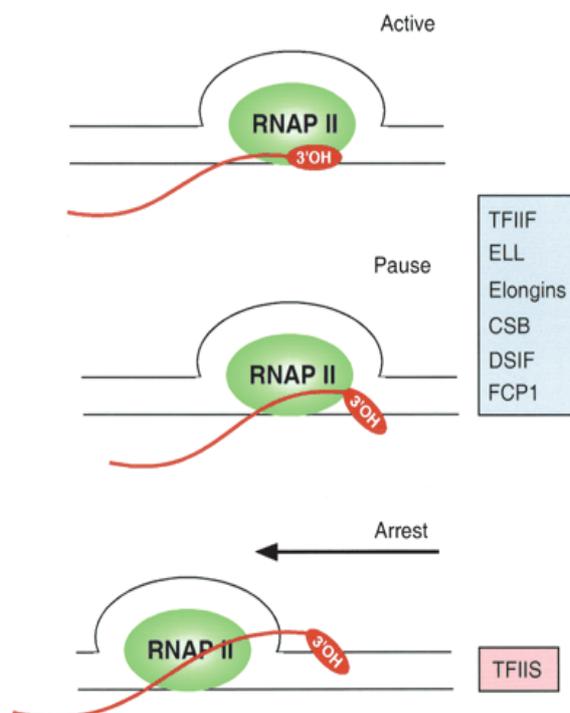


Figura 19. Representación del pauso y del arresto de la polimerasa, y los factores implicados en ambos procesos. Figura extraída de Sims et al. 2010.

Durante la etapa de terminación, la ARN polimerasa II encuentra una secuencia de parada en la secuencia del ADN. Es entonces cuando el ARNm se corta, se añade una cola de poliA y se transporta al citoplasma, donde será traducido. El factor que se encarga del corte del transcrito y de la poliadenilación, llamado CPSF, se recluta mediante el factor TFIID durante la formación del complejo PIC (Dantonel et al. 1997). Este hecho demuestra que la iniciación y la terminación del transcrito son procesos estrechamente comunicados. De igual modo, algunos factores relacionados con el transporte del ARNm al citoplasma se encuentran en el complejo TEC. Durante esta fase de terminación, la CTD de la ARN polimerasa II está fosforilada en su residuo de serina 2. La fosfatasa FCP1 es capaz de defosforilar la serina 2 y serina 5 de la cola CTD (Sims et al. 2004) permitiendo el reciclado de la polimerasa para promover un nuevo ciclo de transcripción (Mandal et al. 2002).

A continuación se detallan algunos de los factores y complejos implicados en la elongación de la polimerasa y en la organización de la cromatina que se han estudiado en este trabajo.

3.1 SPT6

Las chaperonas de histonas son proteínas que facilitan el ensamblaje y desensamblaje de las histonas con el ADN con el fin de formar o deshacer los nucleosomas. Estos procesos de ensamblaje y desensamblaje de la cromatina han sido descritos durante la replicación, reparación del ADN, transcripción y otros eventos que necesitan tener acceso al ADN.

SPT6 (*Supresor of Ty 6*) es una proteína de 199KDa cuya región N-terminal contiene abundantes residuos ácidos y su región C-terminal contiene un dominio SH2, un dominio YqgFc, varios dominios HhH en tándem y un dominio S1 (Figura 20). Se ha descrito que las regiones YqgFc, HhH y S1 tienen actividad nucleasa, de unión a ADN y de unión a ARN, respectivamente (Dengl et al. 2009).



Figura 20. Estructura de los dominios de SPT6. Figura extraída de Dengl et al. 2009

SPT6 fue identificada en el mismo cribado genético que SPT4, SPT5 y SPT16 (Winston et al. 1984). Bortvin y Winston (1996) demostraron que SPT6 promovía el ensamblaje de los nucleosomas *in vitro* e interactuaba con histonas, preferencialmente la histona H3. Además, mutaciones de esta proteína mostraban alteraciones en la estructura de la cromatina *in vivo*. Se mostró que SPT6 colocalizaba con la ARN polimerasa II en regiones transcripcionalmente activas (Hartzog et al. 1998). Mutaciones en el gen de SPT6 en levadura promovían la iniciación de la transcripción en promotores crípticos, tales como FLO8. Estos promotores están silenciados en regiones activas debido a la transcripción de un promotor que se localiza corriente arriba y que es capaz de silenciar la transcripción del promotor críptico (Kaplan et al. 2003). Mediante experimentos con nucleasa micrococcal (MNasa) mostraron que el mutante de SPT6 era hipersensible a MNasa, y esta sensibilidad se correlacionaba con una disminución de la histona H4 en los nucleosomas de FLO8 (Kaplan et al. 2003).

Utilizando un modelo de HIV en levadura se observó que un mutante de SPT6 producía un aumento de los niveles de transcrito del HIV, la cual cosa sugería que en

estado salvaje, este factor estaba funcionando como un represor de la transcripción basal del promotor viral (Vanti y Gallastegui et al. 2009).

En células de levadura se ha mostrado que SPN1, un gen esencial en levadura y altamente conservado durante la evolución, parece tener un papel regulador de la transcripción. SPN1 regula negativamente la actividad de la polimerasa inhibiendo el reclutamiento de SWI/SNF al promotor CYC1. Esta inhibición se pierde tras la interacción de SPN1 con SPT6, fenómeno tras el cual se recluta SWI/SNF al promotor (Zhang et al. 2007).

La proteína SPT6 interacciona físicamente con FACT y la subunidad SPT5 de DSIF, tanto *in vitro* como *in vivo* (revisado en Hartzog et al. 2002). El dominio SH2 de la proteína SPT6 interacciona directamente con la ARN polimerasa II fosforilada en la serina 2, la cual está elongando (Yoh et al. 2007). SPT6 a su vez se une a IWS1 y se recluta REF1/Aly, favoreciéndose así el exporte del ARN del núcleo.

SPT6 tiene un papel importante en el control de la calidad del ARNm. Estudios en *Drosophila melanogaster* mostraron que la proteína SPT6 colocaliza con el exosoma, un complejo con actividad exoribonucleasa que está implicado en el procesamiento de la estructura del ARN y la degradación del pre-ARNm que no se ha procesado correctamente. Este hecho muestra que la maquinaria de control del ARNm podría viajar juntamente con los factores de elongación durante la transcripción (Andrulis et al. 2002).

En resumen, SPT6 es un factor de reensamblaje de la cromatina co-transcripcional que regula la estructura de la cromatina mediante su interacción con la histona H3 y su función de chaperona de histonas (Bortvin et al. 1996). Esta proteína viaja durante la elongación de la transcripción mediante su interacción con la polimerasa (Yoh et al. 2007, Kaplan et al. 2000). Facilita el mantenimiento de la estructura de la cromatina en los genes que se están transcribiendo, silenciando así promotores crípticos, los cuales se podrían expresar en situaciones de trastorno de la cromatina tales como mutaciones de la proteína SPT6 (Kaplan et al. 2003).

3.2 CHD1

CHD1 (*Chromo-ATPase/Helicase-DNA-binding Domain 1*) es una proteína de 220KDa. Se caracteriza por tener dos cromodominios cerca de la región N-terminal, un dominio helicasa/ATPasa y un dominio de unión al ADN en la región C-terminal (Figura 21) (Simic et al. 2003).

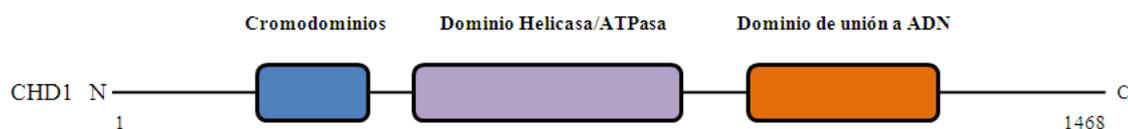


Figura 21. Estructura de los dominios presentes en la proteína CHD1. Figura modificada de Simic et al. 2003

CHD1 es una ATPasa que remodela los nucleosomas *in vitro* y se le han descrito funciones durante la elongación y la terminación de la transcripción (Tran et al. 2000). CHD1 se localiza con un patrón muy similar que la ARN polimerasa II que está elongando, sugiriendo un papel importante en elongación (Stokes et al. 1996). En levadura se ha observado que CHD1 es capaz de interactuar con RTF1, un miembro del complejo PAF1 que se asocia con la ARN polimerasa II y regula la elongación, así como también interactúa con Spt5 y spt16-Pob3 (FACT) los cuales se unen a la cromatina en la región codificante de genes transcripcionalmente activos (Simic et al. 2003). También se ha descrito su interacción con la histona metiltransferasa Set2 y con la familia ISWI, ambas implicados en elongación (Tsukiyama et al. 1999, Krogan et al. 2003). CHD1 es capaz de unirse también a factores que forman parte del complejo SWI/SNF, regulando la elongación transcripcional (Tran et al. 2000). El hecho que CHD1 interactúe con el complejo FACT sugiere la implicación de este factor durante la elongación y el ensamblaje de los nucleosomas (Simic et al. 2003).

A parte de su función en elongación, CHD1 se ha relacionado con la terminación de la transcripción y el remodelamiento del final 3' de genes en levadura (Alen et al. 2002).

La delección de CHD1 en levadura se asocia con una gran inhibición del ensamblaje de la cromatina *in vitro*. Este efecto era comparable al efecto visto en la delección de la chaperona ASF1 (Robinson et al. 2003). Estudios en *Drosophila melanogaster* en los

cuales utilizaron proteínas recombinantes de CHD1, la chaperona NAP1, histonas y un plásmido de ADN circular mostraron la capacidad de CHD1 de catalizar la formación de nucleosomas *in vitro* tras la adición de ATP (Lusser et al. 2005).

Deleciones de CHD1 desestabilizan el posicionamiento de la cromatina en el gen ADH2 (Xella et al. 2006). En un triple mutante CHD1, ISWI y ISW2 se observa un efecto máximo en el que la estructura de la cromatina en la región codificante y en la región de terminación está completamente alterada. Estos tres factores están relacionados con el establecimiento y el mantenimiento del posicionamiento de los nucleosomas en el genoma de levadura (Xella et al. 2006). Otros estudios han demostrado que CHD1 podría estar relacionada con el reensamblaje de los nucleosomas en la ola de la polimerasa que está elongando (Robinson et al. 2003).

3.3 ASF1A

En humanos existen dos isoformas de la proteína ASF1 (*AntiSilencing Function 1*), ASF1A y ASF1B, cuyo N-terminal está altamente conservado pero difieren mayormente en su extremo C-terminal (Tang et al. 2006).

La proteína ASF1A es una chaperona de histonas H3/H4 altamente conservada entre especies (Munakata et al. 2000, Tyler et al. 1999). Ha sido descrita su implicación en el ensamblaje y desensamblaje de los nucleosomas en varias vías fisiológicas, tales como el silenciamiento génico, la transcripción génica, la replicación y la reparación del ADN dañado.

ASF1A interacciona con la histona H3 mediante su región C-terminal (Munakata et al. 2000), las proteínas HIR y la segunda subunidad de CAF-1. En levadura, se ha demostrado la unión de ASF1 y HIR1 (homólogo de HIRA en levadura) en ensayos de doble híbrido (Sutton et al. 2001). Estudios genéticos en levadura han mostrado que ASF1 funciona de manera sinérgica con CAF-1 para ensamblar los nucleosomas durante la reparación del ADN *in vitro* (Mello et al. 2002). Dobles mutantes para ASF1 y CAF-1 mostraron una disminución en el silenciamiento génico mediado por la formación de heterocromatina (Tyler et al. 1999).

ASF1A ha sido la responsable de mediar el desensamblaje de la cromatina en los genes PHO5 y PHO8 durante la activación transcripcional (Adkins et al. 2004). Este desensamblaje es necesario para la inducción de estos genes, posiblemente porque se facilita el acceso a la maquinaria de transcripción (Figura 22). Cristales de ASF1A unidos a un heterodímero de histonas H3-H4 mostraron que para que ASF1A pudiera desensamblar las histonas H3 y H4 del centro del nucleosoma, el ADN necesitaba estar parcialmente relajado y H2A/H2B desensambladas (English et al. 2006).

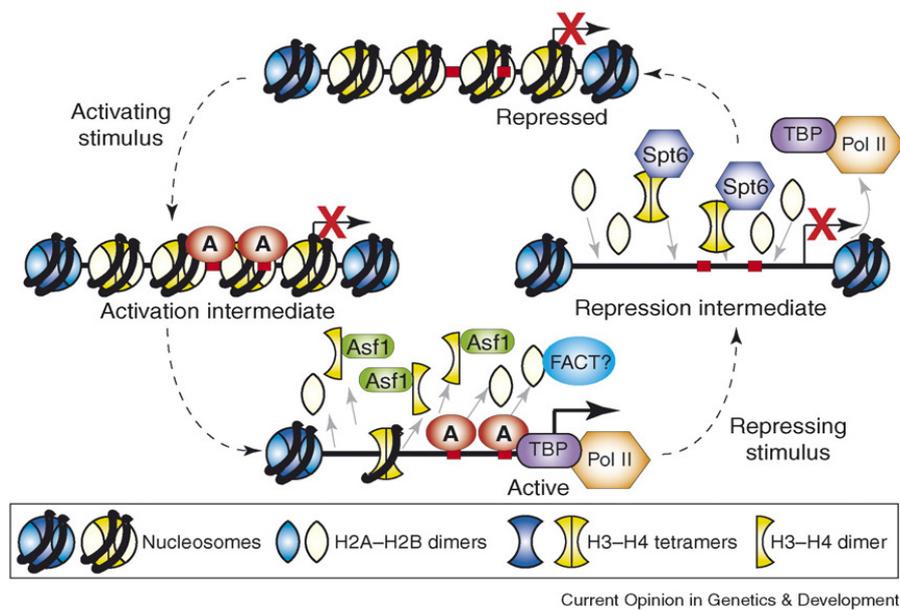


Figura 22. Implicación de la proteína ASF1A en el desensamblaje de los dímeros H3-H4, hecho que permite una transcripción activa de los genes. Figura extraída de Williams et al. 2007.

3.4 HIRA

HIRA es una proteína de 89KDa que está compuesta por un dominio WD40 en su extremo N-terminal, un dominio B en el centro de su secuencia y un dominio C en la región C-terminal (Figura 23) (Eitoku et al. 2008).

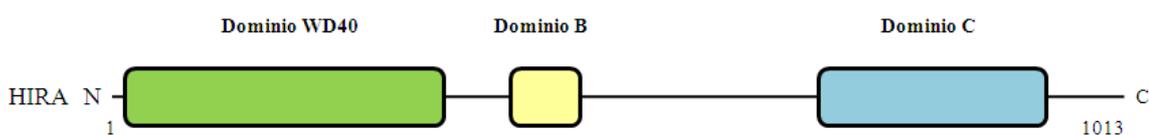


Figura 23. Estructura de los dominio presentes en la proteína HIRA. Figura modificada de Eitoku et al. 2008

Se han descrito dos funciones principales de la proteína HIRA. La primera de ellas está relacionada con la deposición de la histona H3.3 en los nucleosomas, la cual marca genes activamente transcritos (Ahmad et al. 2002). Además se demostraron también otras funciones activadoras de esta proteína, tales como su relación con elongación. Interacciones de HIRA con factores de elongación como SPT4, SPT5, SPT6 y SPT16 sugieren una relación de HIRA con la transcripción de varios genes (Formosa et al. 2002).

La segunda función está relacionada con silenciamiento génico mediado por heterocromatina en levadura, moscas, plantas y humanos (Sharp et al. 2001, Kaufman et al. 1998, Sherwood et al. 1993). En levadura, HIR1 y HIR2 contribuyen a la formación de estructuras de cromatina pericéntricas, juntamente con la proteína CAF-1 (Sharp et al. 2002). La pérdida de la proteína HIRA en levaduras lleva a una formación de la estructura heterocromatínica pericéntrica defectuosa. En células embrionarias de ratón que no expresan HIRA las histonas se unen más débilmente que las células salvajes, sugiriendo una función de HIRA en la formación de nucleosomas densos y compactos (Meshorer et al. 2006). Esta proteína también es necesaria para el reclutamiento de HP1 a los pericentrómeros en células humanas (Zhang et al. 2007)

3.5 SUPT16H

La proteína SUPT16H o SPT16 (*Supressor of Ty 16*) forma parte del heterodímero FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*), juntamente con SSRP1 (*Structure Specific Recognition Protein-1*). Es una proteína de 120KDa que está formada por 4 dominios: un dominio ácido (SPT16-C) en la región C-terminal, un dominio SPT16-M en la región central de la secuencia, un dominio de dimerización o SPT16-D y un dominio en la región N-terminal con una alta homología con la secuencia una familia de aminopeptidasas (Figura 24) (VanDemark et al. 2008).

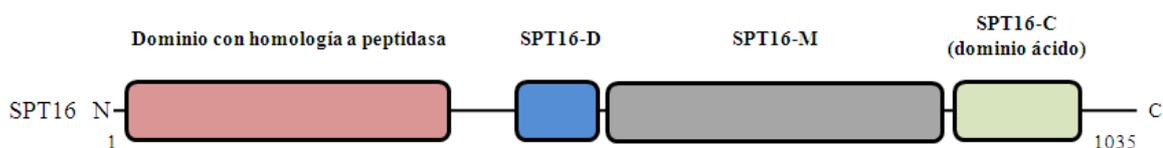


Figura 24. Estructura de los dominios de SPT16. Figura modificada de VanDemark et al. 2008

Experimentos hechos con nucleosomas unidos covalentemente entre ellos mostraron una abolición de la transcripción dependiente de FACT, sugiriendo que el nucleosoma debe ser desensamblado durante la transcripción (Orphanides et al. 1999, Belotserkovskaya et al (2003) mostraron que el complejo FACT facilita la elongación de la polimerasa desensamblando los dímeros de histonas H2A/H2B durante el proceso. También demostraron que FACT era capaz de ayudar a reensamblar los nucleosomas de nuevo tras el paso de la polimerasa, mostrando así que SPT16 tiene función chaperona. Mutaciones en SPT16 dan como resultado el inicio de la transcripción en promotores críticos en regiones codificantes de genes de levadura, mostrando de esta manera que SPT16 es necesaria para el mantenimiento de la estructura de la cromatina *in vivo* (Kaplan et al. 2003).

SPT16 interacciona con los factores TFIIS, DSIF, SPT6, CHD1 y PAF (Orphanides et al. 1999, Formosa et al. 2002, Squazzo et al. 2002). Varios estudios han sugerido la implicación del factor remodelador de la cromatina CHD1 en la localización de FACT. FACT se asocia físicamente con CHD1, y se han visto ambos complejos localizados en la región codificante de genes (Simic et al. 2003). La función de CHD1 de transferir histonas en el ADN puede estar funcionando juntamente con FACT y SPT6 en el mantenimiento de la estructura de la cromatina. La proteína PAF es capaz de ubiquitinar la histona H2B (Pavri et al. 2006), y esta modificación facilita la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3). En células humanas, la proteína CHD1 es capaz de reconocer la H3K4me3 (Sims et al. 2005), modificación que se encuentra en las regiones 5' de los genes activos y en picos cercanos al inicio de la transcripción de genes en células de mamífero (Scheider et al. 2004). FACT se asocia a CHD1 unida a H3K4me3 en genes activos, situando a FACT en la correcta posición para el inicio de su función (Figura 25) (Sims et al. 2007). La pérdida de H3K4me3 *in vivo* mediante siRNAs reduce el reclutamiento de FACT en genes activos (Adelman et al. 2006). Aunque CHD1 y H3K4me3 puede que no sea el único mecanismo mediante el cual FACT es reclutado durante la activación transcripcional, parece que este mecanismo contribuye en parte a este reclutamiento.

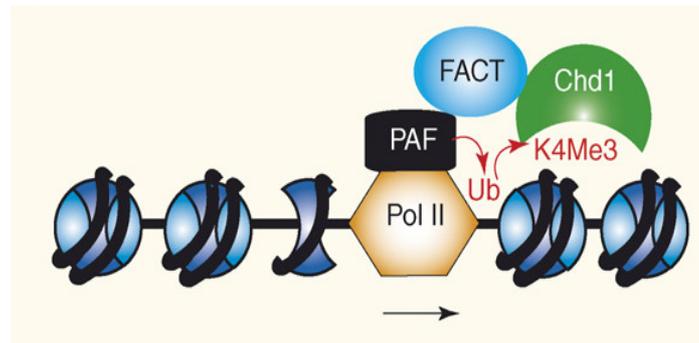


Figura 25. Representación de la unión de FACT durante la activación transcripcional. PAF ubiquitina la histona H2B, y esto lleva a la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. CHD1 se une a H3K4me3 y FACT se une a CHD1. Figura extraída de Williams et al. 2007.

En resumen, SPT16 forma parte del complejo FACT, el cual actúa ejerciendo su efecto en el desensamblaje de los nucleosomas, removiendo un dímero de H2A/H2B y facilitando el reensamblaje de los nucleosomas tras la ola de transcripción de la ARN polimerasa II. SPT6 juega también un papel importante en este proceso cooperando con FACT para mantener la estructura de la cromatina durante la transcripción. Su actividad chaperona ayudaría al reensamblaje de los nucleosomas tras la ola de transcripción de la polimerasa (Figura 26).

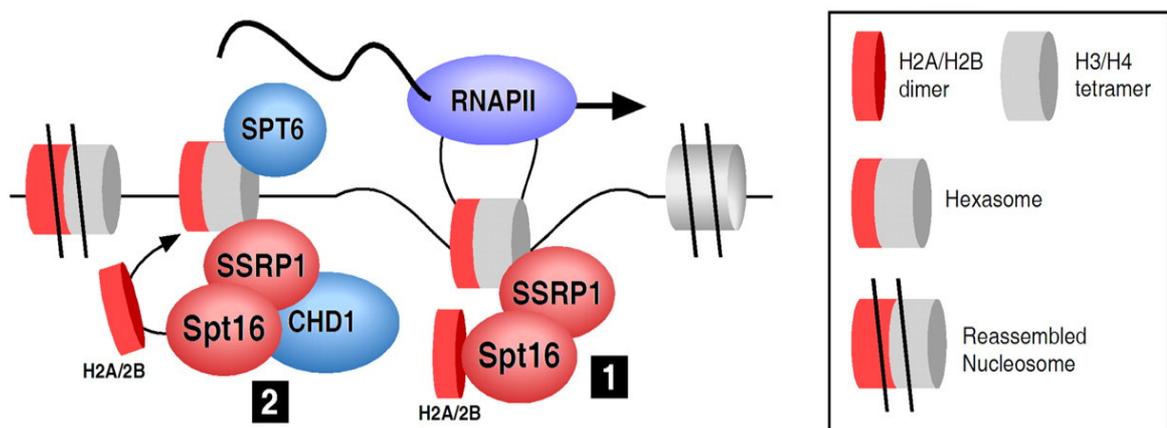


Figura 26. Ensamblaje de la cromatina durante la transcripción. Las proteínas SPT6 y FACT funcionarían de manera cooperativa durante la ola de transcripción y están asociadas a la polimerasa. FACT desensamblaría las histonas H2A/H2B en regiones corriente debajo de la polimerasa facilitando la transcripción. En las regiones que ya han sido transcritas, FACT reensambla los heterodímeros de H2A/H2B mientras SPT6 es necesaria para el reensamblaje de los tetrámeros de H3/H4. Figura extraída de Reinberg et al. 2007.

3.6 BRG1

BRG1 (*Brahma-Related Gene-1*) es una proteína de 220KDa de peso y que está dividida en varios dominios. En el extremo N-terminal se encuentran los dominios QLQ (encargado de varias interacciones con proteínas), HSA (unión a ADN) y BRK (dominio asociado a helicasas y factores de transcripción). El extremo central de la secuencia de BRG1 tiene función ATPasa y está formado por el dominio DEXHc (región de unión a ATP) y HELICc (dominio presente en helicasas). Por último, el extremo C-terminal tiene un pequeño dominio de unión a ADN llamado AT-hook (Figura 27) (Trotter et al. 2008)

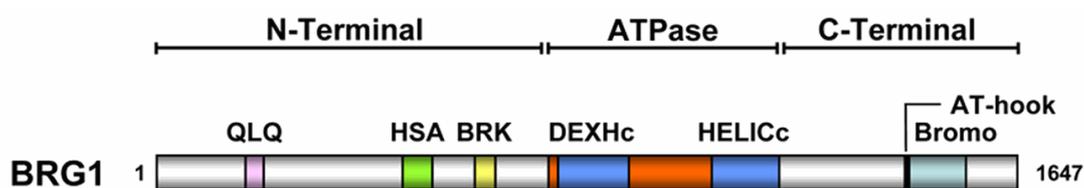


Figura 27. Estructura de los dominios de la proteína BRG1. Figura extraída de Trotter et al. 2008

BRG1 es el centro catalítico con actividad ATPasa del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Este complejo es capaz de abrir la cromatina haciéndola más accesible a factores de transcripción (Peterson et al. 1994). Las alteraciones en la arquitectura de la cromatina mediante complejos remodeladores ATP dependientes se consideran pasos importantes en la regulación transcripcional de muchos genes eucarióticos. Estos complejos que son capaces de modificar la cromatina utilizan energía derivada de la hidrólisis del ATP para alterar la estructura del nucleosoma (Johnson et al. 2005).

El bromodominio de BRG1 se ha relacionado con el reconocimiento de lisinas acetiladas de las histonas H3 y H4 (Shen et al. 2007). Estas modificaciones en los promotores pueden servir como una superficie de interacción para complejos como SWI/SNF.

SWI/SNF contiene una subunidad catalítica con función ATPasa, y en este complejo se pueden encontrar o bien BRG1 o bien BRM1, aparte de numerosos factores asociados a BRG1, llamados BAFs. La proteína BRG1 por sí sola tiene la capacidad de inducir el remodelamiento de los nucleosomas *in vitro*. Aun así, la adición de otros

factores que forman el complejo SWI/SNF promueve el remodelamiento de la cromatina de manera mucho más eficiente (Phelan et al. 1999). En humanos hay dos subfamilias del complejo SWI/SNF: BAF (asociado a BRG1 o BRM1) y PBAF. Estos dos grupos son similares en composición, compartiendo 8 subunidades (BRG1 o BRM1, BAF170, BAF155, BAF60a, BAF57, BAF53, actina, y BAF47). Sin embargo, BAF contiene BAF250 mientras que PBAF contiene BAF180 y BAF200 (revisado en Reisman et al. 2009) (Figura 28).

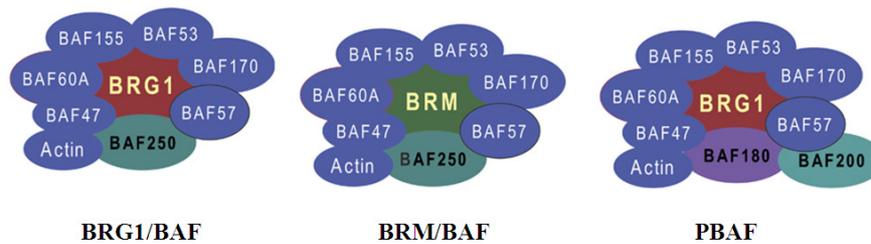


Figura 28. Representación de las subunidades que forman los complejos BAF (BRG1 o BRM1) y PBAF. Figura modificada de Reisman et al. 2009.

BRG1 es capaz de interactuar con múltiples proteínas, las cuales están relacionadas con un gran rango de procesos. Estos incluyen receptores nucleares, miembros de la maquinaria transcripcional, enzimas modificadoras de la cromatina, supresores tumorales así como proteínas críticas para la estabilidad genómica (Figura 29) (Trotter et al. 2007). Este hecho sugiere que BRG1 es clave para un gran número de funciones dentro de la célula.

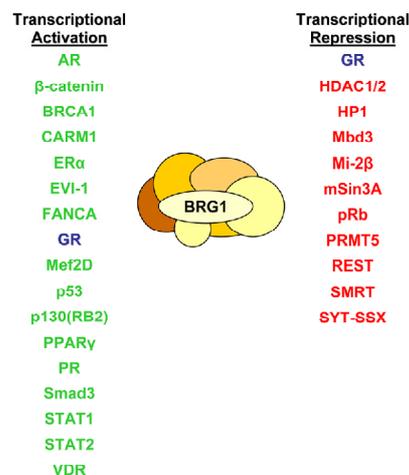


Figura 29. Factores activadores o represores que han sido descritos como proteínas que interactúan con Brg1. Figura extraída de Trotter et al. 2007.

Dentro del contexto del HIV, la proteína transactivadora Tat es capaz de reclutar BRG1 e INI1 al promotor viral tras la estimulación de las células T. La acetiltransferasa p300 sinergiza con INI-1 y BRG1 para activar el promotor del HIV (Mahmoudi et al. 2006, Agbottah et al. 2006)

3.7 TFIIS

El factor de elongación TFIIS es una proteína de 34KDa de peso que está formada por 4 dominios: el dominio I (lugar de unión de varios factores de transcripción), dominio II (necesario para la unión a la ARN polimerasa II), dominio L y dominio III (capaz de cortar el ARNm) (Figura 30) (Kim et al. 2007)

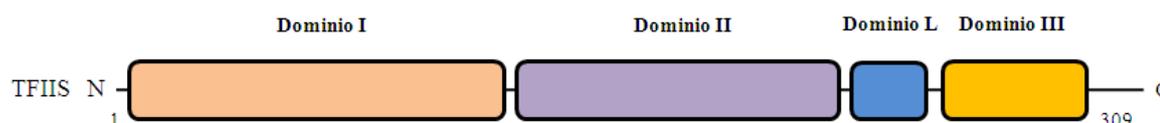


Figura 30. Estructura de los dominios de la proteína TFIIS. Figura modificada de Kim et al. 2007

TFIIS es el factor que facilita la salida del proceso de arresto de la polimerasa, estimulando la actividad catalítica de la ARN polimerasa II la cual produce un corte del ARN naciente (Fish et al. 2002, Conaway et al. 2003). Cuando se produce este corte, la enzima retrocede unos nucleótidos en la secuencia del ADN y se reposiciona correctamente la hebra de ARN en el centro catalítico de la polimerasa, reanudándose así la elongación (Figura 31). Este corte es intrínseco de la polimerasa pero necesita de la presencia de factores accesorios tales como el TFIIS para que se promueva dicho corte (Rudd et al. 1994).

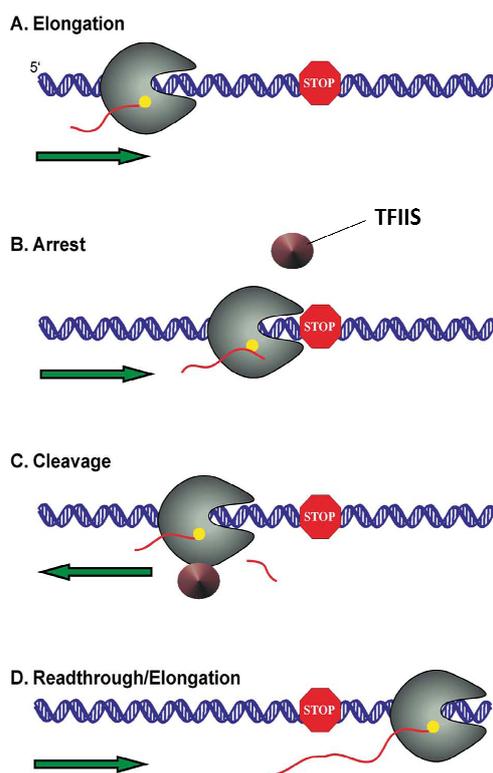


Figura 31. Esquema del proceso de salida del arresto de la ARN polimerasa II mediado por TFIIS. Imagen obtenida de Fish et al. 2002.

Inicialmente se identificó el factor TFIIS como un factor estimulador de la elongación *in vitro*, y posteriormente se demostró su función tras la iniciación de la transcripción, así como reduciendo la pausa de la ARN polimerasa II (Rappaport et al. 1987, Reinberg et al. 1987).

El sitio activo de la polimerasa sufre cambios estructurales durante la unión de TFIIS, y estos cambios estructurales son consistentes con el realineamiento de la molécula de ARN en el centro catalítico (Ketternberg et al. 2003).

3.8 YY1

Se han descrito diversas funciones para la proteína Ying Yang 1 o YY1 en procesos de diferenciación, replicación y proliferación. Esta proteína tiene la habilidad de iniciar la transcripción, pero también de regularla mediante activación o represión, dependiendo del contexto en el cual se une al ADN. Varios estudios han demostrado la asociación de YY1 a la proteína E1A, proteína que es capaz de activar el promotor AAV P5 (Chang et al. 1989). La presencia de E1A induce la activación de la

transcripción mediada por YY1. La ausencia de esta proteína, YY1 ejerce un papel represor (Shi et al. 1997). La proteína YY1 está regulada mediante acetilación por p300 y PCAF y deacetilación mediante HDACs (Yao et al. 2001).

Como se ha comentado anteriormente, dentro del contexto del virus del HIV el factor de transcripción YY1 tiene un papel represor. Las proteínas LSF y YY1 funcionan de manera cooperativa para reprimir el promotor viral. Dos proteínas LSF se unen a la secuencia del virus del HIV y son capaces de unir YY1 mediante dos dedos de Zinc. YY1 a su vez es capaz de reclutar HDAC1 al promotor, creando un ambiente reprimido en el promotor del HIV y ayudando al establecimiento de la latencia del virus (Figura 32) (Coull et al. 2000)

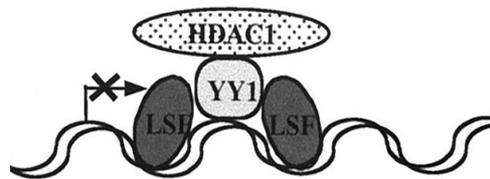


Figura 32. Reclutamiento de las proteínas LSF y YY1 al promotor viral, y el posterior reclutamiento de HDAC1. Figura extraída de Coull et al. 2000.

Otros estudios sugieren que la unión de HDAC1 al promotor del HIV se debe no solo al reclutamiento de YY1/LSF al HIV sino también de los homodímeros p50-p50 y la posterior deacetilación del promotor (Williams et al. 2006).

3.9 HP1

La proteína heterocromatínica o HP1 es una proteína de 21 KDa formada por cromodominios (*chromodomain* y *chromo shadow domain*) unidos por una secuencia de unión (Figura 33) (Lomberk et al. 2006).

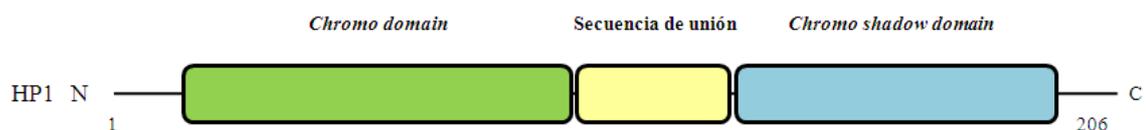


Figura 33. Estructura de los dominios de HP1. Figura modificada de Lomberk et al. 2006

HP1 fue descubierta en *Drosophila melanogaster* por su relación con heterocromatina y silenciamiento génico. Estudios en *Drosophila* y otros organismos han mostrado que esta proteína no solo se asocia a una función represora en heterocromatina, sino también en determinadas regiones en eucromatina. También se han descrito funciones en los telómeros. Mutaciones de HP1 producen fusiones anómalas de de telómeros, llegándose a producir metafases aberrantes (Fanti et al. 2008).

HP1 tiene tres isoformas, HP1 α , HP1 β y HP1 γ . En células de mamífero, HP1 α y β se localizan mayoritariamente en heterocromatina, mientras que HP1 γ se ha observado tanto en heterocromatina como en eucromatina (Minc et al. 2000). Se han descrito modificaciones post-transcripcionales de las isoformas de HP1, tales como acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y sumoilación (Lomberk et al. 2006). La fosforilación del residuo serina 83 de HP1 γ define una subpoblación de esta isoforma que se encuentra exclusivamente en eucromatina. Este hecho sugiere que la localización de las proteínas HP1 puede ser determinado no solo por la interacción con otras proteínas, sino también por una combinación de modificaciones post-traduccionales (Lomberk et al. 2006).

En las células de la microglia se ha visto que el corepresor CTIP2, unido al promotor viral mediante SP1, se asocia con la histona metiltransferasa SUV39H, la cual incrementa la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9). Este hecho recluta la proteína HP1 al promotor viral y genera un ambiente local heterocromatínico, llevando al silenciamiento del HIV (Marban et al. 2007). La proteína HP1 a su vez es capaz de reclutar más SUV39H1 y por tanto es capaz de mantener y propagar la trimetilación de H3K9, creando un bucle que puede propagar esta marca represiva a nucleosomas adyacentes (Lomberk et al. 2006, Fuks et al. 2003).

Se ha descrito que el efecto de las diversas variantes de HP1 en la represión del HIV es diferente. En algunos estudios, la isoforma que está relacionada con el silenciamiento del HIV mediado por la cromatina es HP1 γ . El reclutamiento de SUV39H1, HP1 γ y la trimetilación de H3K9 jugaría un papel de represión del promotor viral (du Chene et al. 2007) (Figura 34). La depleción de esta isoforma en células Hela con un promotor del HIV o en las células U1 con una integración latente mostró una inducción del promotor y reactivación del promotor latentemente infectado.

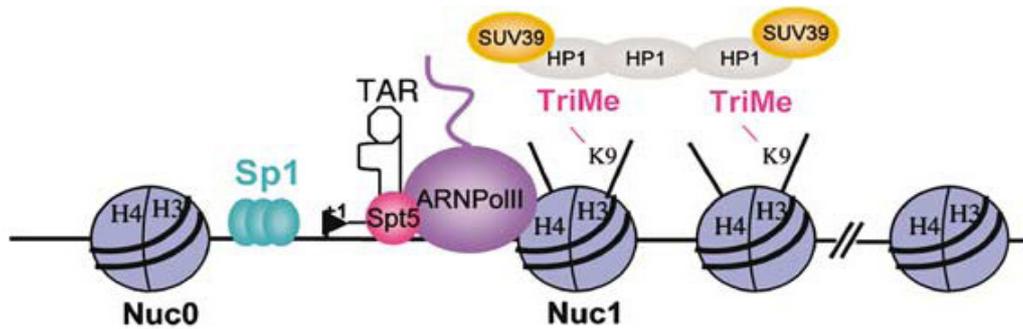


Figura 34. Representación de la asociación de HP1, SUV39H1 y la trimetilación de H3K9 en el promotor viral, ambiente que llevaría a un silenciamiento del HIV. Figura extraída de du Chene et al. 2007.

En otros casos, utilizando la técnica de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) se observó que la variante que se recluta al promotor es la HP1 β en ausencia de estímulo y HP1 γ tras la estimulación con PMA (Mateescu et. al 2008).

OBEJTIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar el estado de latencia del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en un modelo de linfocitos *in vitro*. Más concretamente, los objetivos detallados son los siguientes:

1. Creación de un sistema de latencia en linfocitos humanos mediante la infección de un minigenoma HIV-GFP en células Jurkat y obtención de clones infectados de forma productiva o latente.
2. Estudiar los lugares de integración del provirus en el genoma humano que conducen al estado latente, y relacionarlo con el estado de la cromatina.
3. Identificación de factores celulares implicados en la represión genómica del HIV.
4. Estudio del papel de los factores de reensamblaje co-transcripcional de la cromatina o afines en la interferencia transcripcional de un promotor génico sobre el promotor viral.
5. Búsqueda de compuestos químicos capaces de reactivar el HIV de células latentemente infectadas, con el fin de proponer una terapia combinada con la terapia antiretroviral actual que permita erradicar la infección en pacientes crónicos.

RESULTADOS

1. Producción de líneas celulares con una integración latente o activa del HIV

1.1. PRODUCCIÓN DEL MODELO CELULAR DE LATENCIA DEL VIRUS HIV

Con objetivo de poder estudiar el papel de la cromatina en el estado latente del promotor del HIV nos vimos en la necesidad de tener un modelo celular el cual pudiera reproducir la integración de partículas víricas en el genoma humano. Utilizamos un modelo en linfocitos descrito previamente conocido como J-lat (Jordan et al. 2003) que consiste en infectar células Jurkat (linfocitos T CD4+) con un vector lentiviral de 4Kb basado en el HIV. Este vector contiene el transactivador viral Tat y la proteína fluorescente verde GFP bajo el control del promotor del HIV. Las células se infectaron a diferentes multiplicidades de infección (*multiplicity of infection* o *m.o.i*) con partículas víricas que contienen dicho vector retroviral (LTR-Tat-IRES-GFP-LTR). (Figura 1).



Figura 1. Representación esquemática del vector lentiviral utilizado para producir infecciones latentes del promotor del virus HIV en linfocitos. El vector contiene el 5' y 3' LTR del virus HIV, el transactivador Tat y la proteína fluorescente GFP para poder seguir la expresión del promotor 5'LTR mediante citometría de flujo.

Cuatro días después de la infección se analizó en un citómetro de flujo la expresión de GFP, la cual se correlacionaba con la expresión del promotor viral, y se seleccionó la infección que produjo un porcentaje de células GFP-positivas entre 5 y 10% ya que así se obtenía una integración única del minigenoma del HIV por célula huésped. Se aislaron tanto las células GFP-positivas como GFP-negativas y estas últimas se trataron durante 16 horas con PMA (*PKC phorbol activator 12-myristate 13-acetate*), una droga mitogénica que induce la señalización celular y que es conocida como un activador de la expresión del HIV. Después del tratamiento, las células que se volvieron GFP-positivas fueron aisladas mediante un separador celular para obtener las células inducibles. Esta población corresponde a las células latentemente infectadas ya que no expresan GFP en

estado basal pero en la presencia de un estímulo externo (en este caso el agente mitogénico PMA) se activa la transcripción del LTR y se expresa GFP. Varios días después de la infección y de la separación de células, la población celular latentemente infectada fue analizada en un citómetro de flujo. Tal y como se esperaba, la mayoría de células se habían vuelto GFP-negativas, la cual cosa significaba que el promotor del HIV se había silenciado de nuevo al dejar de estar en presencia de PMA. Del total de esta población, un 15% de células aproximadamente todavía eran GFP-positivas debido a la distinta velocidad de represión del HIV, velocidad que podría ser diferente según el lugar de integración del promotor en la célula huésped (Figura 2).

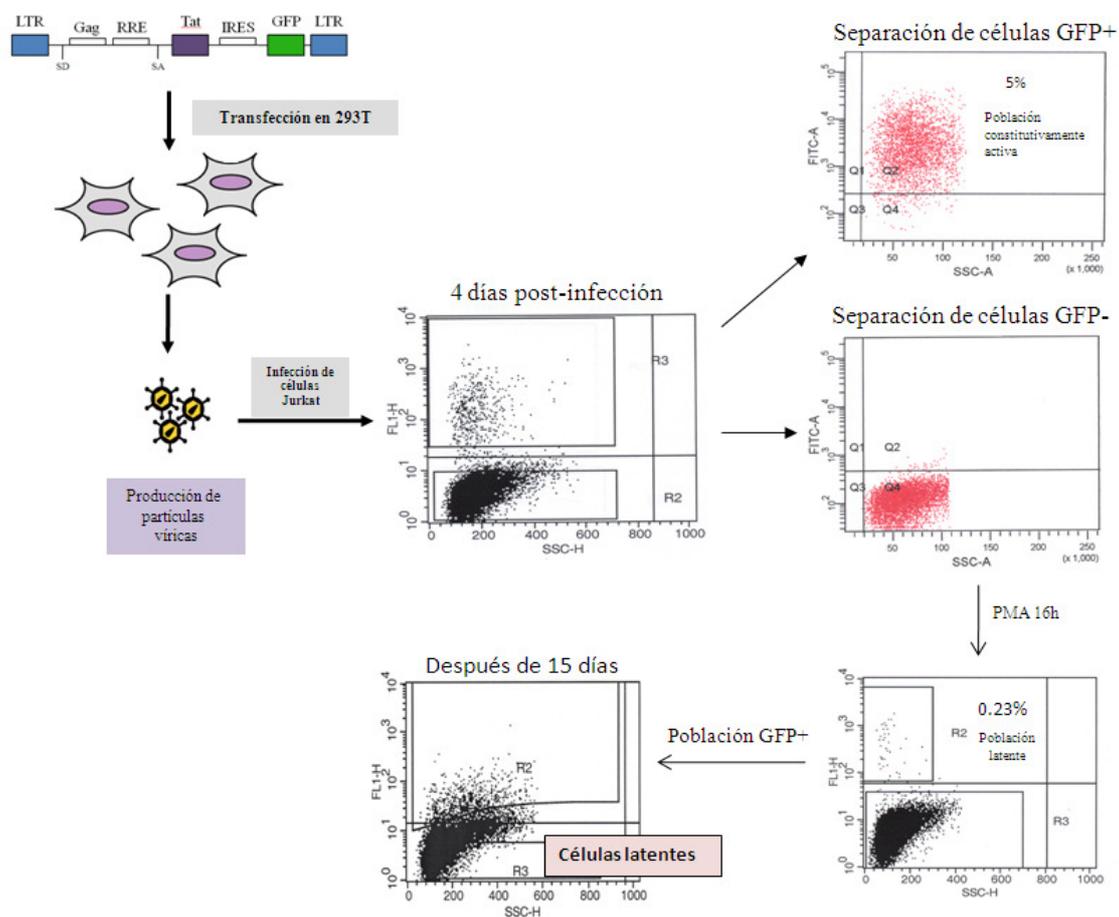


Figura 2. Representación de la producción de células latentemente infectadas. Las partículas víricas producidas en las células empaquetadoras 293T se utilizan para infectar células Jurkat. Cuatro días después de la infección el 5% del total de células son GFP-positivas y el resto son GFP-negativas. Se separan ambas poblaciones y se tratan las células GFP-negativas con PMA (10nM) durante 16 horas, la cual cosa produce una activación de las células latentes que en estado basal no tenían expresión del promotor HIV. El total de células latentes asciende a un 0.23% del total de negativas, que se separan y se dejan en cultivo para que vuelvan al estado latente de nuevo.

La población de células latentemente infectada se mantuvo como una población heterogénea en la cual cada una de las células de esta población tiene integrado el promotor del HIV de manera única en un lugar diferente del genoma así como también se utilizó para hacer clones latentes. Cada uno de estos clones proviene de una célula con integración única de la población inicial y se obtuvieron un total de 51 clones.

La población inicial que expresaba de manera constitutiva el HIV (GFP-positivas) también fue usada para producir un total de 11 clones, los cuales son muy útiles como control para comparar con los clones latentemente infectados. Todos estos clones activos tienen porcentajes de GFP mayores del 80% (Figura 3).

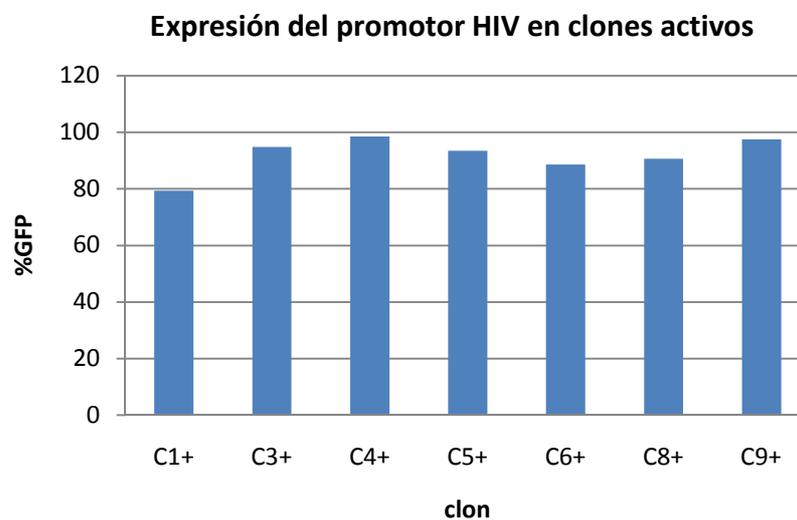


Figura 3. Expresión del promotor HIV en clones constitutivamente activos. Expresión de GFP de 7 clones activos del total de los 11 obtenidos demuestra que la expresión del promotor HIV se mantiene constitutiva con porcentajes mayores al 80%. Los datos se obtuvieron mediante un citómetro de flujo.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE CLONES LATENTEMENTE INFECTADOS

Para estudiar en más detalle los clones latentemente infectados con el vector HIV, se analizó su expresión mediante el citómetro de flujo después de varias semanas en cultivo. Se observó que en su estado basal, los clones tenían diferentes comportamientos, mostrando porcentajes de células GFP-positivas variados, debido a la diferente velocidad de restablecimiento de la latencia tras la activación con PMA. La actividad basal de los clones era baja (porcentaje de GFP menor de 10%) en un 63% y

muy alta (mayor de 90%) en un 18% (Figura 4). Estos datos sugieren que en una infección por HIV, el grado de expresión del virus es diferente de célula a célula (en este caso, de clon a clon). Varios estudios mostraron que la integración del promotor del HIV en los clones latentes podía producirse en lugares distintos del genoma huésped (Jordan et al. 2003, Lewinski et al. 2005). Así pues, la diferente expresión del HIV en los distintos clones podría estar indicando que ya que estos clones podrían diferir en su lugar de integración, dicho lugar de integración en la célula huésped podría ser un factor importante para el establecimiento de la latencia. Es por este motivo que en el presente estudio nos interesamos en conocer en más detalle la relación entre el lugar de integración y el estado de latencia del HIV.

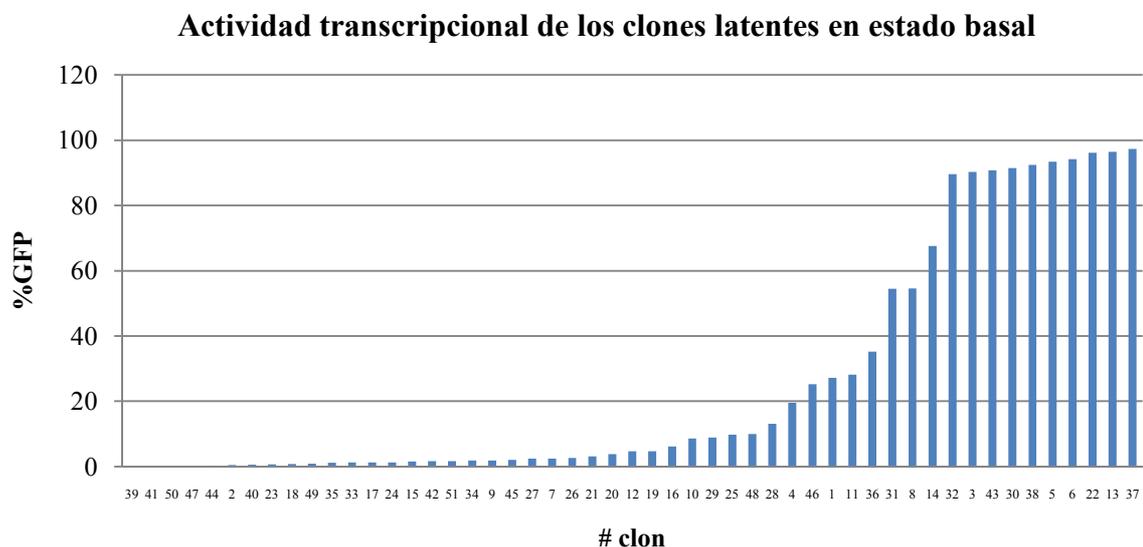
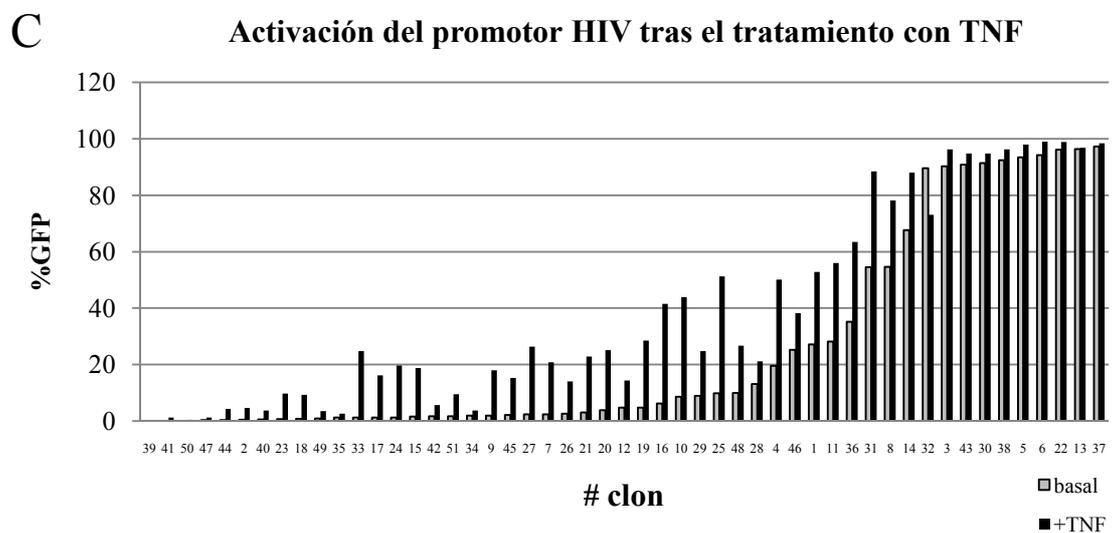
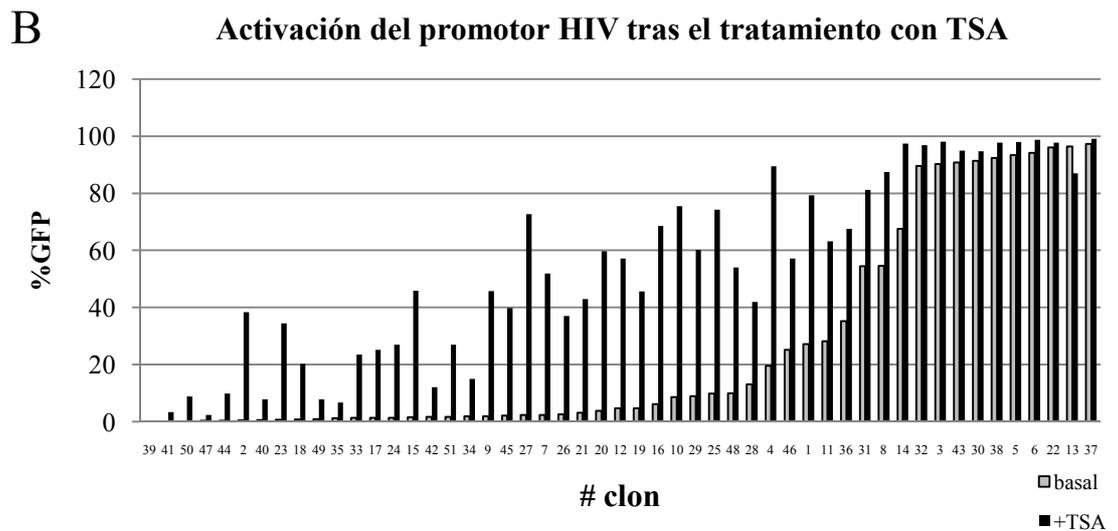
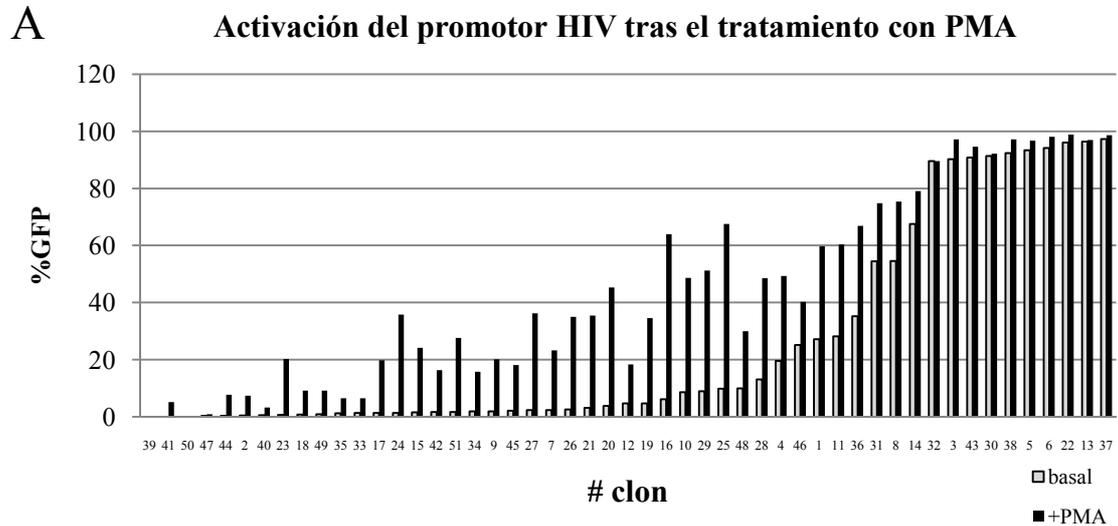


Figura 4. Expresión de los clones latentemente infectados en estado basal. El total de 51 clones obtenidos (nombrados desde clon #1 a clon#51) fueron analizados en el citómetro de flujo después de 4 semanas en cultivo. Los datos se representan como porcentaje de células GFP-positivas para cada clon. Los clones están ordenados de menor a mayor expresión basal de HIV-GFP.

Posteriormente, los clones latentes fueron tratados con PMA, TSA (*Trichostatin A*, un inhibidor de histonas deacetilasas) y TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) para comprobar si el promotor HIV era capaz de reactivarse con estos compuestos, los cuales se han descrito previamente como activadores del HIV (Jordan et al. 2003, Van Lint et al 1996). Otro de los propósitos de estos tratamientos fue entender cuáles son las rutas de señalización que están involucradas en la reactivación del HIV. Dicha reactivación se analizó mediante citómetro de flujo, observando el aumento de las células GFP-

positivas. Se observó reactivación de los clones latentes pero dicha reactivación era diferente entre clones, sugiriendo que los diversos clones responden de forma distinta mediante vías de señalización diferentes (Figuras 5A-5D).



D

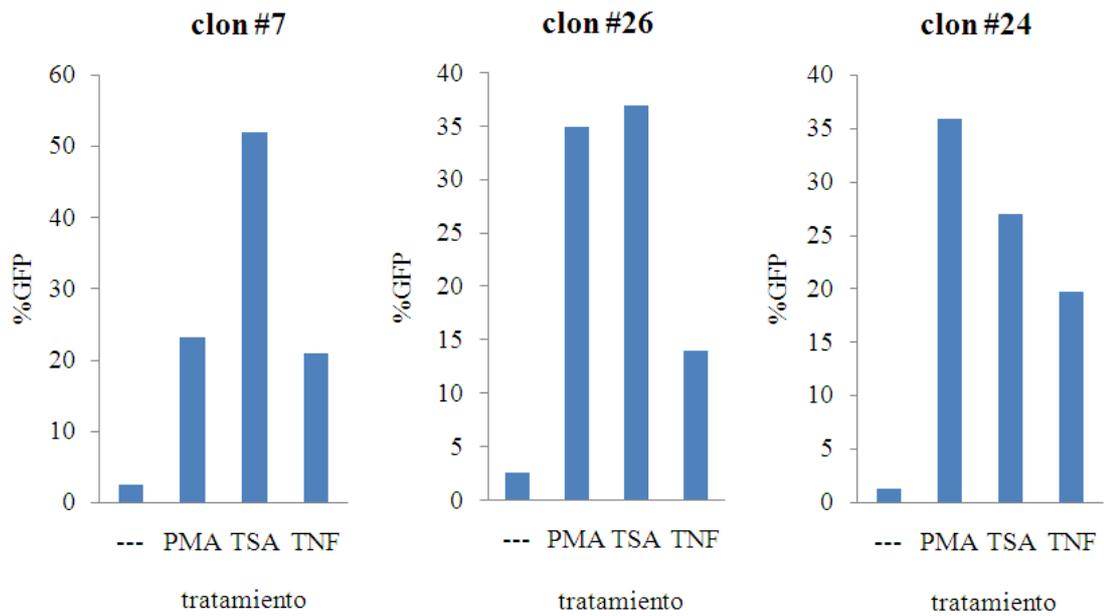


Figura 5. Reactivación del promotor HIV tras tratamiento con PMA, TSA y TNF. Los 51 clones latentes fueron tratados durante 16 horas con PMA 10nM (Figura 5A), TSA 400nM (Figura 5B) y TNF 10ng/ml (Figura 5C) y la reactivación del promotor se siguió mediante análisis en el citómetro de flujo. Los datos se expresan como porcentaje de células GFP-positivas. Los clones están ordenados como en la Figura 4. (D) Ejemplo de 3 clones cuya reactivación del HIV latente es diferente según el tratamiento utilizado.

2. Análisis del lugar de integración del HIV en clones latentemente infectados

2.1. PCR PARA LOCALIZAR INTEGRACIONES EN REGIONES ALFOIDEAS

En estudios previos se había observado que la integración del promotor HIV en ciertos clones latentemente infectados había ocurrido en regiones alfoideas, regiones que se localizan en los centrómeros de los cromosomas (Jordan et al. 2003, Lewinski et al 2005). Este hecho respalda la idea que las integraciones latentes del HIV pueden ocurrir en regiones con bajo contenido de genes o cuya expresión génica es muy baja, como es el caso de la heterocromatina centromérica (Figura 6).

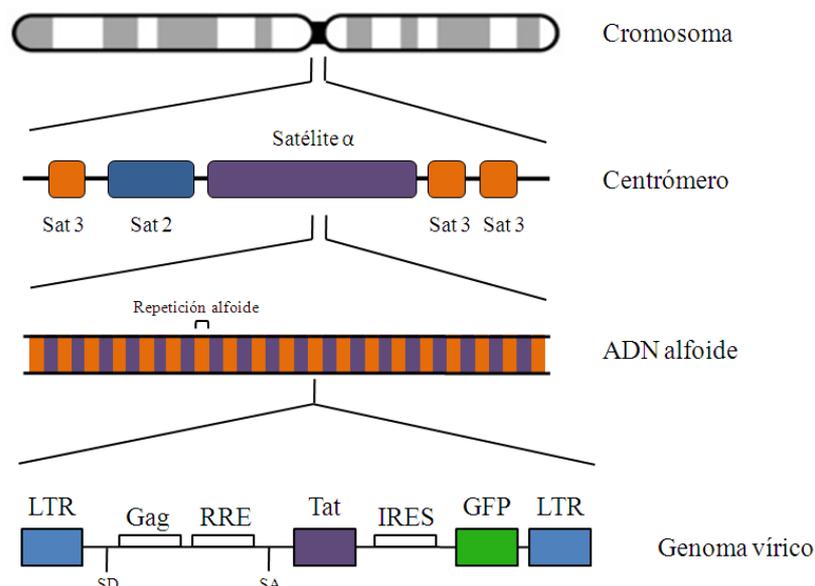


Figura 6. Representación esquemática de las regiones alfoideas. Las regiones alfoideas son regiones altamente repetidas que se localizan formando parte de la heterocromatina de los centrómeros.

Con objetivo de confirmar estos estudios y caracterizar nuestra colección de clones latentes, examinamos si la integración de alguno de los clones había ocurrido en estas regiones alfoideas.

Se diseñaron unos ensayos de PCR siguiendo un protocolo descrito previamente (Jordan et al. 2003). Dicho protocolo consistía en hacer una primera PCR usando oligonucleótidos degenerados correspondientes a secuencias consenso de las regiones alfoideas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y un segundo oligonucleótido de una región específica del LTR del HIV (oligonucleótido A o pEV1371). Si la integración del HIV ocurre en una

región alfoidea o en sus alrededores se obtiene amplificación en la PCR pero la banda no se detectaría de manera sencilla debido a la naturaleza repetitiva de las regiones alfoideas. El oligonucleótido de la región alfoidea se uniría en los múltiples sitios repetidos de la secuencia, amplificando diversas bandas de diferentes tamaños. Es por tal razón que se diseña una segunda PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la región LTR del HIV (oligonucleótidos B o pEV1372 y C o pEV1373) y utilizando el ADN obtenido de la primera PCR (Figura 7).

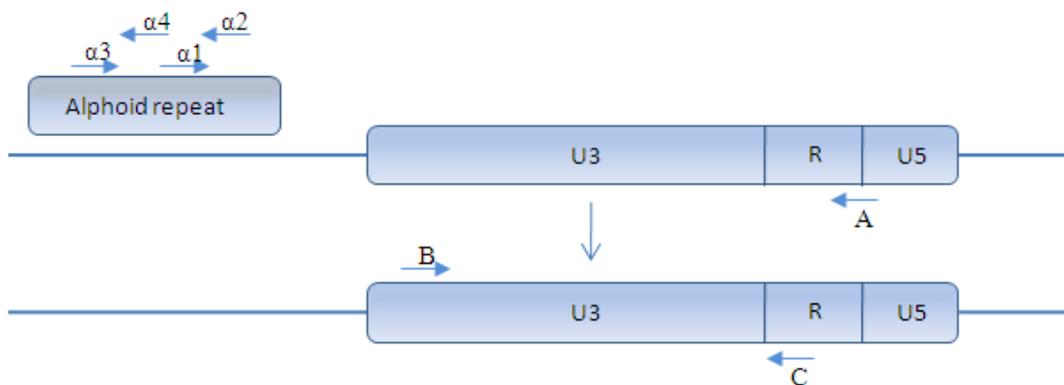


Figura 7. Figura donde se representan las PCRs para comprobar si la integración del HIV ha ocurrido en regiones alfoideas (*alphoid repeat*) o en su cercanía. Se realiza una primera PCR con un oligonucleótido específico de la región alfoidea ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y el oligonucleótido A (pEV1371). El producto de la PCR obtenido en la primera PCR se usa para hacer una segunda PCR con los oligonucleótidos B (pEV1372) y C (pEV1373), ambos dentro de la región LTR del HIV y dentro del amplicón producido con los oligonucleótidos A y el específico de la región alfoidea.

Utilizando estas dos PCRs, inicialmente se analizaron algunos clones latentemente infectados previamente descritos como controles (Jordan et al. 2003) y un clon de nuestra librería. En este experimento se observó que la integración del promotor HIV en los clones C1, H2 y 82 se localiza en regiones alfoideas o en sus alrededores, mientras que el clon A1 no se encuentra en estas regiones. Los oligonucleótidos $\alpha 1$ y $\alpha 3$ están orientados en el mismo sentido, y lo mismo ocurre con los oligonucleótidos $\alpha 2$ y $\alpha 4$. Consecuentemente, amplificaciones con oligonucleótidos $\alpha 1$ y $\alpha 3$ pero no con $\alpha 2$ y $\alpha 4$ y viceversa es un indicativo de tener una integración cercana a regiones alfoideas. En los clones C1 y H2 se obtuvo amplificación en la PCR usando $\alpha 2$ y $\alpha 4$ pero en cambio, en el clon 82, la amplificación se obtuvo con los oligonucleótidos $\alpha 1$ y $\alpha 3$. En el clon latente A1 se pudo observar amplificación similar a la obtenida en el ruido de fondo con

los controles negativos, pero no una amplificación mayoritaria de un par de oligonucleótidos en un sentido o en otro, la cual cosa llevó a pensar que dicho clon no se localizaba en regiones alfoideas (Figura 8).

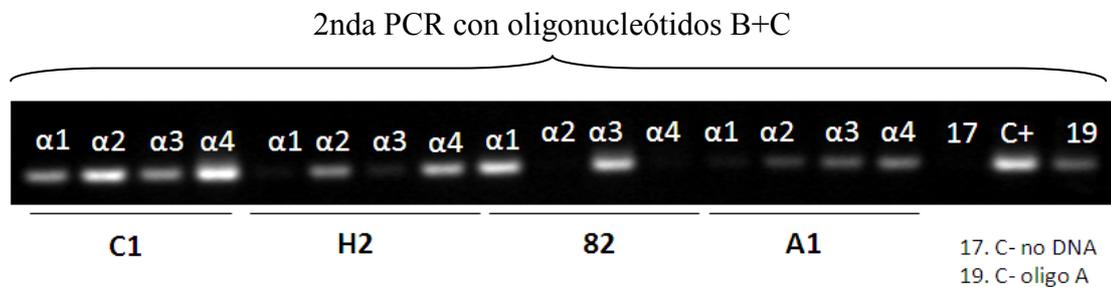


Figura 8. Ensayo con PCRs para detectar integraciones en regiones alfoideas o en los alrededores. Se llevó a cabo una primera PCR utilizando un oligonucleótido degenerado que reconoce las secuencias consenso de las regiones alfoideas y un oligonucleótido A en la región LTR. Esta primera PCR se siguió de una segunda utilizando los oligonucleótidos B+C en la región del LTR del HIV. Los productos de la PCR se detectaron en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

El lugar de integración del clon C1 se clonó y secuenció para confirmar su integración en regiones alfoideas. El producto de la PCR obtenido usando los oligonucleótidos A y $\alpha 4$ se utilizó en una segunda PCR con oligonucleótidos C y $\alpha 2$. Una tercera PCR se hizo con el producto obtenido y los oligonucleótidos C y $\alpha 4$. El ADN obtenido de esta PCR se clonó en el PCRBlunt (Invitrogen) y se secuenció, confirmando su lugar de integración en estas regiones repetitivas.

Para poder mirar la posible localización en regiones alfoideas o cercanías en varios clones, se hizo la segunda PCR explicada anteriormente mediante PCR en tiempo real, en vez de por PCR convencional. Pudimos observar que la integración del HIV en regiones repetitivas alfoideas se había dado en al menos 6 de un total de 21 clones analizados (Figura 9), ya que se observó una mayor amplificación utilizando $\alpha 2$ y $\alpha 4$ que $\alpha 1$ y $\alpha 3$.

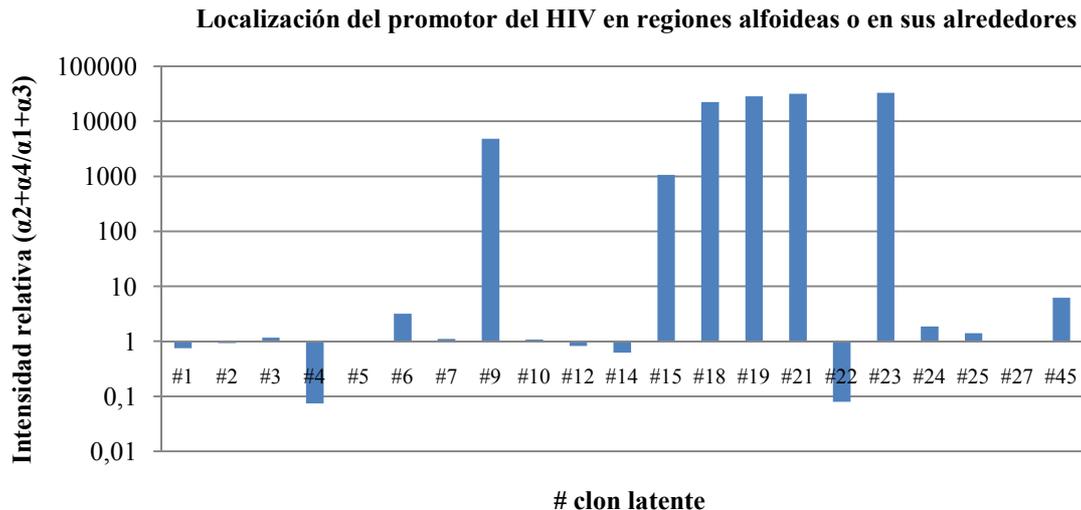


Figura 9. Localización de la integración del HIV en regiones alfoideas mediante PCR en tiempo real. Se analizaron un total de 21 clones latentes de la librería utilizando PCR en tiempo real para llevar a cabo la segunda PCR con los oligonucleótidos B+C. Los resultados se expresan como la intensidad relativa de cada par de oligonucleótidos de las regiones alfoideas en un sentido en relación al otro par de oligonucleótidos en el otro sentido ($\alpha_2+\alpha_4/\alpha_1+\alpha_3$). El gráfico se representa en escala logarítmica y se puede observar que la integración de los clones 9, 15, 18, 19, 21 y 23 se localiza claramente en regiones alfoideas.

2.2. SECUENCIACIÓN DE LOS LUGARES DE INTEGRACIÓN MEDIANTE LIGACIÓN DE ADAPTADORES

Otra manera para poder identificar dónde se ha integrado el promotor del HIV es secuenciar el ADN de los lugares que flanquean la integración. Para ello se partió del ADN genómico del clon que se quería estudiar y se digirió en tubos separados con cuatro enzimas de restricción diferentes, que producen extremos romos. Se ligó un adaptador (secuencia de ADN conocida) a los extremos del genómico digerido y el material de la ligación fue utilizado en una primera PCR con un oligonucleótido específico de la secuencia del adaptador (AP1) y otro específico de la secuencia del LTR (GSP1). El producto de esta primera PCR se usó en una segunda PCR usando otro par de oligonucleótidos, uno en el adaptador (AP2) y el otro en el LTR (GSP2), ambos dentro del producto que se produce en la primera PCR. Los productos de la PCR se clonaron y secuenciaron para conseguir la región que flanquea la integración del HIV (Figura 10).

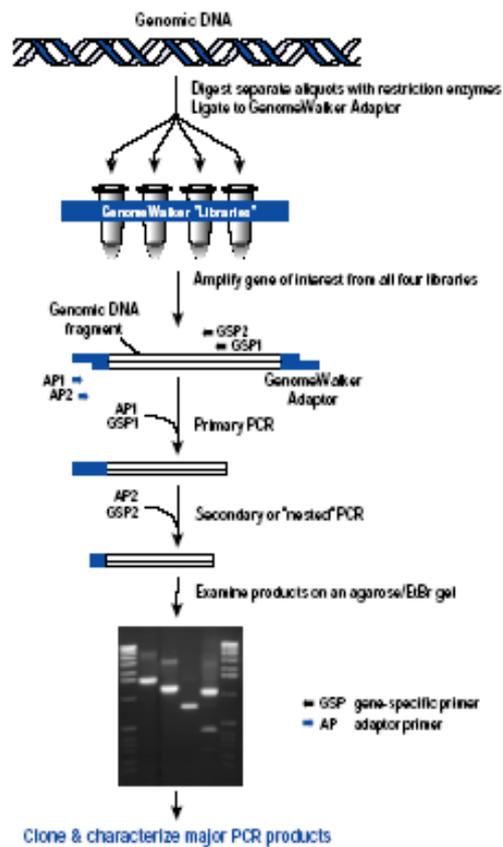


Figura 10. Esquema del proceso para localizar el lugar de integración dónde se encuentra el HIV. Los adaptadores de secuencia de ADN conocida se ligan al ADN genómico del clon elegido y que previamente se había digerido con 4 enzimas distintas que cortan la secuencia dejando extremos romos. Este material ya ligado se utiliza en dos PCR consecutivas con primers específicos en el adaptador y en el LTR del HIV. El producto de la segunda PCR se corre en un gel de agarosa con Bromuro de Etidio. La o las bandas más intensas que se observan se cortan y se purifica el ADN del gel. Este ADN es secuenciado y la secuencia obtenida es analizada mediante BLAST para saber a qué región del genoma pertenece.

En el presente estudio se decidió empezar a analizar en más detalle el clon #27, por su baja expresión del promotor del HIV en estado basal, la cual cosa indica su alto estado latente, y por su alta reactivación al tratar con agentes como PMA, TSA y TNF, ampliamente conocidos como reactivadores del promotor del HIV. Se utilizó el protocolo descrito previamente para localizar el lugar de integración del clon 27 y se observó que la integración en este clon se había dado en un intrón del gen UBXD8 (UBX containing domain 8, también conocido como FAF2 o ETEA) y que el promotor del HIV se encontraba insertado en el mismo sentido de la transcripción del gen huésped (Figuras 11A y 11B). Más concretamente, la integración del HIV se había

producido en el intrón entre los exones 8 y 9 (Figura 11B). Dicho gen se localiza en el cromosoma 5 y se ha descrito como un gen que regula la resistencia a apoptosis observada en células T y eosinófilos en pacientes que padecen dermatitis atópica (Imai et al. 2002).

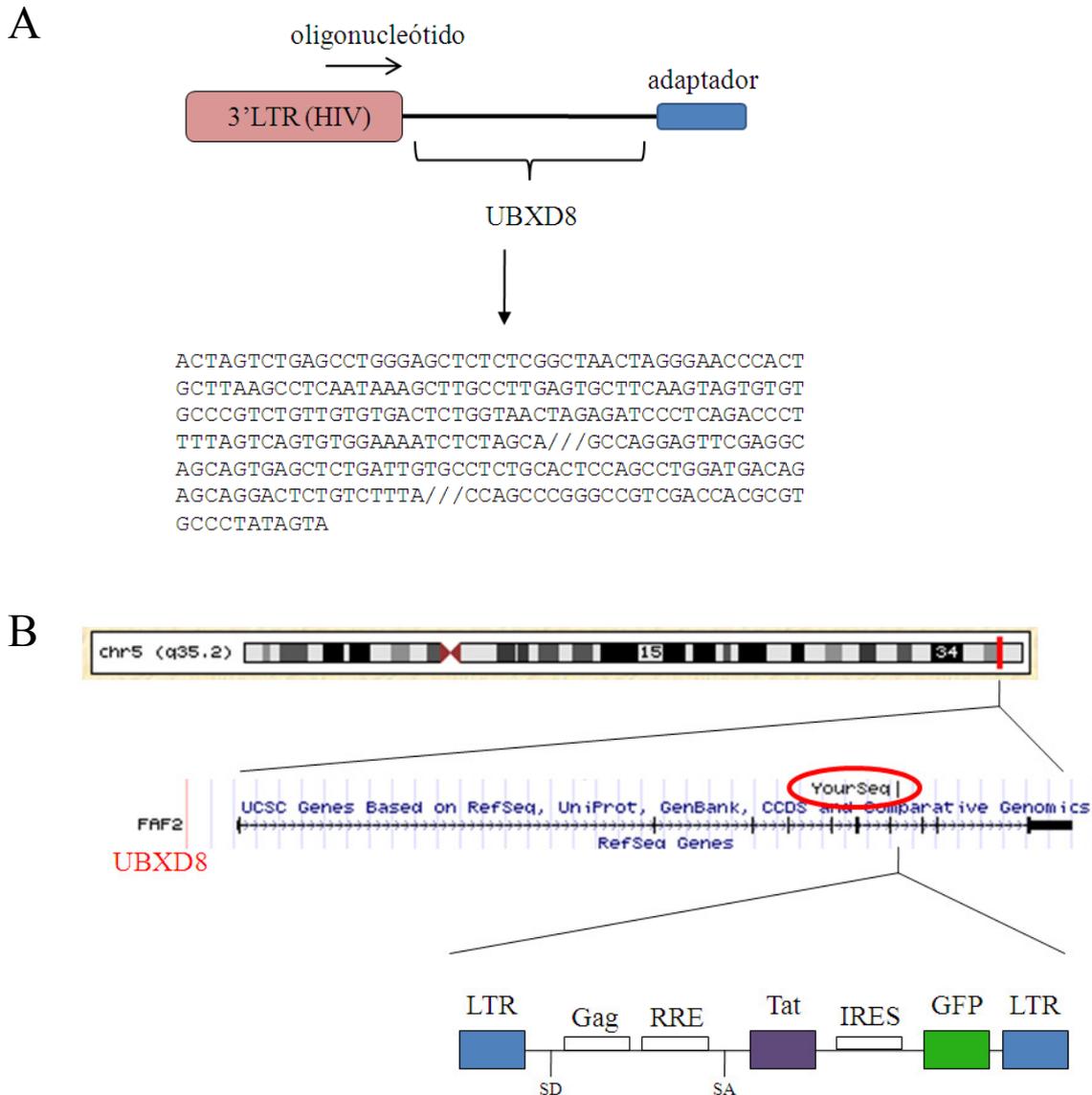


Figura 11. Secuenciación del lugar de integración del genoma del HIV en el clon 27. (A) Las bandas obtenidas de la segunda PCR, las cuales han sido purificadas del gel de agarosa, son secuenciadas con un oligonucleótido presente en la región 3'LTR de la secuencia viral. La secuencia localizada entre el 3'LTR y el adaptador corresponde a la secuencia del gen donde se ha integrado el HIV. Las tres partes, HIV, UBXD8 y adaptador, están separadas por el símbolo /// en la secuencia. Esta secuencia es utilizada en un BLAST, obteniéndose así el gen de interés que en este caso es el gen UBXD8 (o FAF2). **(B)** Se muestra la localización de la integración del HIV en el cromosoma 5, entre los exones 8 y 9 de la secuencia del gen UBXD8.

Con el fin de confirmar que la integración del HIV en el clon 27 se había producido realmente en el gen UBXD8, se llevó a cabo una serie de PCRs combinando oligonucleótidos del gen (P1 y P2, localizados anteriormente y posteriormente a la integración del HIV) con oligonucleótidos dentro de la región del HIV (P3 y P4) (Figura 12A). La PCR se llevó a cabo con ADN genómico del clon 27 y utilizando ADN genómico del clon 59 como control. La primera observación fue que se obtenía amplificación en ambos genómicos al combinar los oligonucleótidos P1 y P2 del gen UBXD8. El minigenoma del HIV tiene una longitud de 4Kb, longitud que según la secuenciación previa estaría integrada entre las secuencias de los oligonucleótidos P1 y P2 pero lo que se está observando en la PCR con el ADN genómico del clon 27 es la amplificación del gen intacto del otro alelo, donde no está integrado el HIV. Al combinar los oligonucleótidos específicos para el LTR del HIV y el oligonucleótido P2 (P3+P2 y P4+P2) se pudo observar que se obtenía amplificación en la PCR solo del genómico del clon 27, y no del clon 59, la cual cosa confirmó que el HIV en este clon en concreto efectivamente se localiza en el gen UBXD8 y su integración está en el mismo sentido que el gen. El haber observado una integración latente del genoma viral en un intrón de un gen nos permitió concluir que las integraciones del HIV en células latentes no solo se encuentran en regiones de heterocromatina como serían las regiones alfoideas, sino que también se pueden dar en regiones intrónicas de genes.

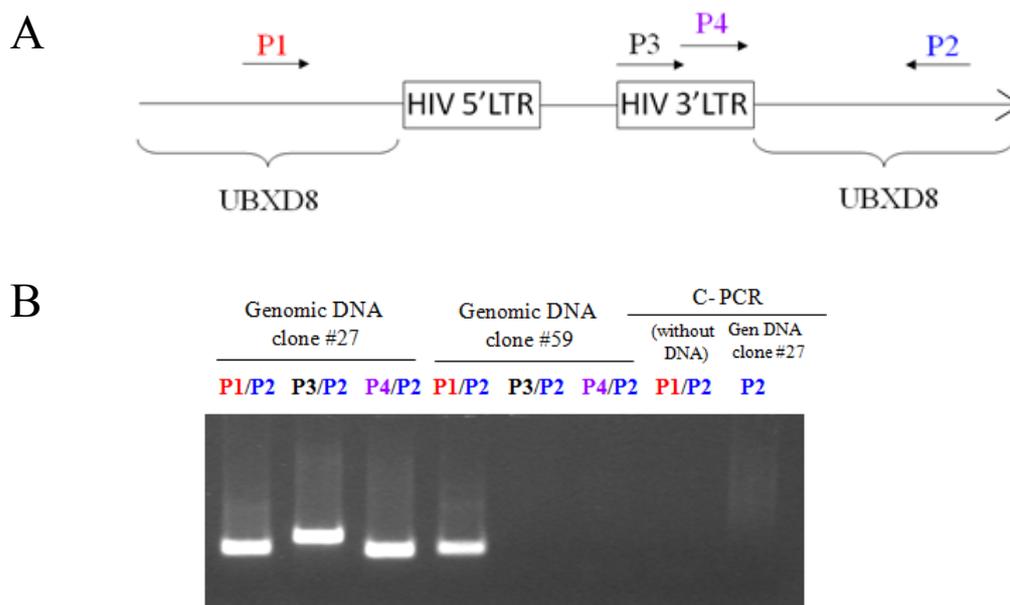


Figura 12. Localización de la integración del HIV en el clon 27 en el gen UBXD8. (A) Esquema de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para confirmar el lugar de integración del HIV en el clon 27. Se

usaron dos oligonucleótidos P1 y P2 de la secuencia intrónica del UBXD8, P1 situado antes de la integración del HIV y P2 situado después de la integración, acorde con los resultados de la secuenciación. Como oligonucleótidos específicos de la secuencia LTR se usaron P3 y P4. **(B)** Resultado de la PCR al combinar oligonucleótidos de la secuencia LTR (P3 y P4) con el oligonucleótido P2 del gen. Se usó ADN genómico del clon 27 y del clon 59 como control. Los dos últimos carriles corresponden a los controles negativos, uno de ellos combinando los oligonucleótidos P1+P2 del gen UBXD8 pero sin añadir ADN y el otro utilizando solo un oligonucleótido y añadiendo ADN genómico del clon 27.

En el presente estudio se han utilizado clones latentes producidos para el mismo (procedimiento explicado en el apartado 1.1), así como otros clones producidos anteriormente en otros estudios (Jordan et al. 2003). Cuatro de los clones con igual minigenoma del HIV que los producidos en este estudio (4Kb de longitud) son el clon H2, clon A1, clon C1 y clon A2. La integración de los clones H2 y C1 fue obtenida previamente en los experimentos utilizando las PCRs para confirmar las integraciones del HIV en regiones alfoideas (apartado 2.1). La integración del clon A1 había sido secuenciada previamente en el laboratorio.

El lugar de integración del minigenoma viral en el clon A2 es en el gen UTX (Ubiquitously transcribed X chromosome) en el cromosoma X (Figura 13), que codifica para una enzima demetilasa con actividad sobre la lisina 27 de la histona H3 (Smith et al. 2008, Swigut et al. 2007).

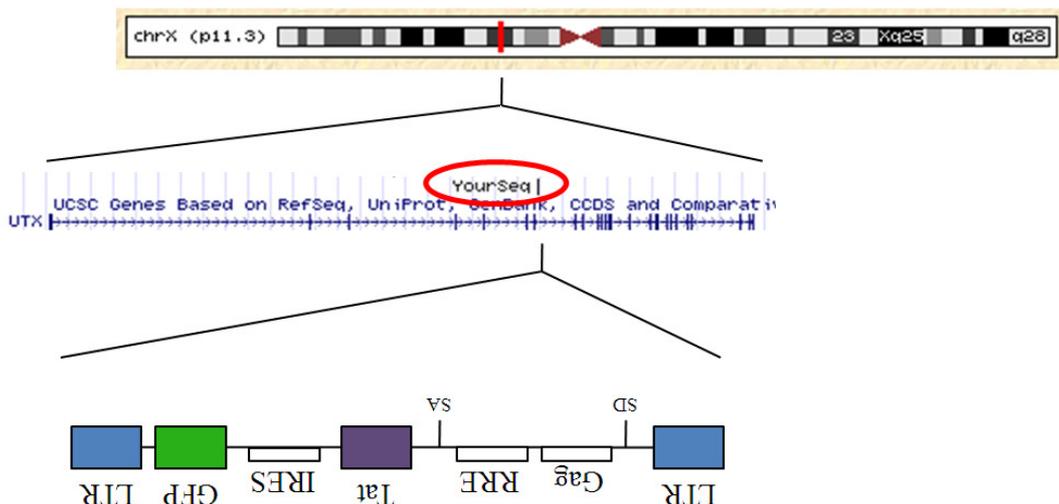


Figura 13. Secuenciación del lugar de integración del genoma del HIV en el clon A2. Se muestra la localización de la integración del HIV en el cromosoma X, entre los exones 8 y 9 de la secuencia del gen UTX.

Con la finalidad de comprobar dicho lugar de integración del clon A2 y el sentido de la misma, se hicieron una serie de PCRs combinando oligonucleótidos específicos para la región del LTR y oligonucleótidos del gen dónde se había dado la integración, es decir, el gen UTX. En el experimento se utilizó ADN genómico del clon A2 y genómico del clon 59 como control y se probaron oligonucleótidos en el intrón del gen UTX y en la secuencia del LTR del HIV (Figura 14A). Al combinar los oligonucleótidos P1 y P2 del gen UTX, solo se obtuvo amplificación utilizando el ADN del clon 59, pero no del A2. Teniendo en cuenta que las células Jurkat provienen de un individuo masculino y que por lo tanto solo tienen un cromosoma X, esto nos hizo pensar que el hecho que el HIV estuviera integrado en medio de la secuencia de ambos oligonucleótidos sería el responsable de la no amplificación en el clon A2. Combinando los oligonucleótidos P1 (gen UTX) y P3 (LTR) se observó una banda en el gel en el clon A2 pero no en el clon #59, hecho que corroboraba que el HIV en el clon A2 se encuentra integrado en el gen UTX y además que dicha integración se dio en sentido contrario al de la transcripción del gen huésped ya que solo la combinación de P1+P3 daba amplificación en la PCR pero no la combinación P2+P3 (Figura 14B).

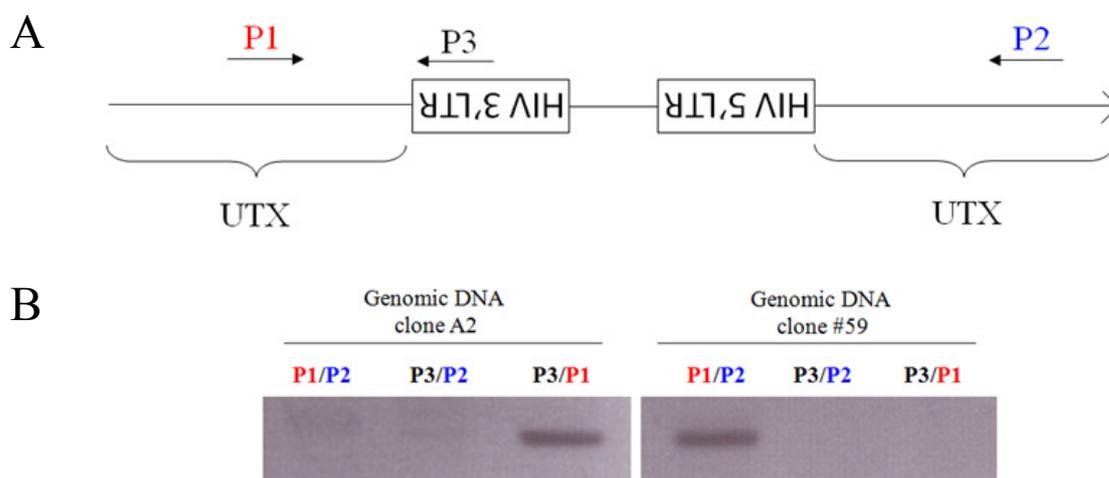


Figura 14. Localización de la integración del HIV en el clon A2 en un intrón del gen UTX. (A) Figura de los oligonucleótidos utilizados para confirmar el lugar de integración del promotor del HIV en el clon A2. Los oligonucleótidos P1 y P2 se encuentran en la secuencia del intrón del gen UTX y el oligonucleótido P3 se localiza en la secuencia del LTR. (B) PCR resultante de la combinación entre los oligonucleótidos P1+P2, P3+P2 y P3+P1, usándose ADN genómico del clon A2 y genómico del clon 59 como control. Se obtiene amplificación combinando el oligonucleótido específico del gen UTX y el del LTR en el genómico extraído del clon A2 pero no del clon 59.

A parte de estos clones con el minigenoma del HIV, también se han usado clones que tienen el genoma entero del virus de 9Kb de longitud pero con la secuencia de GFP en lugar del gen *Nef* (Bieniasz and Cullen et al. 2000) y se ha introducido una mutación en el gen *env*. Los clones usados con este genoma vírico son el 6.3, 10.6, 15.4 y 8.4 (Jordan et al. 2003).

En resumen, se conocen los lugares de integración de todos los clones mencionados y utilizados en este estudio gracias a nuestras secuenciaciones y por secuenciaciones previas en varios estudios (Jordan et al. 2003, Lenasi et al. 2008). También se conoce si el HIV se ha integrado en igual sentido o en sentido contrario al del gen (Tabla 1).

nombre del clon	genoma HIV	gen	sentido del HIV (respecto al gen)
6.3	9Kb	intrón del gen PP5	mismo
10.6	9Kb	intrón del gen SEC1GA	contrario
15.4	9Kb	intrón del gen UBA2	mismo
8.4	9Kb	intrón del gen DNA helicase V	contrario
A2	4Kb	intrón del gen UTX	contrario
27	4Kb	intrón del gen UBXD8	mismo
H2	4Kb	región alfoidea	
C1	4Kb	región alfoidea	
A1	4Kb	región intergénica	

Tabla 1. Información de los clones utilizados en este estudio. Se han utilizado clones con dos tipos de genoma del virus, uno de 4Kb de longitud (LTR-Tat-GFP-LTR) y el otro de 9Kb de longitud que se compone del genoma entero del HIV con una mutación en el gen *env* y GFP en substitución de la secuencia de *Nef*. En la tabla 1 se muestra el nombre de cada clon, qué genoma HIV tiene integrado, en qué región está integrado el HIV y en el caso de que esté integrado dentro de un gen, cual es el sentido de la secuencia del HIV respecto al sentido del gen donde está integrado.

3. Relación entre los transcritos virales y los generados por el gen donde se ha integrado el genoma del HIV: HIV en el gen UBXD8 en sentido co-transcripcional

3.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HUÉSPED

En estudios previos se ha descrito como integraciones del virus HIV en regiones de genes activos pueden conllevar a un estado latente del promotor (Greger et al 1998, Lewinski et al. 2005). Durante la transcripción del gen se produciría el ARNm primario conteniendo la secuencia del HIV, que posteriormente sería degradado juntamente con el resto del intrón en el proceso de *splicing* (Lassen et al. 2004). En trabajos recientes se ha llevado a cabo ensayos que han detectado una gran cantidad de transcrito iniciado en el gen endógeno y terminado en la región poli-A del extremo 5' LTR del promotor del HIV dando lugar a un transcrito truncado en el alelo donde se encuentra el HIV. En este mismo estudio se describe la interferencia transcripcional como método de silenciamiento del HIV, debido a que la integración del HIV en un gen transcripcionalmente activo conlleva la represión transcripcional del genoma viral integrado en dicho gen (Lenasi et al. 2008), por mecanismos aun desconocidos.

La primera pregunta que nos hicimos fue si en un estado basal de las células, el gen UBXD8 es un gen transcripcionalmente activo. Para ello, se compararon los niveles de expresión de este gen con los genes CHES1, CXCR4 y PCAF. CXCR4 se había descrito previamente en Jurkat como un gen activo en estado basal (Contento et al. 2008, Lewinski et al. 2005). En cambio, el gen PCAF está reprimido en dichas células (Lewinski et al. 2005). Con el fin de poder comparar los niveles de transcritos de estos diferentes genes, se utilizó la técnica de RT-DqPCR (RT-DNA-qPCR) descrita por Lenasi et al. (2008). Dicha técnica es una modificación de la RT-PCR a tiempo real (o RT-qPCR) y se basa en el hecho que el ratio molar entre dos genes utilizando ADN genómico es el mismo. Por lo tanto, la RT-DqPCR permite la normalización de los valores obtenidos amplificando ADNc al ponerlos en relación con los valores obtenidos amplificando ADN genómico con el mismo par de oligonucleótidos. Si se está comparando genes presentes en dos cromosomas homólogos, su ratio molar es de 1. En cambio se debe tener en cuenta que el ratio molar del genómico entre una secuencia que está presente solo en un alelo y otra que está en dos cromosomas es de 1:2, y por tanto

se debe multiplicar por 2 los valores obtenidos con los oligonucleótidos utilizando el ADNc.

Se utilizó este sistema para poder comparar los niveles de expresión de los diferentes genes y para ello se extrajo el ARN del clon 27 y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos para los genes UBXD8, CXCR4, CHES1 y PCAF y utilizando el ADN genómico con los mismos oligonucleótidos con el fin de normalizar las muestras (Dq-PCR). Se vio que el gen UBXD8 es un gen transcripcionalmente activo en el clon 27 al comparar su expresión con otros genes (Figura 15)

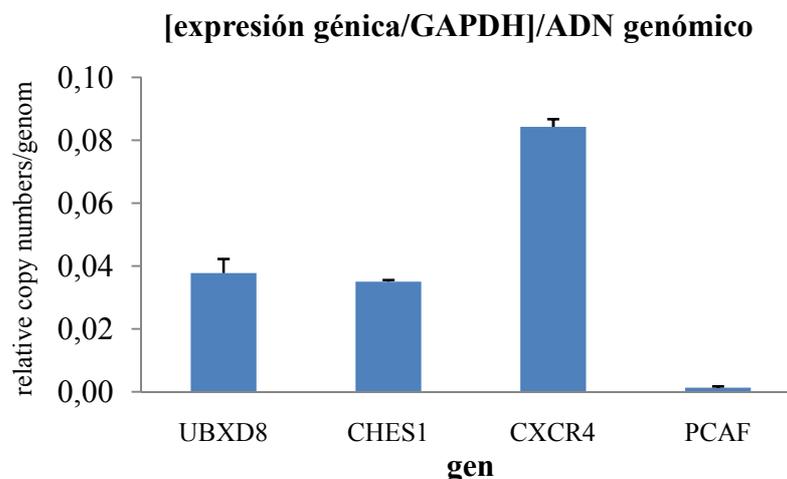


Figura 15. El gen UBXD8 es transcripcionalmente activo. Los niveles de expresión de los genes UBXD8, CHES1, CXCR4 y PCAF fueron comparados utilizando una RT-PCR a tiempo real y utilizando el ADN genómico del clon 27 como control para normalizar las muestras (RT-DqPCR). Se muestran los valores obtenidos utilizando los oligonucleótidos específicos de cada gen en el ADNc en relación a GAPDH como control externo y todo ello en relación a los valores obtenidos con el ADN genómico usando los mismos oligonucleótidos. Para usar esta técnica, los oligonucleótidos deben encontrarse en el mismo exón del ARNm, para que los amplicones sean idénticos a partir de ADNc o ADN genómico.

3.2 TIPOS DE TRÁNSCRITOS PRODUCIDOS

Tal y como habían descrito Lenasi et al. en otros clones latentes, la latencia del promotor del HIV en el clon 27 podría estar siendo debida a su integración en un gen activo, el cual estaría reprimiendo el promotor en el proceso de interferencia transcripcional. Nuestro primer objetivo fue el de observar si se producía transcripción proveniente del gen huésped por encima del promotor viral y en caso afirmativo, estudiar qué tipo de transcritos se estaban formando, tales como transcritos quimeras

entre el gen huésped y el HIV. Para ello, se utilizó como modelo el clon 27 cuya integración había tenido lugar en el intrón entre los exones 8 y 9 del gen UBXD8.

En un primer experimento, se trataron las células del clon 27 con PMA (compuesto que no solo activaba el HIV sino que en combinación con Ionomicina también había sido descrito por Imai et al. (2002) como un activador del gen UBXD8) con el objetivo de ver si este compuesto es capaz de activar el gen UBXD8 en nuestro modelo celular, y se utilizaron las células Jurkat como control. Tras 16 horas con el tratamiento con PMA, se extrajo el ARN de las células del clon 27 y Jurkat, tratadas y no tratadas con PMA, y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos para detectar la expresión del gen UBXD8 (exón 5). Se pudo observar que el gen se activaba en ambas células simplemente con el tratamiento con PMA, aunque la inducción era mayor en las células Jurkat (Figura 16).

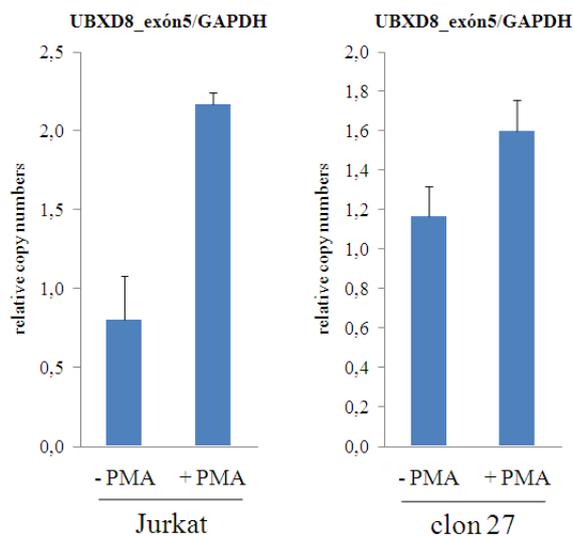


Figura 16. La inducción del gen UBXD8 mediada por PMA se produce en células Jurkat y en el clon 27, aunque en células Jurkat dicha activación es mayor. Las células Jurkat y el clon 27 fueron tratados con PMA durante 16 horas, tiempo tras el cual se extrajo el ARN de las células y se hizo una RT-PCR a tiempo real para detectar la expresión génica de UBXD8. Los resultados se muestran como los valores de amplificación con oligonucleótidos del exón 5 del gen UBXD8 respecto a GAPDH como control externo.

Con la finalidad de conocer los transcritos que se estaban produciendo en el HIV y en sus alrededores en el clon 27, se hicieron una serie de PCRs con el ADNc obtenido del clon 27 sin tratar y tratado con PMA. Para ello se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos presentes en el HIV y en el gen UBXD8 (Figura 17).

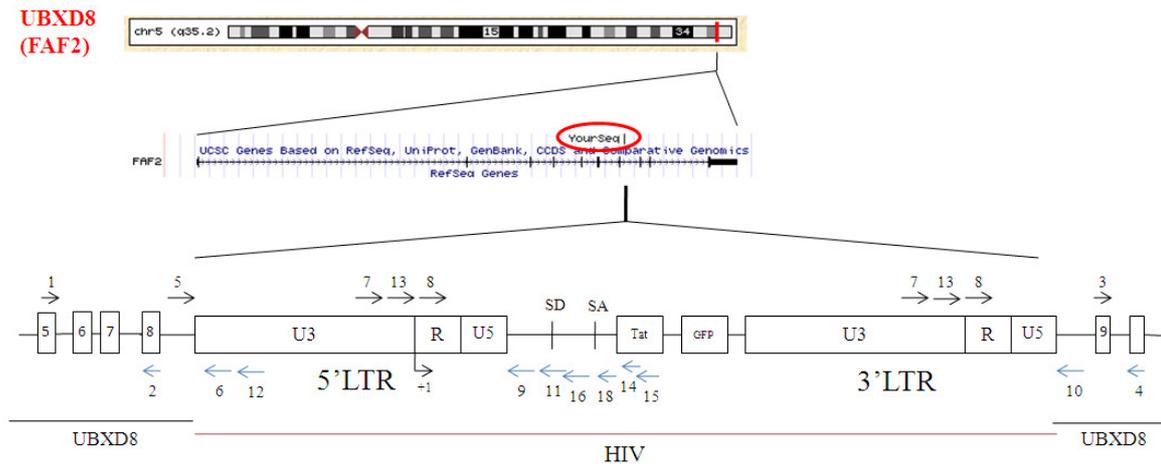


Figura 17. Esquema de los oligonucleótidos utilizados para conocer los transcritos que se están produciendo en el clon 27. Se muestra una representación del cromosoma 5, cromosoma donde se encuentra el gen UBXD8, con su distribución de intrones y exones. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la figura y se nombran con números. Se puede ver la secuencia del HIV (5’LTR-Tat-GFP-3’LTR) y 6 exones del gen UBXD8, 4 de ellos en la zona corriente arriba de la integración del HIV y 2 de ellos, corriente abajo. El +1 del HIV se encuentra localizado al inicio de la región R del LTR viral. SD corresponde a la secuencia del donador de *splicing*, y SA, al aceptor de *splicing*.

Utilizando los oligonucleótidos 1+12 (exón 5 del gen UBXD8+principio de la secuencia U3 del HIV) se observaron dos bandas en cada una de las muestras (+/-PMA) (Figura 18A). Tras la secuenciación de ambas bandas se observó la presencia de un aceptor de *splicing* al principio de la secuencia de U3 en el 5’LTR. La banda inferior observada en esta PCR correspondía a un transcrito que viene del gen UBXD8 y es capaz de reconocer esta secuencia como un aceptor de *splicing*, produciendo un transcrito que es la suma del exón más el U5 a partir de la secuencia aceptor. La banda superior de esta PCR correspondía al transcrito que es el producto de no reconocer el donador de *splicing* al final del último exón anterior a la integración del HIV. Utilizando los oligonucleótidos 7+9 se vio una banda en ambas muestras que correspondía al transcrito que había entrado a la secuencia del HIV a partir de la secuencia del UBXD8 (Figura 18B). La PCR con los oligonucleótidos del GAPDH se muestran en la Figura 18C. Tomando estos resultados en conjunto se puede concluir que tras la integración del HIV en el intrón del gen huésped, una parte de los transcritos que se están produciendo en el UBXD8 pueden entrar en la secuencia del HIV y continuar hasta regiones corriente abajo del HIV, formando transcritos quimera entre el gen y el

HIV (Figura 18D). A parte, hemos visto la presencia de un lugar aceptor de *splicing* al principio de la región U3 del 5'LTR (Figura 18E).

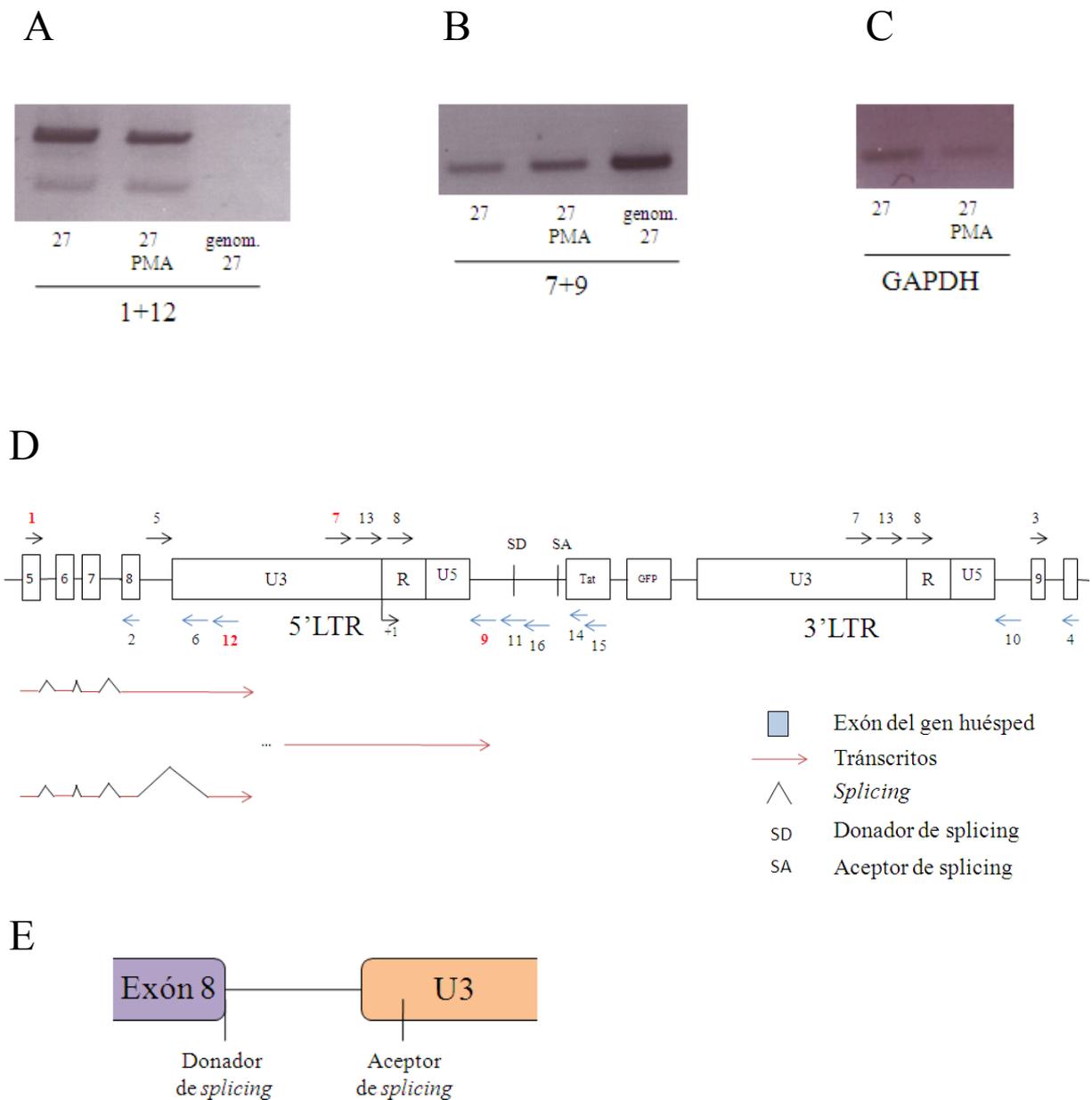


Figura 18. Parte de los transcritos producidos en el gen UBXD8 son capaces de entrar en la secuencia del HIV formando transcritos quimera entre el UBXD8 y el HIV. Las células del clon 27 se trataron con PMA durante 16 horas, periodo tras el cual se extrajo el ARN y se hizo una RT para obtener el ADNc de las células. Se muestran las PCRs obtenidas utilizando dicho ADNc con los oligonucleótidos 1+12 (A), 7+9 (B) y los oligonucleótidos de GAPDH como control de carga (C). (D) Representación de los transcritos formados en esta región. (E) Secuencias relevantes en la región entre el gen endógeno y el 5'LTR del HIV, entre las que destaca la presencia de un lugar aceptor de *splicing* al inicio de la secuencia U3 en el LTR viral.

Posteriormente se utilizaron los oligonucleótidos 13+14, uno de ellos localizado en la región U3 del 5'LTR (anterior al inicio de transcripción teórico del HIV) y el otro en la secuencia de Tat. Esta PCR también detectaría transcritos híbridos provenientes del gen que cruzan el genoma del HIV. En esta PCR se obtuvo una banda mayoritaria en la muestra del clon 27 sin tratar y dos bandas en la muestra con el tratamiento con PMA (Figura 19A). La secuenciación de las bandas mostró que la banda en el clon 27 correspondía a un transcrito que empezaba anterior al +1 del 5'LTR y que se saltaba el donador de *splicing* posterior al 5'LTR. En cambio, en las muestras con PMA se observó la producción de un transcrito que empieza en el gen y que reconoce el donador de *splicing* posterior al 5'LTR pero no el aceptor de *splicing* anterior a Tat, sino que reconoce dos lugares dentro de la secuencia de Tat para llevar a cabo el *splicing* (pseudo-aceptores) produciendo secuencias de Tat truncado (Figura 19B y 19C).

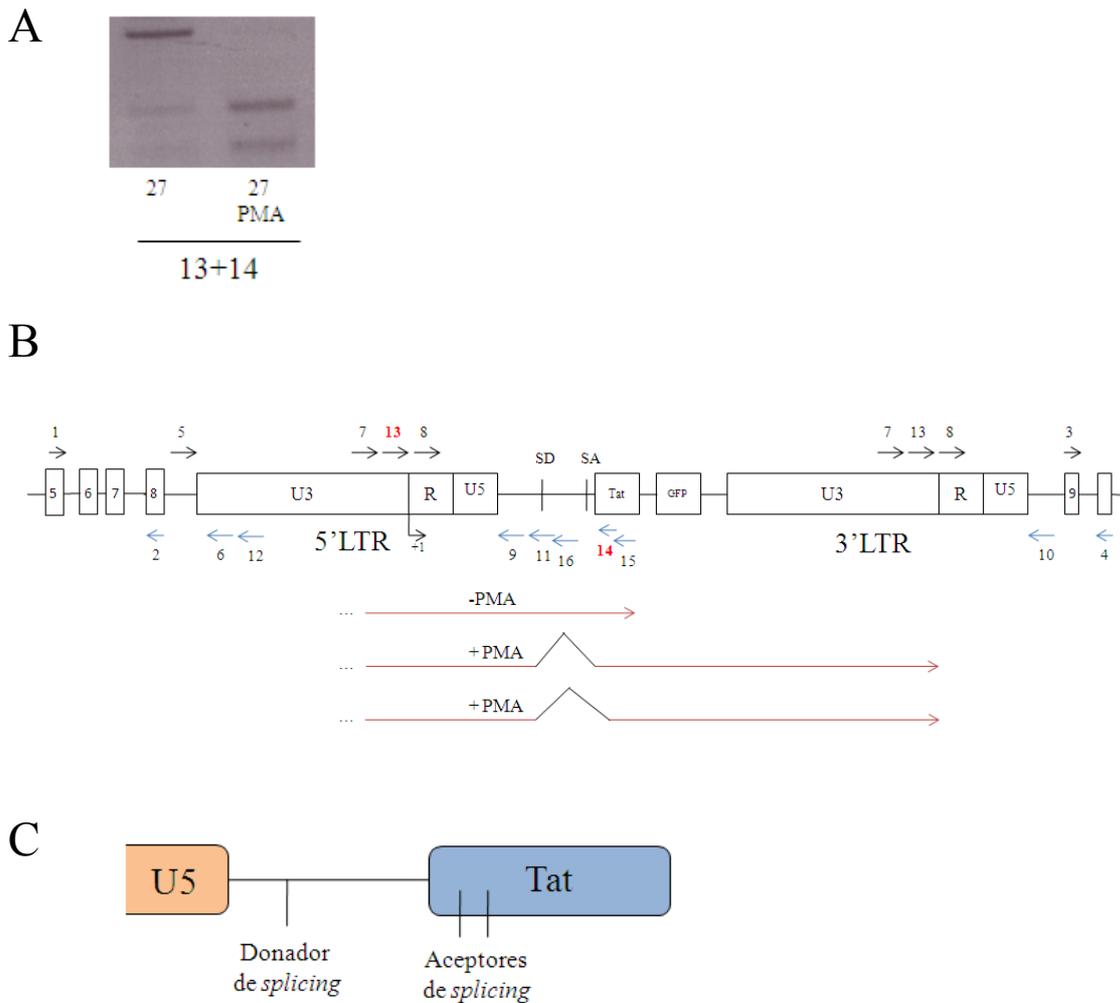


Figura 19. El tratamiento de las células del clon 27 con PMA forma diferentes transcritos quimera provenientes del gen UBXD8. (A) EL ADNc de las células del clon 27 tratadas y sin tratar fue utilizado

en una PCR con los oligonucleótidos 13 y 14. **(B)** Se muestran los transcritos formados utilizando dichos oligonucleótidos. **(C)** Secuencias relevantes entre la región U5 en el 5'LTR del HIV y la secuencia de Tat. Se observaron dos lugares aceptores de *splicing* al inicio de la secuencia de Tat (pseudo-aceptores).

A continuación nos planteamos si se producía el transcrito viral salvaje, proveniente del +1 en la región R del 5'LTR, y si este transcrito estaba haciendo el *splicing* correcto en el donador y aceptor de *splicing* posterior al 5'LTR. Para ello utilizamos los oligonucleótidos 8+16 y 8+18. Pudimos observar en ambos casos el transcrito obtenido con PMA era mayor que sin tratar, activación que se estaba debiendo a la activación del 5'LTR. Al utilizar los oligonucleótido 8 y 16 (éste último situado dentro de la región entre el donador de *splicing* y el aceptor de *splicing*) se observó una banda en la PCR, la cual cosa indicaba que parte de los transcritos no estaban haciendo el *splicing* correcto del transcrito viral (Figura 20A). Por otra parte, al utilizar los oligonucleótidos 8+18 (éste último situado justo tras el aceptor de *splicing*) se producía una banda que correspondía al transcrito viral tras haber hecho el *splicing* correcto (Figura 20B). No se observaba la banda de 1.5Kb que se observa con el ADN genómico que indicaría ausencia de *splicing*. Por tanto, los transcritos virales eran capaces de transcribir desde el +1 del 5'LTR, tanto haciendo el *splicing* correcto como saltándose las señales de donador y aceptor de *splicing* (Figura 20C).

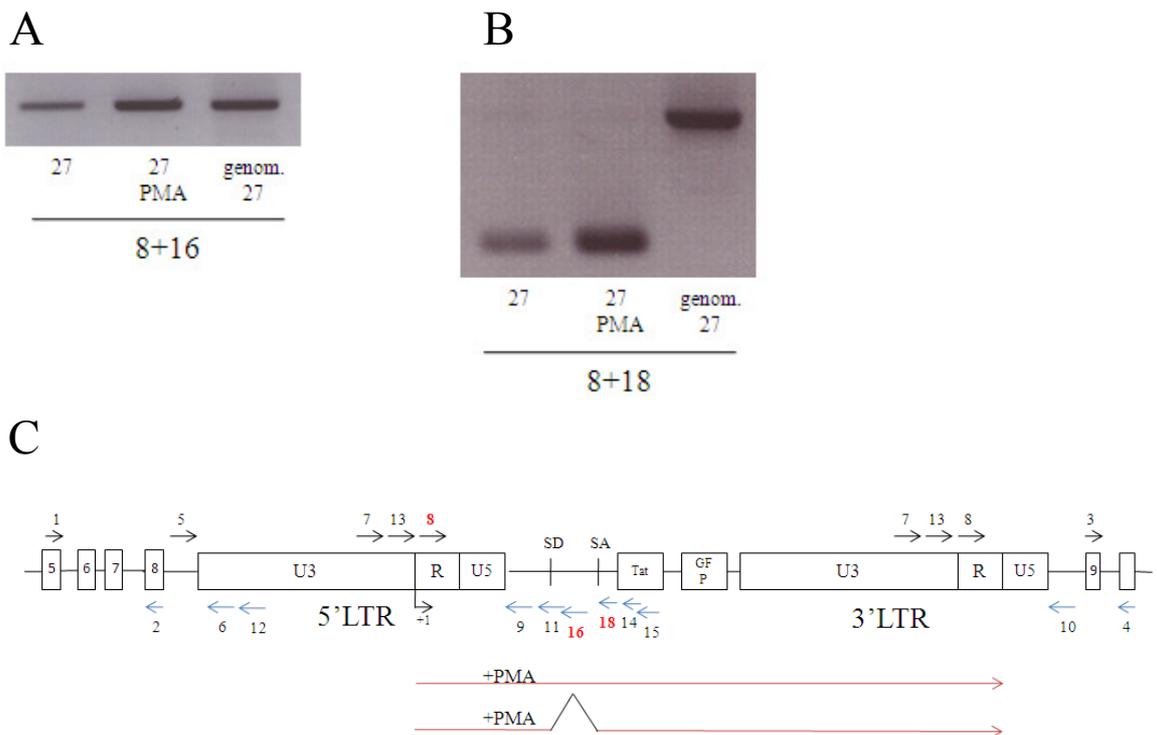


Figura 20. Tras la inducción con PMA se detecta un aumento de transcritos virales que reconocen o no reconocen las secuencias de donador y aceptor de *splicing* situadas tras el 5’LTR. El ADNc de las muestras del clon 27 sin tratar y tratado con PMA se usaron con los oligonucleótidos 8+16 (A) y 8+18 (B). (C) Representación de los transcritos formados en esta región de la secuencia del HIV. “+PMA” indica que el transcrito se induce con este tratamiento.

El hecho que observáramos transcritos empezando en el gen UBXD8 y continuando en la región del HIV pasando la región donde se encuentra el +1 del 5’LTR nos hizo plantear qué cantidad de estos transcritos quimera (ya sean los que hacen un *splicing* correcto o no, véase Figura 19B) en relación a los transcritos virales salvajes se estaban produciendo. Con tal fin se hizo una PCR a tiempo real con los oligonucleótidos 7+9 (transcritos que provienen del gen UBXD8) y 8+9 (suma de los transcritos que provienen del gen más los virales que se producen en el +1 del 5’LTR) (Figura 21A). Se utilizó el ADNc de las muestras 27, con o sin tratamiento de PMA, y usando el ADN genómico con ambos pares de oligonucleótidos para poder normalizar las PCRs y poder comparar las cantidades de transcritos. El resultado mostró que la cantidad de transcritos que vienen del gen UBXD8 era inferior a los transcritos virales que se producían a partir del +1 del LTR, sobre todo tras la estimulación con PMA (Figura 21B)

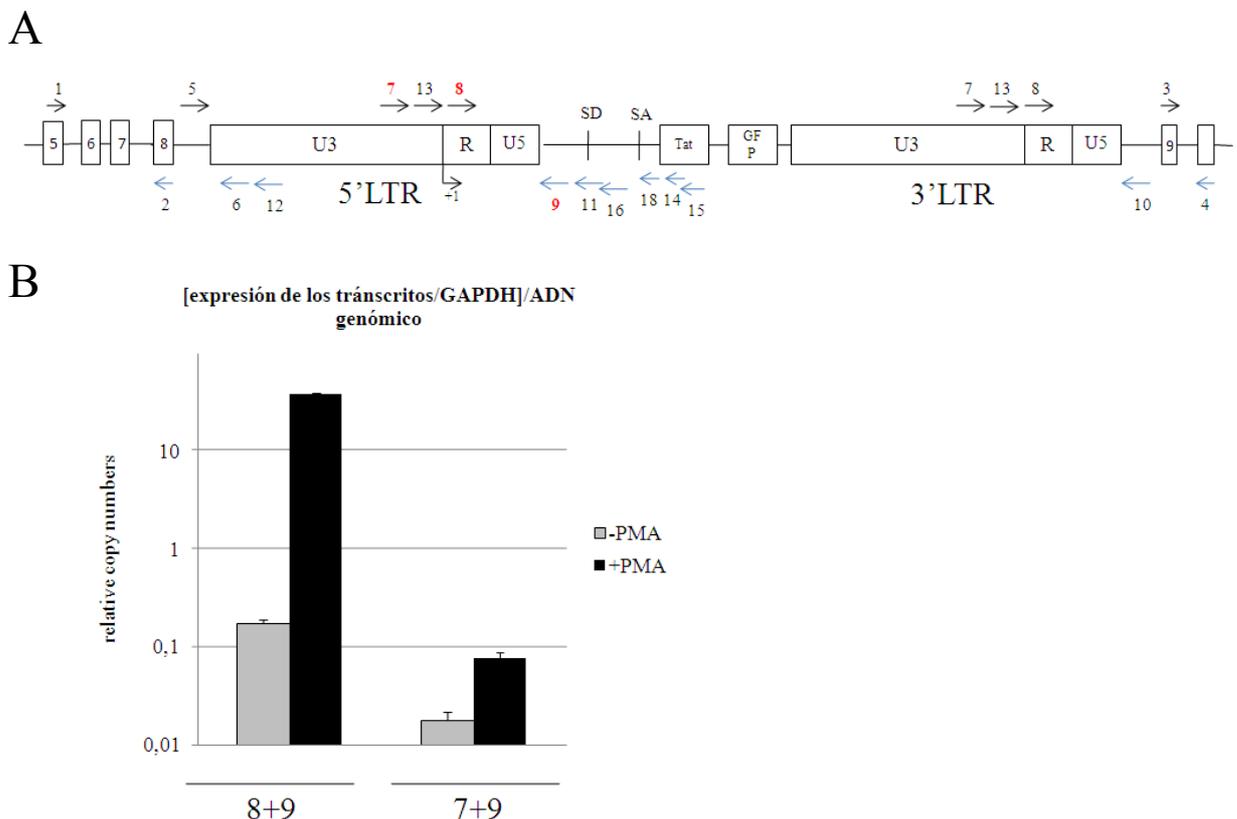
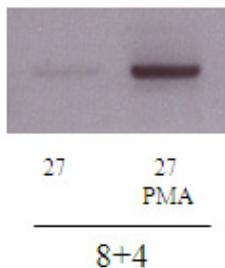


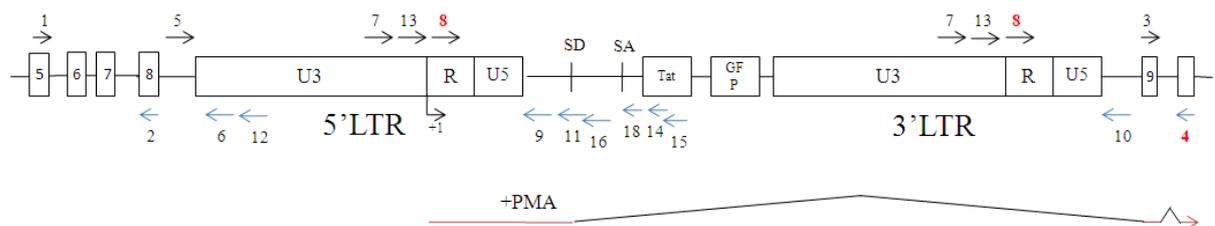
Figura 21. Los transcritos virales originados en el promotor del HIV son más abundantes que los transcritos provenientes del gen UBXD8. (A) Representación de los oligonucleótidos 7+9 y 8+9 utilizados en el experimento. **(B)** El ADNc de las muestras del clon 27 sin tratar y tratado con PMA se usaron en una RT-PCR a tiempo real, y utilizando el ADN genómico para normalizar las muestras. Los resultados se muestran como los valores obtenidos con las muestras de ADNc con los oligonucleótidos específicos en relación al GAPDH y todo ello en relación a los valores de ADN genómico. Los resultados se muestran en una escala logarítmica.

Posteriormente, se realizó una PCR con los oligonucleótidos 8+4, uno en la región R del LTR y el otro en el exón 10 tras la secuencia integrada del HIV. El resultado mostró una banda que se inducía de forma muy importante con la presencia de PMA, banda que fue secuenciada (Figura 22A). La secuenciación reveló que el transcrito que se estaba produciendo en dicha PCR empezaba en el +1 del 5'LTR, reconocía el donador de *splicing* posterior al 5'LTR pero el aceptor de *splicing* que reconocía era el del primer exón del UBXD8 posterior a la integración del HIV (Figura 22B y 22C). Nos planteamos el hecho que se pudiera estar formando una proteína truncada del gen UBXD8 la cual sería más corta que la proteína salvaje y que podría tener un efecto dominante negativo sobre la función de ésta, pero el hecho que la posible proteína truncada que se formaría no se encontraba en la misma fase de lectura que la proteína salvaje nos hizo descartar dicha posibilidad.

A



B



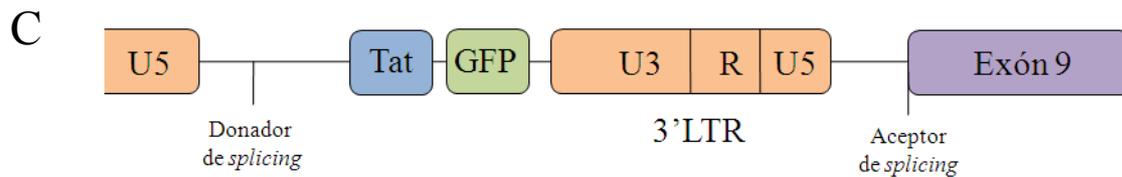


Figura 22. Tras el tratamiento con PMA se produce un transcrito quimera entre el HIV y la secuencia del UBXD8 inmediatamente posterior a la integración del promotor. (A) El ADNc de las muestras del clon 27 sin tratar y tratado con PMA se usaron con los oligonucleótidos 8+4 (B) Representación del transcrito formado en esta región. “+PMA” indica que el transcrito se induce con este tratamiento. (C) Se muestran las posiciones del donador y aceptor de *splicing* que se utilizan para obtener este tipo de transcrito descrito.

Por último, se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos 7+10 y 8+10, estando el oligonucleótido 10 en el intrón inmediatamente posterior a la integración del HIV. 7 y 8 son los oligonucleótidos previo y posterior al +1 del LTR, respectivamente. La PCR mostró amplificación en ambos casos, siendo esta amplificación mayor tras el tratamiento con PMA de las células (Figuras 23A y 22B). La PCR 7+10 mostraba la presencia de transcritos que se venían formando desde la región del 5’LTR o desde el gen pero no se detenían en la región del poli-A presente en la región R del 3’LTR sino que seguían a través de dicho LTR (Figuras 23A y 23C). La PCR 8+10 también nos podía sugerir una posible actividad transcripcional empezando en el 3’LTR, aunque dicha banda sería la suma de los transcritos formados en el 5’LTR que no se detendrían en la región poli-A más los transcritos que empezarían en el 3’LTR. En ambos casos se da lugar a un transcrito quimera que es la suma entre la región R+U5+ el intrón posterior a la integración del HIV (Figuras 23B y 23C). Con el fin de cuantificar la transcripción desde el 3’LTR se llevó a cabo una PCR a tiempo real con oligonucleótidos 7+10 y 8+10 en el ADNc del clon 27 con y sin tratar con PMA, y con el ADN genómico para poder normalizar los datos y ser capaces de comparar cantidades de transcrito con diferentes oligonucleótidos. El hecho de observar una mayor cantidad de transcritos obtenidos con los oligonucleótidos 8+10 tras la inducción con PMA (suma de los transcritos provenientes del 5’LTR o del gen huésped más los provenientes de la función promotora del 3’LTR) en comparación con los obtenidos en igual condiciones con los oligonucleótidos 7+10 (transcritos provenientes del 5’LTR o del gen huésped), mostraba la existencia de una función promotora del 3’LTR. Al igual que

el 5'LTR esta función promotora en el 3'LTR era capaz de estimularse con PMA, aunque la cantidad de transcritos era menor (Figura 23D, véase Figura 21B).

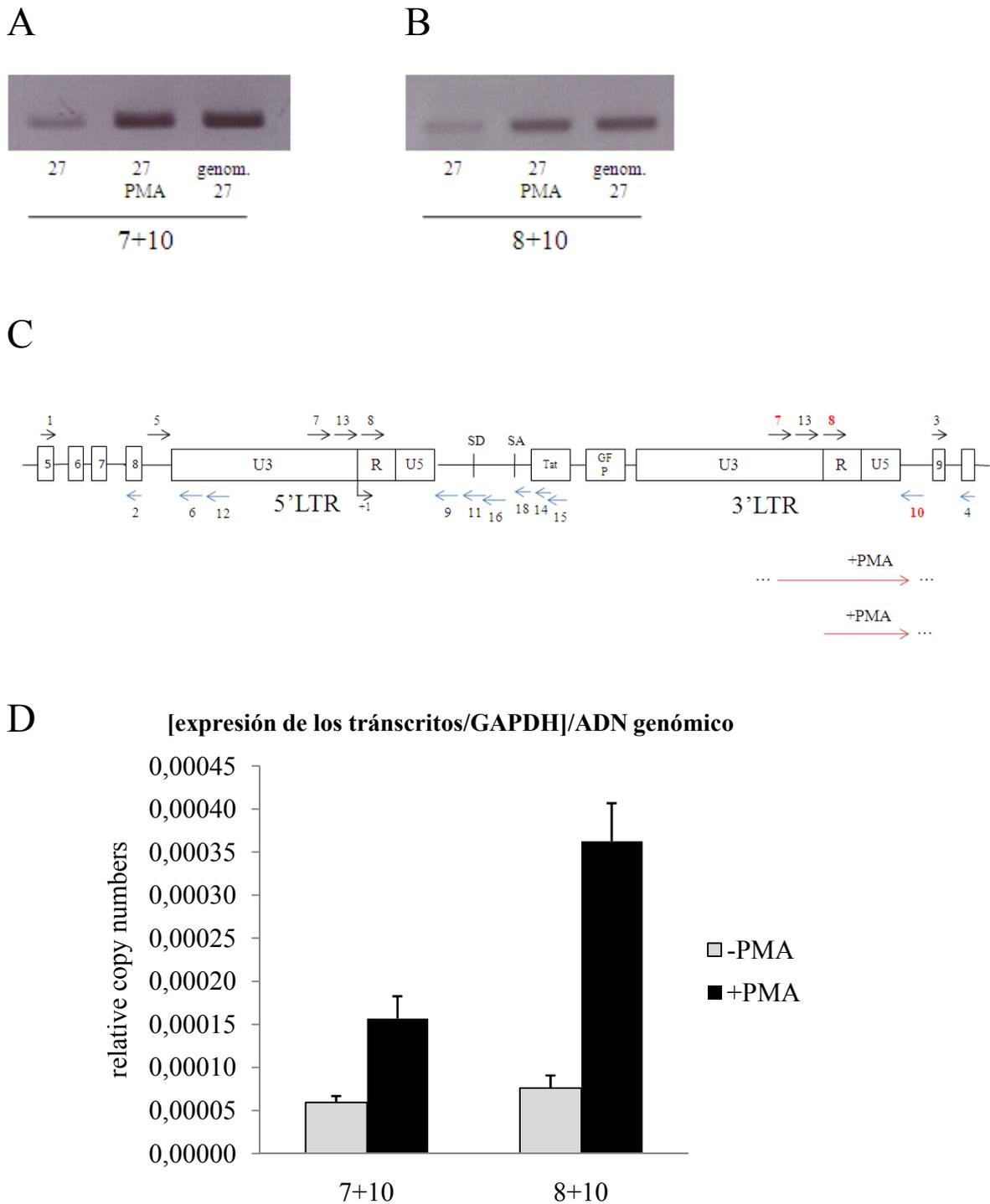


Figura 23. Tras el tratamiento con PMA se produce una activación de la región promotora localizada en el 3'LTR, además de que no todos los transcritos provenientes del 5'LTR se detienen en la región del poli-A. (A) (B) El ADNc del clon 27 tratado y sin tratar con PMA fue usado en una PCR con oligonucleótidos 7+10 (apartado A) y 8+10 (apartado B) (C) Representación de los transcritos que se forman en la región del 3'LTR mayoritariamente tras la inducción con PMA de las células. Los

oligonucleótidos utilizados en el experimento se muestran en la figura. “+PMA” indica que el transcrito se induce con este tratamiento. **(D)** La cuantificación de la transcripción desde el 3’LTR fue llevada a cabo mediante PCR a tiempo real con las muestras de ADNc y utilizando ADN genómico para poder normalizar las muestras.

Utilizando toda esta serie de PCRs se pudo comprobar que se están generando transcritos quimera formados en parte por la secuencia del UBXD8 y en parte por la secuencia viral. Aún así, parece ser que la proporción de transcritos provenientes del gen UBXD8 y que pasarían a través del HIV son minoritarios comparando con los transcritos virales que se producen (véase Figura 19B), la cual cosa podría indicar que dichos transcritos no tienen un papel muy relevante dentro de la célula. El hecho que hubiera una cantidad mucho mayor de transcritos quimera entre el gen y el HIV posiblemente produciría una disminución de los transcritos salvajes de UBXD8.

3.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS TRÁNSCRITOS OBSERVADOS

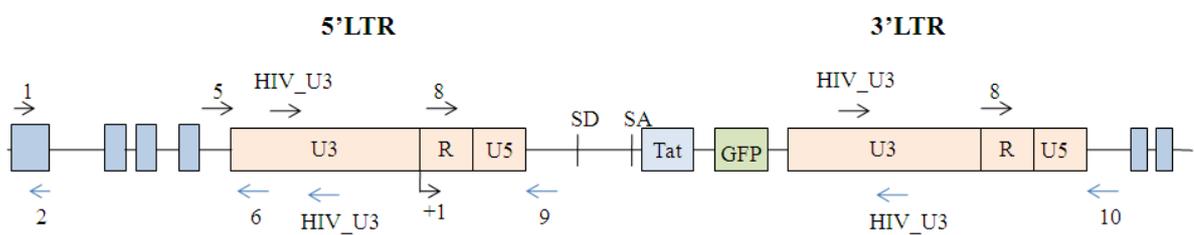
3.3.1. Transcritos producidos en el promotor viral y en los alrededores de la integración

Nuestro siguiente objetivo en este estudio consistió en cuantificar la abundancia de los transcritos representantes de las distintas regiones exónicas e intrónicas del gen huésped UBXD8 o del genoma viral integrado en el intrón de dicho gen (entre exón 8 y 9), mediante pares de oligonucleótidos específicos. Con el fin de poder inducir de manera específica el HIV en las células del clon 27, se decidió usar otros tratamientos diferentes a PMA los cuales no fueran capaces de activar el gen UBXD8 y nos permitieran ver el efecto de estos inductores en el HIV. Los tratamientos escogidos fueron el TNF α y el HMBA (hexametileno bisacetamida). El TNF es un compuesto descrito como un inductor del HIV a nivel de iniciación, en cambio el HMBA es un compuesto capaz de inducir el HIV a nivel de elongación, debido a que activa vías de señalización que acaban en el reclutamiento de pTEFb en el promotor del HIV (Contreras et al. 2007). Así pues, las células del clon 27 fueron tratadas con TNF y HMBA durante 24 horas, periodo tras el cual se extrajo el ARN y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos. Los oligonucleótidos elegidos nos permitían detectar la expresión del gen UBXD8 anterior a la integración del HIV como medida de la expresión del promotor del gen, así como transcritos híbridos entre un intrón y el 5’LTR

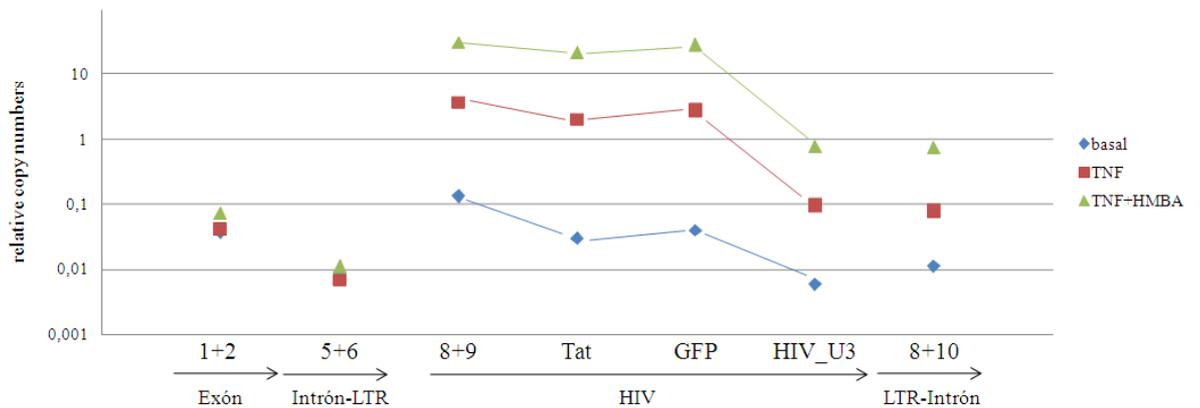
viral (expresión del provirus desde el promotor génico), transcritos virales desde su propio promotor con 4 amplicones diferentes (región LTR-gag, Tat, GFP, región U3 del 3'LTR) y transcritos desde el 3'LTR hacia la región intrónica del gen, posterior a la integración del HIV (Figura 24A). Como ya se ha hecho anteriormente, para poder comparar los datos obtenidos con oligonucleótidos diferentes, cada valor se puso en relación al valor obtenido de la amplificación con el mismo par de oligonucleótidos con un ADN genómico usado como estándar. Los resultados en el estado basal de las células mostraron que los transcritos quimera formados entre el gen UBXD8 y el HIV (tanto los formados entre el gen y el 5'LTR como los formados entre el 3'LTR y el gen) son menos abundantes que el transcrito proveniente del promotor génico, cuantificado con oligonucleótidos en un exón anterior a la integración (Figura 24B). También se observó que la expresión basal del promotor viral es considerable, comparable a la del gen endógeno, cuando se analiza una región próxima al lugar de iniciación de la transcripción. Estos niveles de transcrito disminuyen al analizar las regiones posteriores del provirus (Tat, GFP y el 3'LTR, en especial esta última región). Cabe mencionar que los transcritos virales de longitud completa, que en el caso del clon 27 a nivel basal son muy reducidos, son los que determinan que se expresen o no las proteínas Tat y GFP, y por tanto los que determinan la definición de latencia. En las células que fueron inducidas con TNF o TNF+HMBA se pudo observar la estimulación de los transcritos que representan todas las regiones del provirus, pero aun así se puede apreciar que hay un bloqueo de la elongación que hace que la región terminal del 3'LTR esté menos representada. Esta estimulación con los compuestos es capaz de producir una mayor cantidad de transcritos quimera entre la región 3'LTR y el intrón génico posterior a la integración del HIV (Figura 24B). Con el fin de conocer la activación del promotor del HIV a nivel tanto de porcentaje de GFP como de intensidad de fluorescencia de la GFP (*Median Fluorescence Intensity* o MFI), las células del clon 27 fueron tratadas con TNF, HMBA y una combinación de ambas durante 24 horas. Tras analizar las células en el citómetro de flujo se pudo observar que las células se reactivaban mediante ambos compuestos por separado y la inducción era mayor tras la combinación de TNF y HMBA (Figura 24C). Sorprendentemente, el HMBA por sí solo podía activar el promotor del HIV, aunque había sido descrito como un activador de la elongación (Contreras et al. 2007). En dicho estudio, el tratamiento con HMBA del clon 8.4 no era capaz de reactivar el promotor del HIV latente si no se combinaba con un factor activador de la iniciación como el TNF, pero en las células del clon 27 este compuesto

no necesitaba ningún otro tratamiento para poder ser activo. Esto podría explicarse debido a que se observaron niveles basales altos del transcrito iniciado en la región del 5'LTR (aunque dicho transcrito disminuya en la zona de la elongación), la cual cosa facilitaría la función del HMBA en su papel de elongación. Por último, mediante experimentos similares de cuantificación de transcritos virales, utilizando las células de la población heterogénea latente se ha podido apreciar que los transcritos tienen un comportamiento similar por lo que se refiere a disminución de la expresión del provirus tras la iniciación (Figura 24D).

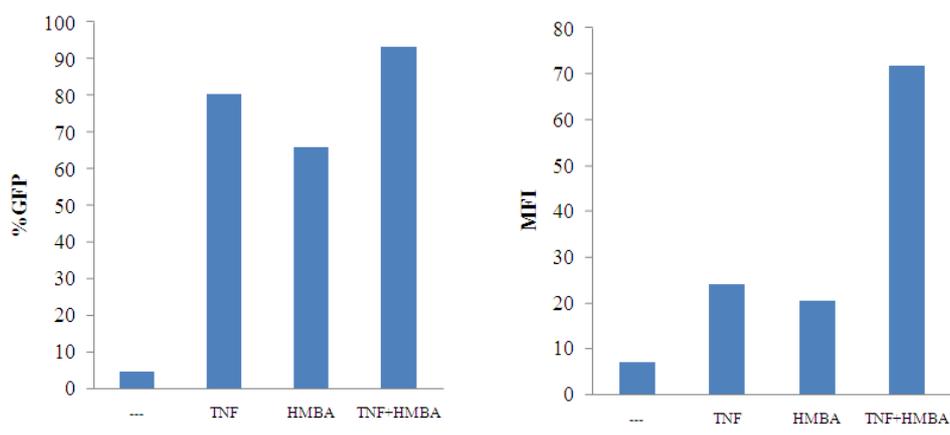
A



B



C



Tratamientos en el clon 27

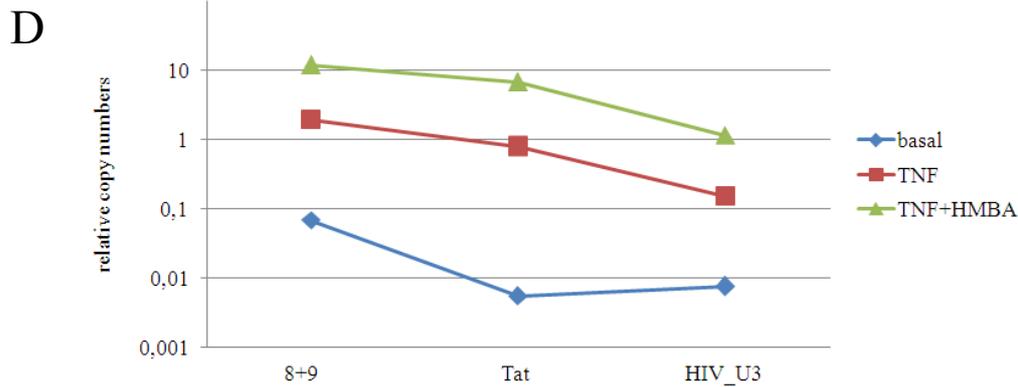


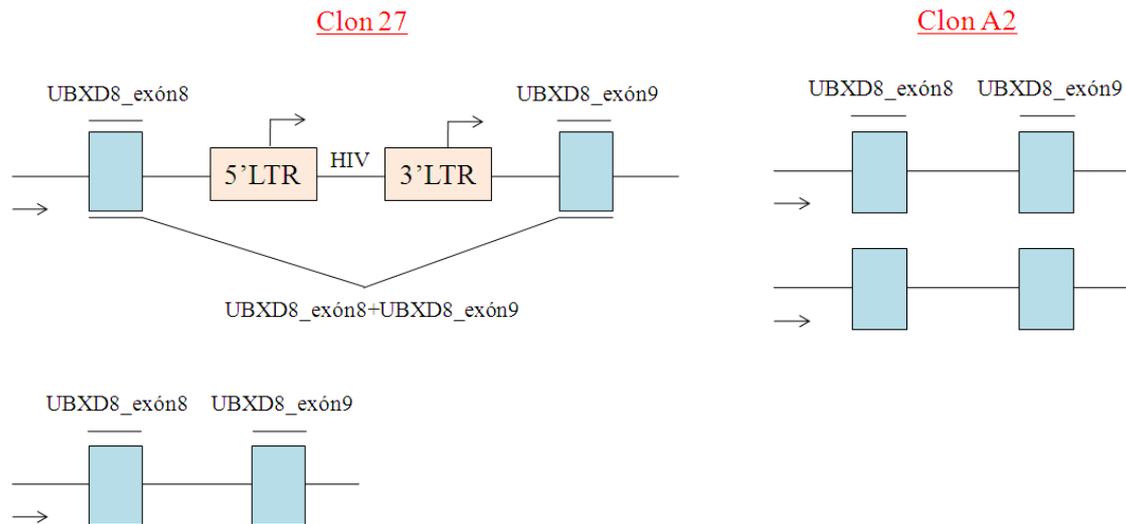
Figura 24. Cuantificación de transcritos producidos en el clon 27 y sus cambios tras la inducción con TNF y HMBA. (A) Representación esquemática de los oligonucleótidos utilizados para conocer los transcritos que se producen en el HIV y en sus alrededores, así como los transcritos quimera entre el gen endógeno y la secuencia del HIV. (B) Las células del clon 27 fueron tratadas con TNF (10ng/ml) o TNF y HMBA (10mM) durante 24 horas. El ARN de las células se extrajo y se usó para hacer una RT-PCR a tiempo real utilizando los oligonucleótidos presentes en el gen endógeno y en el HIV. Se muestran los valores en escala logarítmica, representándose los valores obtenidos con los oligonucleótidos en el ADNc en relación al GAPDH y todo ello en relación al valor del amplicón obtenido con ADN genómico. La amplificación con oligonucleótidos 1+2 no está corregida por los dos alelos del gen UBXD8. Se muestra un ejemplo representativo de dos experimentos independientes. (C) Se trató el clon 27 con TNF, HMBA o una combinación de ambos durante 24 horas y tanto el porcentaje de expresión de GFP (C, izquierda) como la intensidad de fluorescencia o MFI (C, derecha) fueron analizados mediante el citómetro de flujo. Se muestra un ejemplo representativo de al menos 3 experimentos. (D) La población heterogénea latentemente infectada fue tratada con TNF o TNF+HMBA durante 24 horas. Se utilizó el ARN de las células para obtener el ADNc y hacer una serie de PCRs a tiempo real con los oligonucleótidos de la región del transcrito viral. Los resultados se muestran en relación al ADN genómico usando igual pares de oligonucleótidos.

3.1.2. La integración del HIV afecta la expresión del gen huésped UBXD8

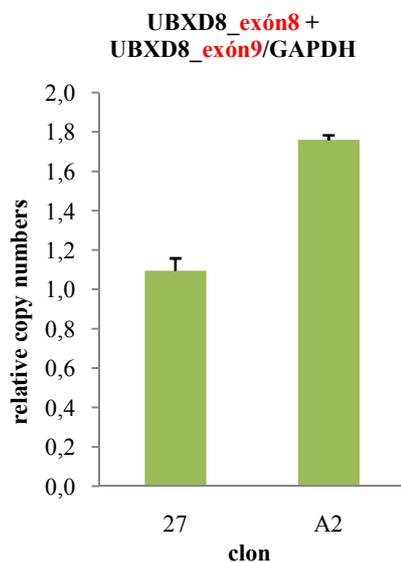
A continuación estudiamos el efecto que tiene la integración del HIV sobre la expresión de los genes humanos donde se ha producido dicha integración. Para ello se utilizaron tres PCRs para el gen UBXD8 donde se halla integrado el HIV en el clon 27 y utilizando el clon A2 como control ya que tiene los dos alelos de este gen intactos. Estas PCRs cubren el exón 8 justo antes de la integración, el exón 9 inmediatamente después de la misma y una última PCR utilizando un oligonucleótido en el exón 8 y otro en el 9 (Figura 25A). Al utilizar la combinación de los oligonucleótidos en los exones 8 y 9, pudimos observar que en el clon 27 se estaban produciendo una menor cantidad de transcritos salvajes del gen UBXD8 (transcritos que producían el procesamiento de

splicing correcto), al comparar con el clon A2, supuestamente debido a la integración del HIV dentro de este gen (Figura 25B). Al comparar la expresión de los transcritos del gen UBXD8 en el exón 8 y en el exón 9, se pudo ver que tras la inducción de la expresión del HIV con TNF la región exónica anterior a la integración del promotor en el gen disminuía su expresión, probablemente debido a algún tipo de represión negativa del gen huésped tras la activación del promotor del HIV (Figura 25C, izquierda). Al mirar la expresión del exón justamente posterior a la integración del HIV (exón 9), se observó que se producía un aumento de los transcritos conteniendo dichas regiones exónicas, probablemente debido a la activación del promotor presente en el 3'LTR y, en menor medida, a los transcritos proveniente del 5'LTR que no se detienen en la región poli-A del 3'LTR (Figura 25C, derecha).

A



B



C

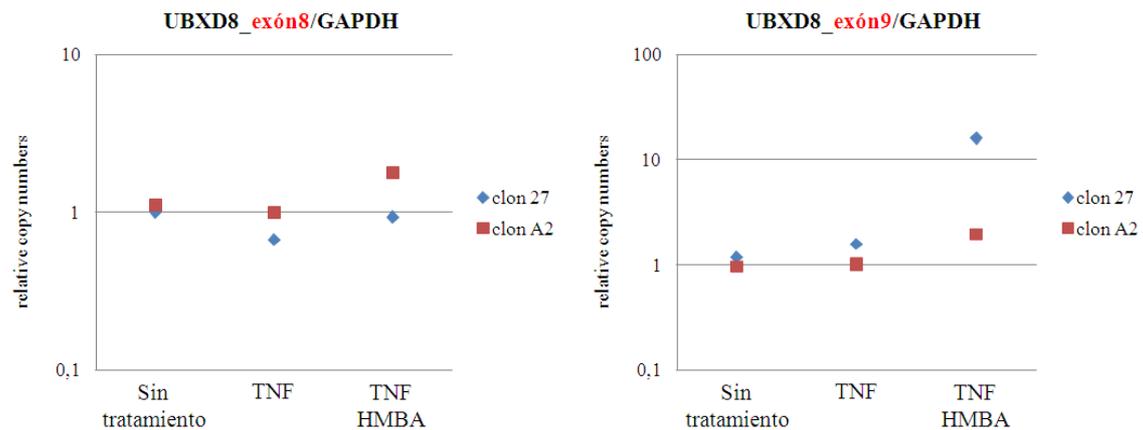


Figura 25. La integración del promotor del HIV en genes activos afecta a su expresión. (A) Representación de los oligonucleótidos utilizados en el experimento, los cuales representan los transcritos presentes antes del lugar de integración del promotor del HIV en el clon 27 (exón 8), los transcritos posteriores a dicha integración (exón 9) o una combinación de un oligonucleótido en el exón 8 y otro en el exón 9 para detectar los transcritos salvajes de UBXD8. **(B)** El ADNc de las muestras de los clones 27 y A2 fue utilizado en una PCR a tiempo real con la combinación de oligonucleótidos del exón 8 y el exón 9 con el fin de detectar el transcrito salvaje del gen. Los resultados se muestran como los valores del par de oligonucleótidos en relación al GAPDH. **(C)** El ARN de las células de ambos clones tras el tratamiento con TNF y TNF+HMBA fue utilizado para hacer una RT-PCR a tiempo real con los oligonucleótidos UBXD8_exón8 y UBXD8_exón9. Los valores se pusieron en relación al GAPDH como control de carga.

4. Relación entre los transcritos virales y los generados por el gen donde se ha integrado el genoma del HIV: HIV en el gen UTX en sentido contrario al de la transcripción del gen

4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HUÉSPED

Tal y como habíamos descrito para el clon 27, en este apartado nos propusimos conocer, aunque en menor detalle, el tipo de transcritos que se estaban produciendo en el clon A2, clon cuya integración del HIV se había dado en el gen UTX en sentido contrario al de dicho gen. El primer asunto a conocer fue si el gen UTX se estaba expresando constitutivamente en estas células. Para ello, se compararon los niveles de expresión de los genes UBXD8, CXCR4 (activo en Jurkat), PCAF (reprimido en Jurkat), y el propio UTX, mediante la extracción de ARN seguida de una RT-PCR a tiempo real, utilizando el ADNc del clon A2, así como el ADN genómico del mismo clon para poder normalizar las muestras y poder comparar entre oligonucleótidos (RT-DNA-qPCR). Los datos mostraron que el gen UTX tenía niveles de expresión similares al gen UBXD8, mayores que PCAF y menores que CXCR4. Esto parecía indicar que el gen UTX está activo transcripcionalmente (Figura 26).

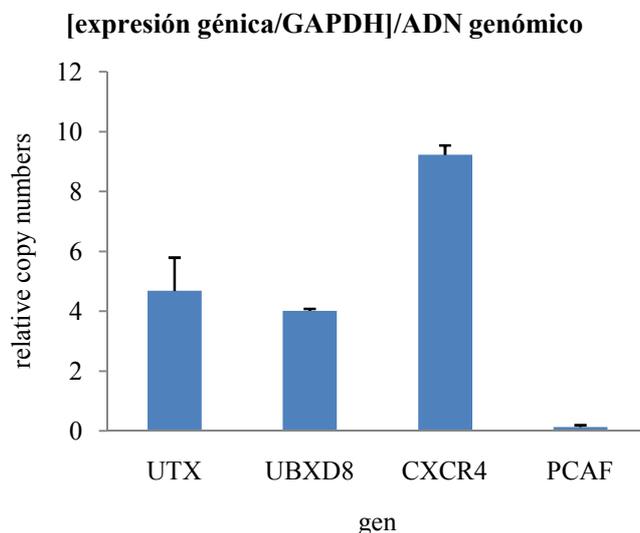


Figura 26. El gen UTX es transcripcionalmente activo en células del clon A2. El ARN de las células del clon A2 se extrajeron y se usó para hacer una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos para los genes UTX (exón 1), UBXD8, CXCR4 y PCAF. Los resultados se muestran como los valores en relación a GAPDH y todo ello en relación al valor de la PCR a tiempo real con el ADN genómico del clon A2.

4.2 TIPOS DE TRÁNSCRITOS PRODUCIDOS

Con el fin de poder conocer los transcritos que se estaban produciendo en las células del clon A2 en la secuencia del HIV y en los alrededores de la integración del HIV en el gen UTX, se utilizaron una serie de oligonucleótidos en la secuencia del gen huésped y en la secuencia viral (Figura 27). Para estudiar dichos transcritos, se trataron las células del clon A2 con PMA durante 16 horas y se extrajo el ARN, el cual fue utilizado en una RT-PCR con los oligonucleótidos previamente mencionados.

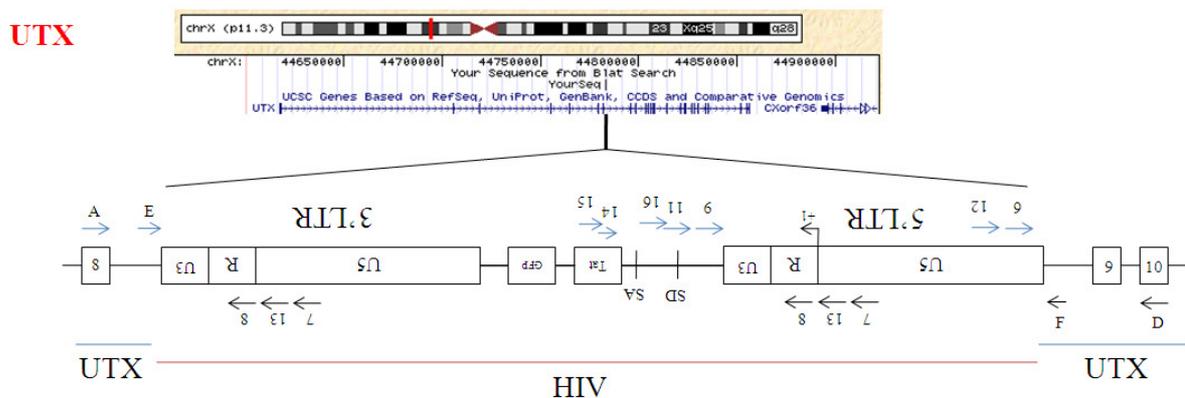


Figura 27. Representación esquemática de la región del gen UTX donde se encuentra integrado el HIV en el clon A2. En el clon A2, el HIV se encuentra insertado en un intrón del gen UTX, integración que se encuentra en sentido contrario de la transcripción del gen. Se muestran los oligonucleótidos tanto del HIV como de los exones e intrones de los alrededores de la integración.

Utilizando los oligonucleótidos A+D, uno de ellos en el exón inmediatamente anterior a la integración del HIV y el otro en los exones posteriores, se pudo observar bandas en las muestras del clon A2 tratadas y sin tratar (Figura 28A). La PCR de GAPDH nos sirvió de control de carga de la PCR (Figura 28B). Teniendo en cuenta que el gen UTX se encuentra en el cromosoma X y que solo hay una copia de este gen (las células Jurkat provienen de un donante masculino), la amplificación observada con estos oligonucleótidos se estaba dando a partir del gen UTX con la integración del HIV. Las bandas corresponden al transcrito que ha producido un *splicing* correcto entre los exones anteriores y posteriores al HIV, ya que tienen el tamaño esperado. No se podría obtener una banda de la PCR con el HIV integrado debido al gran tamaño de la secuencia que debería amplificarse (Figura 28C).

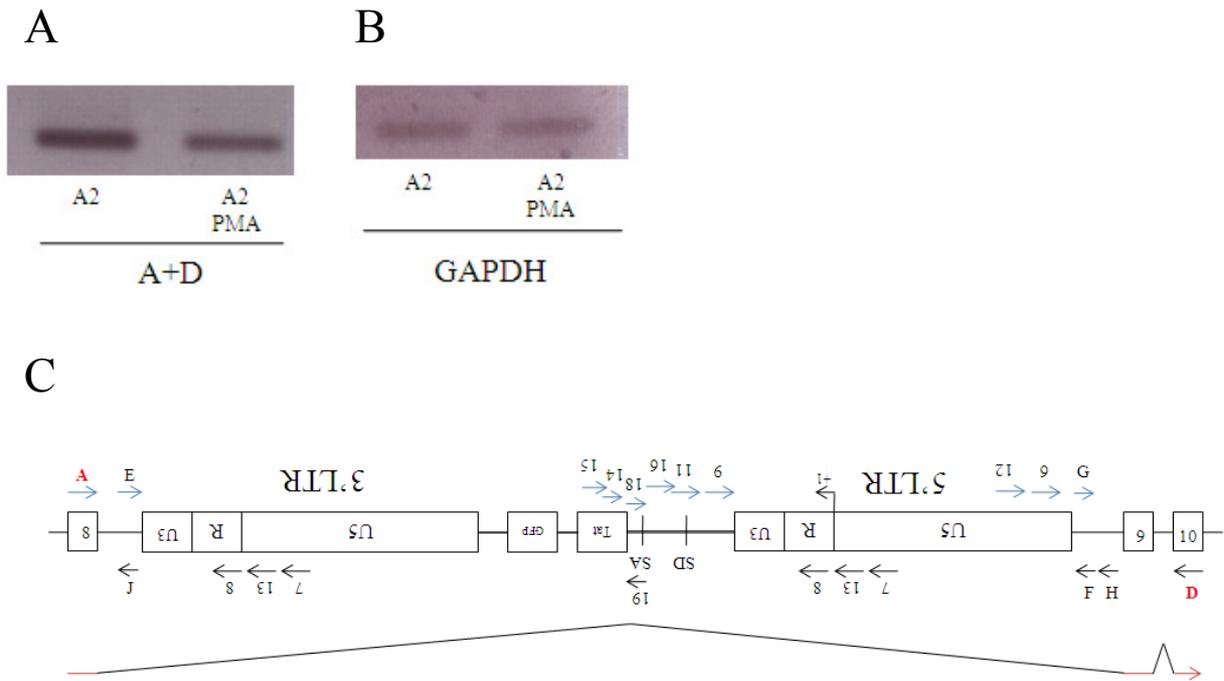
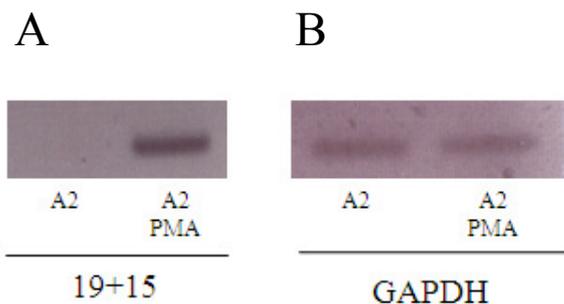


Figura 28. Se puede detectar la presencia de transcrito salvaje del gen UTX en el clon A2. **(A)** El ADNc de las muestras del clon A2 tratado y sin tratar con PMA fue utilizado en una PCR con los oligonucleótidos A+D, en los exones previos y posteriores a la integración del HIV. **(B)** El GAPDH con las mismas muestras se presenta como control de carga. **(C)** Representación del transcrito salvaje que se está produciendo en el clon A2 a pesar de la integración del HIV en su genoma.

A continuación, se realizó una PCR con los oligonucleótidos 19+15, PCR que era representativa de la expresión del 5’LTR del HIV. Se pudo observar que solo en la muestra tratada con PMA se obtenía banda, la cual cosa indicaba que efectivamente se estaba produciendo transcritos empezando en el promotor del HIV al inducir las células (Figura 29A). Se utilizaron los oligonucleótidos de GAPDH como control de carga de las muestras (Figura 29B). Se comprobó también la expresión del promotor mediante los oligonucleótidos 8+9 utilizando una PCR a tiempo real. Los resultados mostraron una inducción del promotor situado en el 5’LTR (Figuras 29C y 29D).



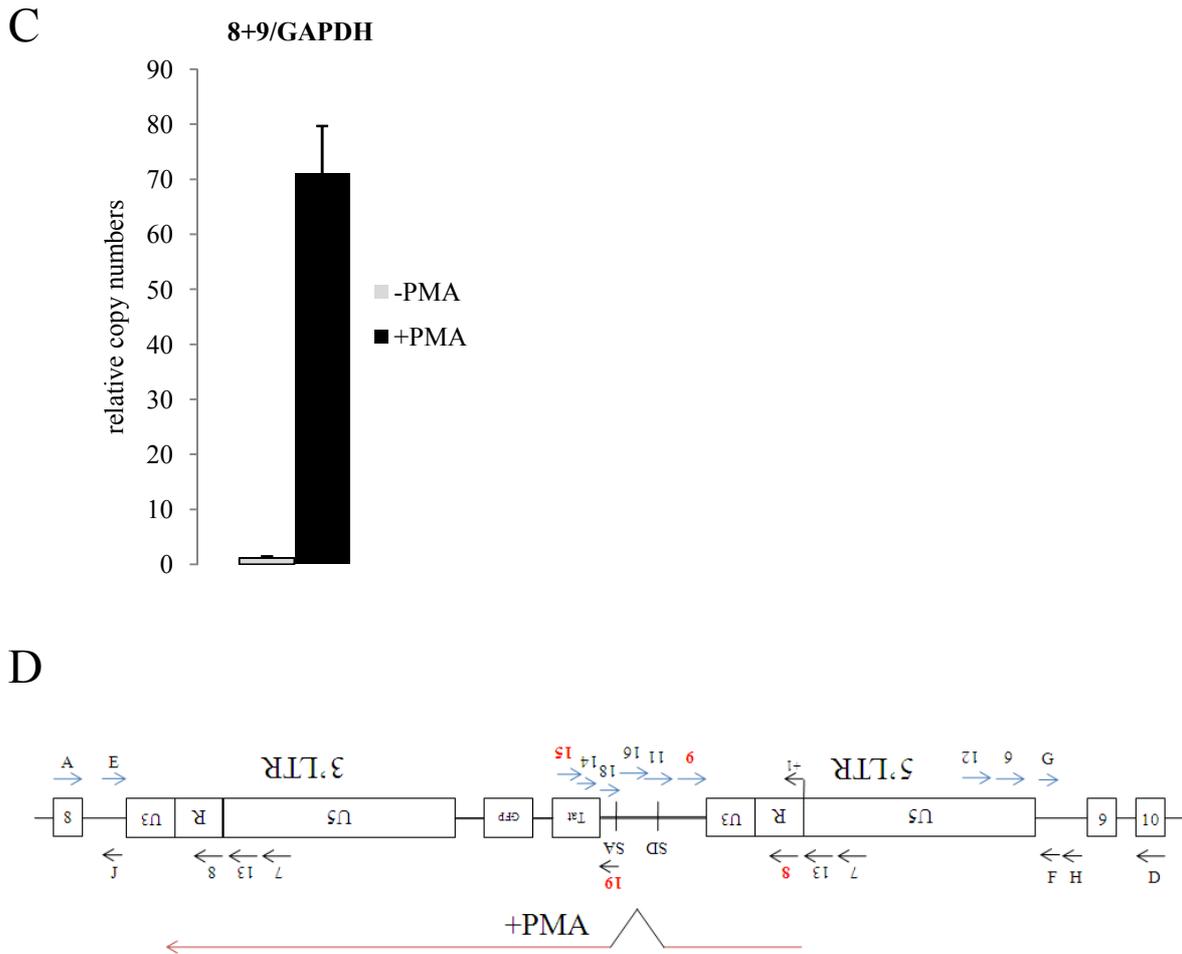


Figura 29. Se producen transcritos virales a partir del promotor situado en el 5'LTR tras la inducción del clon A2 con PMA. (A) El ADNc de las muestras del clon A2 tratado y sin tratar se uso en una PCR con oligonucleótidos 19+15, los cuales permitían ver la expresión del transcrito viral a la altura de Tat (B) Los oligonucleótidos de GAPDH se utilizaron con igual muestras como control de carga (C) La expresión del promotor 5'LTR del virus se detectó mediante una PCR a tiempo real con las muestras del clon A2 tratado y sin tratar y utilizando los oligonucleótidos específicos 8+9. Los resultados se pusieron en relación al GAPDH (D) Representación de los transcritos que se forman utilizando los oligonucleótidos comentados.

Por último, quisimos comprobar si se estaba produciendo un transcrito proveniente del gen UTX y que no estuviera haciendo el *splicing* entre los exones anteriores y posteriores a la integración del HIV. Este hecho demostraría que se está produciendo un transcrito que está pasando a través del HIV. Para ello, se utilizaron 2 combinaciones de oligonucleótidos, A+13, en la región corriente arriba de la integración y G+H, en la región corriente abajo. Ambos casos mostraron la presencia de transcritos, en uno de

ellos se mostró a nivel basal en comparación con el clon 27 (Figura 30A) y en el otro, se mostró transcritos tanto en el clon A2 tratado con PMA como en estado basal (Figura 30C). Las muestras de ADNc de los clones 27 y A2 se utilizaron con los oligonucleótidos de GAPDH como control (Figura 30B). Estas PCRs demostraban la presencia de transcritos que estaba entrando y saliendo de la secuencia del HIV (Figura 30D).

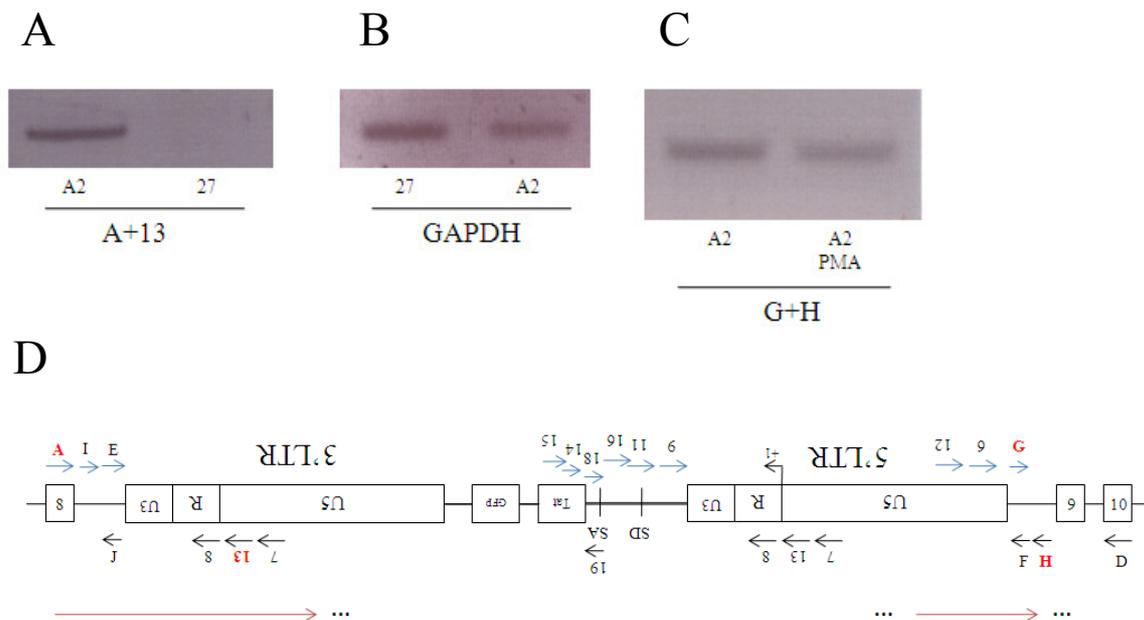
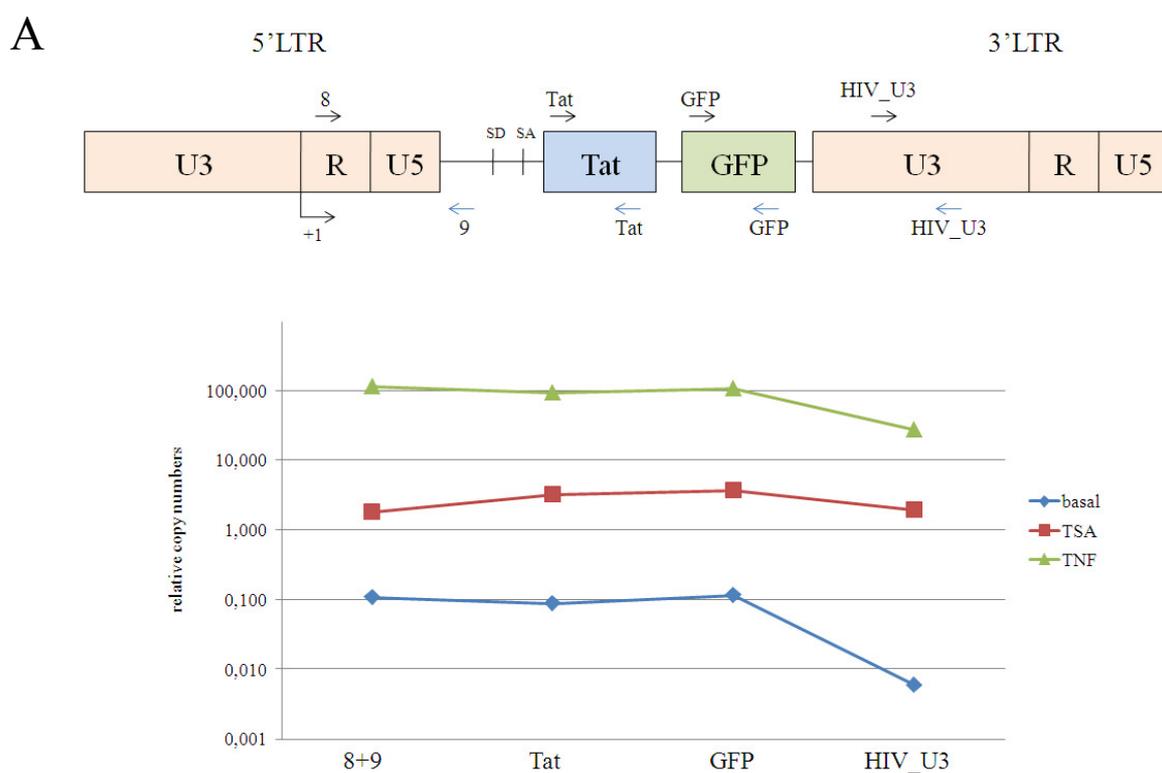


Figura 30. Se producen transcritos través de la secuencia del HIV. (A) Los ADNc de los clones A2 y 27 como control se usaron en una PCR con oligonucleótidos A+13, uno de ellos en el exón inmediatamente anterior a la integración del HIV en el gen UTX y el otro dentro de la secuencia del 3'LTR, anterior a la región del +1 (B) Los mismos ADNc se utilizaron con los oligonucleótidos de GAPDH para tener un control de carga (C) Los transcritos de la región corriente abajo de la integración del HIV se analizaron mediante la PCR con oligonucleótidos G+H (D) Los transcritos formados se muestran en la figura.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS TRÁNSCRITOS OBSERVADOS

Una vez conocidos los tipos de transcritos que se estaban produciendo quisimos saber qué cantidad de transcritos virales se estaban produciendo y qué ocurría tras la activación del promotor. Para ello, utilizamos los oligonucleótidos usados anteriormente para las 4 regiones de la secuencia del HIV (8+9 en la secuencia de iniciación del HIV, Tat, GFP y HIV_U3 como región final del transcrito). Para ello se trataron las células

del clon A2 con TSA y TNF α durante 24 horas y se extrajo el ARN para utilizarlo en una RT-PCR a tiempo real con los cuatro pares de oligonucleótidos y utilizando ADN genómico para poder comparar la cantidades de los diferentes transcritos. Los resultados mostraron un comportamiento similar al observado en el clon 27 por lo que se refiere a la disminución de la expresión del provirus tras la iniciación, aunque en el caso de este clon es menos evidente tras la estimulación del promotor viral (Figura 31A). Posteriormente nos propusimos estudiar el efecto del promotor HIV insertado dentro del gen UTX. Para ello se hicieron unas PCRs a tiempo real con oligonucleótidos del primer exón del gen UTX (UTX_exón1) con las muestras del clon A2 tratado y sin tratar con PMA, y utilizando el clon H2 de control. Tal y como se había mostrado en experimentos anteriores, el compuesto PMA es capaz de reactivar el promotor viral latente (Figuras 29A y 29C). Los resultados mostraron una disminución en la expresión del gen UTX en las muestras del clon A2 tratado con PMA, pero no en el control (Figura 31B). Este dato nos hizo pensar en un efecto negativo de la activación del HIV con la consecuente expresión de transcritos virales sobre la correcta transcripción del gen endógeno en aquellas células cuya integración del HIV se había dado en sentido contrario al del gen endógeno. En experimentos anteriores, la adición de PMA a las células del clon A2 disminuía ligeramente la producción del transcrito salvaje del gen UTX en el que se produce el *splicing* entre los exones 8 y 9 (Figura 28A).



B

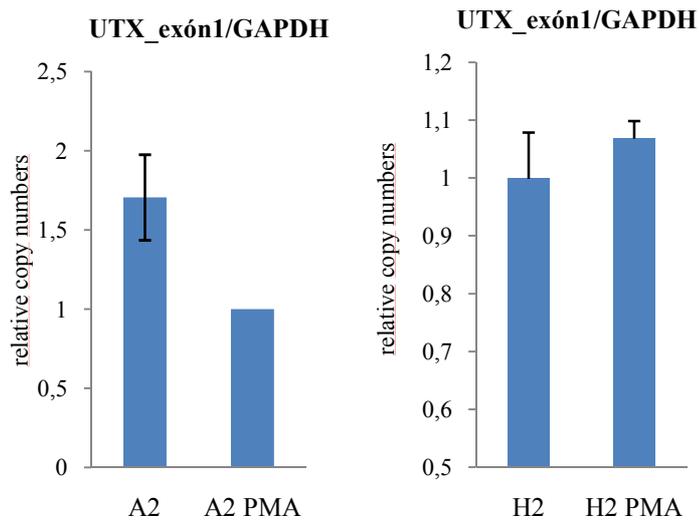


Figura 31. Cuantificación de los transcritos producidos en el clon A2 y sus cambios tras la activación del promotor del HIV. (A) Los transcritos virales en el clon A2 fueron cuantificados en estado basal y en células tratadas con TSA o TNF. Los oligonucleótidos utilizados cubrían la región de iniciación, Tat, GFP y la región final del transcrito en el U3 del 3'LTR. Los valores se pusieron en comparación al ADN genómico para poder comparar las cantidades obtenidas con diferentes oligonucleótidos. (B) Las células de los clones A2 y H2 fueron tratadas con PMA durante 16 horas y se les extrajo el ARN para poder hacer una RT-PCR con los oligonucleótidos de la región del exón 1 del gen UTX (UTX_exón1). Los resultados se pusieron en relación al GAPDH como control externo.

5. Influencia de factores que controlan la estructura de la cromatina sobre el estado latente del virus del HIV

En la presente tesis nos propusimos estudiar factores que pudieran estar relacionados con la latencia del HIV, con el fin de entender el mecanismo molecular que lleva a un estado latente de este promotor y si dicho mecanismo es general en todos los clones o específico de algunos de ellos. Si hay diferencias entre clones, esto podría ser explicado por los diferentes sitios de integración del promotor en el genoma.

Se decidió estudiar en detalle proteínas que habían sido descritas en levadura como factores relacionados con la represión de promotores crípticos, es decir, promotores silenciados por la expresión de un gen localizado corriente arriba (SPT6, CHD1, ASF1A, HIRA, SPT16) (Kaplan et al. 2003, Cheung et al. 2008). También se seleccionaron unos factores cuyo mutante en levadura no tenía ningún efecto sobre la expresión del HIV (Sebastián Chávez, comunicación personal) con el fin de utilizarlos como controles (BRG1 y TFIIS). Por último se decidió estudiar una serie de factores candidatos que habían sido descritos como proteínas involucradas en la compactación de la cromatina y que podrían estar implicados en el estado de latencia (YY1 y HP1 β).

Para dicho estudio se utilizaron vectores lentivirales que expresan shRNAs contra las proteínas de interés, en este caso, factores relacionados con la represión transcripcional y con la compactación de la cromatina que puedan estar relacionados con el silenciamiento del HIV. Podemos dividir las proteínas analizadas en diversos grupos:

- Complejos remodeladores de los nucleosomas y proteínas relacionadas con cromatina y transcripción: SPT6, CHD1, ASF1A, HIRA, SPT16, BRG1 y TFIIS
- Otras proteínas:
 - El factor de transcripción YY1
 - La proteína heterocromatínica HP1 β

5.1 SPT6 Y CHD1

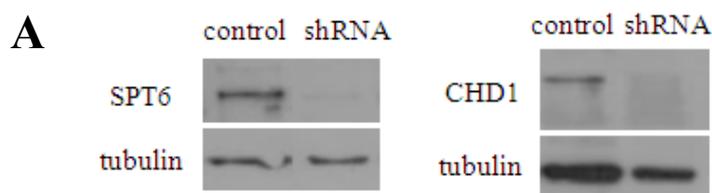
5.1.1. Efecto de la depleción de SPT6 y CHD1 sobre la latencia del HIV

En estudios realizados previamente en levadura se habían descrito los factores SPT6 y CHD1, ambos relacionados con el reposicionamiento de los nucleosomas, en el silenciamiento de la expresión de ciertos genes, tales como HIV o FLO8 (Vanti & Gallastegui et al. 2009, Kaplan et al. 2003, Cheung et al. 2008). Mutantes de ambos factores mostraban un aumento en la expresión de los transcritos que en la cepa salvaje están silenciados por el efecto de un gen transcripcionalmente activo situado en una región cercana corriente arriba (Kaplan et al. 2003, Cheung et al. 2008). Vanti y Gallastegui et al. (2009) demostraron que mutantes en levadura de SPT6 y CHD1 aumentaban la expresión de los transcritos del HIV.

POBLACIÓN HETEROGÉNEA LATENTE

Con el fin de estudiar si los factores de reensamblaje de la cromatina tienen un papel importante en la represión de la transcripción del HIV, se usaron vectores lentivirales (pLKO.1-Puro, Sigma) que expresan los shRNAs de SPT6 y CHD1.

En un primer experimento se infectó la población heterogénea de células latentemente infectadas (ver apartado 1.1) con los shRNAs de SPT6 y CHD1 separadamente y con un shRNA Control, que consiste en un vector con una secuencia de nucleótidos aleatoria que no reconoce ningún gen pero que activa la maquinaria del ARN interferente. Tras la selección con Puromicina durante 7 días de las células infectadas con el vector de expresión de los shRNAs, se analizaron los niveles de expresión del promotor HIV, midiendo la cantidad de GFP en el citómetro de flujo. Los porcentajes de GFP en las células infectadas con los shRNAs de SPT6 y CHD1 alcanzaron un 5%, proporción significativamente mayor que el 1% obtenido con el shRNA Control (Figura 32B). La inhibición de ambas proteínas fue analizada mediante Western Blot utilizando anticuerpos específicos (Figura 32A).



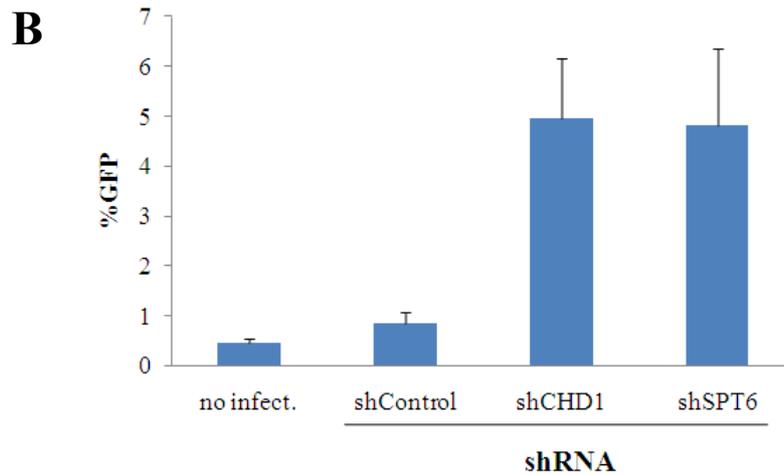


Figura 32. La expresión de los shRNAs de SPT6 y CHD1 en la población heterogénea latentemente infectada con el HIV reactiva la expresión del promotor latente. (A) La población heterogénea latente fue infectada con los shRNAs de SPT6, CHD1 y un shRNA Control clonados en un vector lentiviral (pLKO.1-Puro, MISSION, Sigma). Después de seleccionar con Puromicina (2mg/ml) las células que expresaban los shRNAs, la depleción de las proteínas SPT6 y CHD1 fue analizada mediante un ensayo de Western Blot con anticuerpos específicos para cada una de las proteínas y utilizando un anticuerpo anti-Tubulina como control de carga. (B) Tras la selección con Puromicina durante siete días, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo. Se muestra la expresión del HIV en la población heterogénea de células latentes calculada como porcentaje de GFP. Se ha representado la media de 3 experimentos diferentes con su desviación estándar.

Esta proporción de un 5% de reactivación podría parecer muy baja, pero se debe tener en cuenta que la población Jurkat latentemente infectada es una población altamente heterogénea que representa un gran número de integraciones del HIV en muy diversos lugares del genoma y con diferente compactación de la cromatina. Este resultado querría decir que de dicha población heterogénea, una proporción del 5% de virus latentes es capaz de reactivarse sólo disminuyendo la expresión de SPT6 y CHD1.

CLONES 27 Y A2

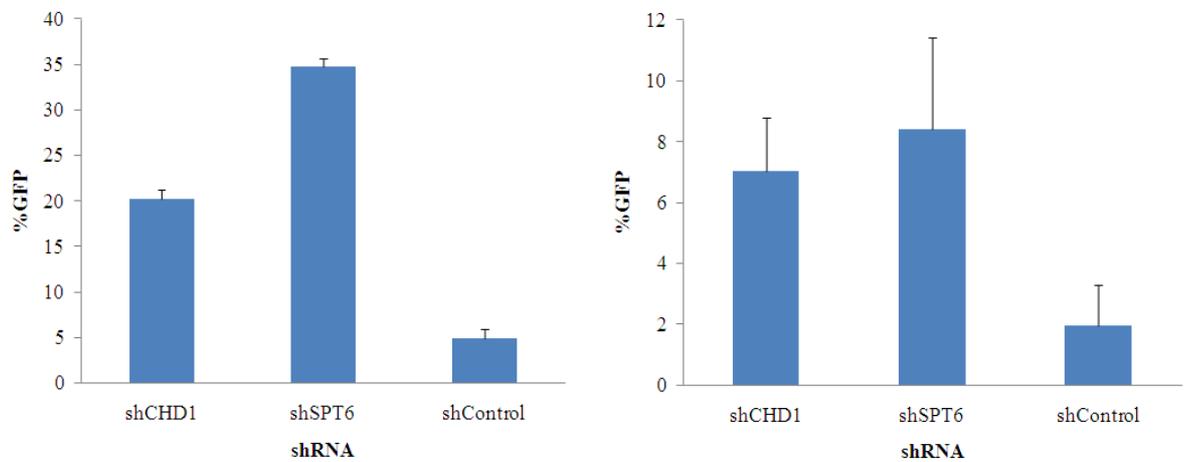
Posteriormente, se analizó el papel de la depleción de estas dos proteínas en el contexto cromatínico específico de 2 clones cuya integración se localizara en intrones de genes activos. Los dos clones analizados con este entorno fueron el clon 27 (UBXD8, igual sentido) y el clon A2 (gen UTX, sentido contrario) (Figura 33A). En ambos clones, la infección de los shRNAs de SPT6 y CHD1 fue capaz de reactivar el promotor HIV latente, comparando con el shRNA Control. Los porcentajes de expresión de GFP fueron diferentes entre los dos clones, alcanzando un máximo de

aproximadamente un 35% de activación en el clon 27 tras la depleción de SPT6 (Figura 33B). La reactivación del promotor del HIV en el clon A2 tiene unos valores absolutos menores que los del clon 27, pero también se puede observar que el porcentaje de expresión de GFP en el shRNA Control del clon A2 es menor (Figura 33B). La depleción en la expresión de Spt6 y Chd1 fue comprobada mediante RT-PCR en tiempo real, observándose que en ambos clones se depleccionaba el ARNm de manera considerable (Figura 33C). Los valores de reactivación del promotor del HIV conseguidos al deplecionar Spt6 en el clon 27 fueron casi tan elevados como los obtenidos al tratar las células con activadores como PMA o TSA (Figura 33D).

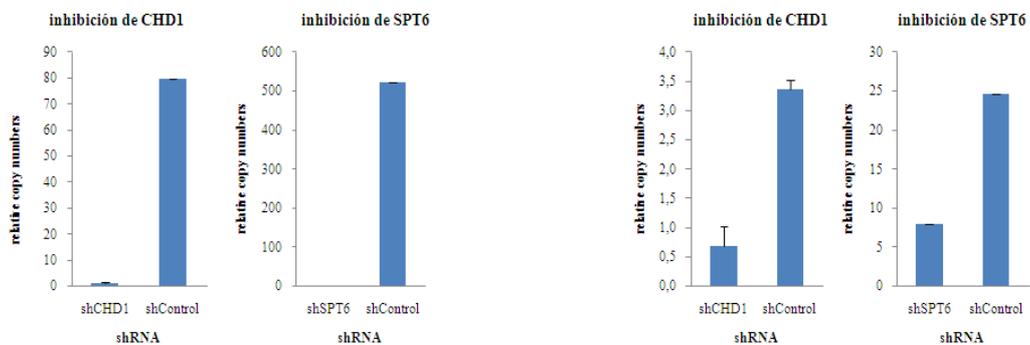
A



B



C



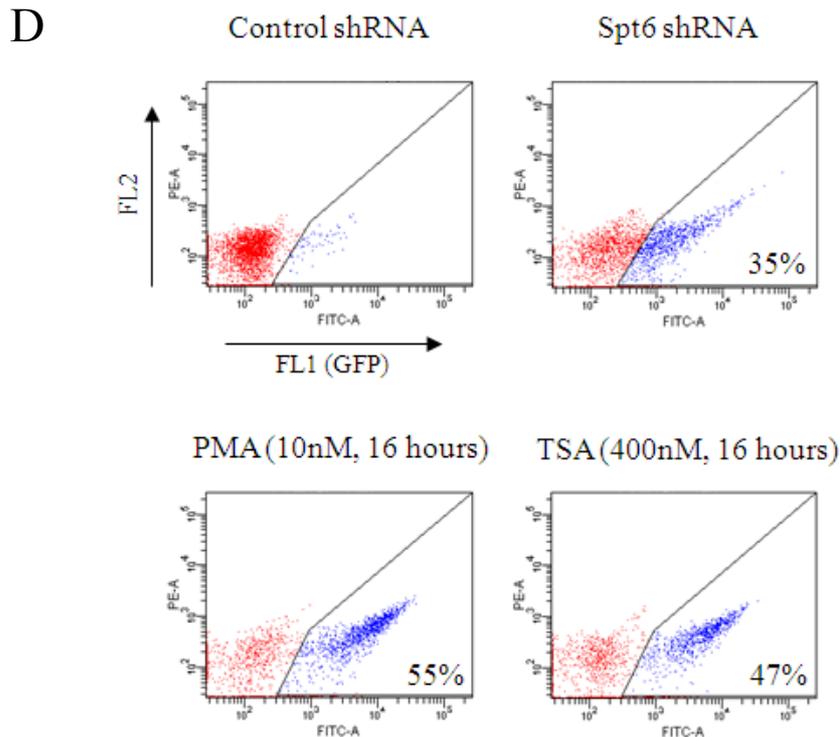


Figura 33. Reactivación de los clones 27 y A2 tras la depleción de los factores Spt6 y Chd1. (A) Esquema del sentido de las integraciones del HIV en los clones 27 y A2. **(B)** Reactivación de los clones 27 y A2 tras la infección con los vectores lentivirales que expresan los shRNAs de SPT6 y CHD1. Tras siete días de selección con Puromicina de las células que contienen los vectores lentivirales con sus shRNAs correspondientes, se analizó la expresión del promotor del HIV mediante la cuantificación de GFP en el citómetro de flujo. Se representa el porcentaje medio de GFP de dos muestras diferentes y su desviación estándar correspondiente. **(C)** Tras siete días de selección con Puromicina, se extrajo ARN de las células para determinar la depleción de Spt6 y Chd1. Se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para la secuencia de ambos factores en relación al GAPDH como control externo. **(D)** Datos obtenidos en el citómetro de flujo tras la infección y selección de los shRNA de SPT6 y shRNA Control (panel superior) y tras el tratamiento del mismo clon con PMA (10nM, 16 horas) y TSA (400nM, 16 horas) (panel inferior). Los datos se representan con los canales FL1 (verde/GFP) y FL2 (rojo) siendo las células cuyo promotor HIV se ha reactivado aquellas que se desplazan hacia el canal FL1, situándose en la ventana P4 previamente colocada usando un clon latente no estimulado como control negativo. Los porcentajes de reactivación del HIV están marcados dentro de cada recuadro correspondiente.

Así pues, estos resultados obtenidos hasta el momento parecían indicar que los factores relacionados con el reensamblaje de la cromatina tenían un papel importante en el establecimiento de la latencia del virus del HIV. Al deplecionar los factores SPT6 y CHD1 se produciría un estado más relajado de la cromatina, que llevaría a una reactivación del HIV. El siguiente punto que nos propusimos averiguar dentro de este

apartado fue el de analizar cuál sería el papel de un activador del promotor del HIV en el proceso de reactivación mediado por la inhibición de SPT6. Por este motivo se volvió a infectar el clon 27 con los shRNAs de SPT6 y shRNA Control y tras la selección con Puromicina se trató las células con TSA y TNF durante 24 horas. En las células no tratadas con TNF, se pudo ver de nuevo la reactivación del promotor del HIV en las células que expresaban el shRNA de SPT6 comparando con los valores de GFP del shRNA Control. Tras la activación del promotor con TSA, se pudo observar que la desrepresión del promotor del HIV era mayor en las células que estaban expresando el shRNA de SPT6, en comparación con el shRNA Control, tanto a nivel de porcentajes de GFP como de intensidad de fluorescencia de la GFP o MFI. Tras activar las células con TNF se observa desrepresión del promotor del HIV al comparar los niveles de MFI (Figuras 34A y 34B).

Este resultado muestra que el shRNA de SPT6 en el clon 27 es capaz de aumentar la expresión basal del HIV debido a que se forma un ambiente donde la cromatina debe estar más relajada, y el hecho de añadir un agente inductor ejerce un efecto mayor y favorece una mayor reactivación del promotor.

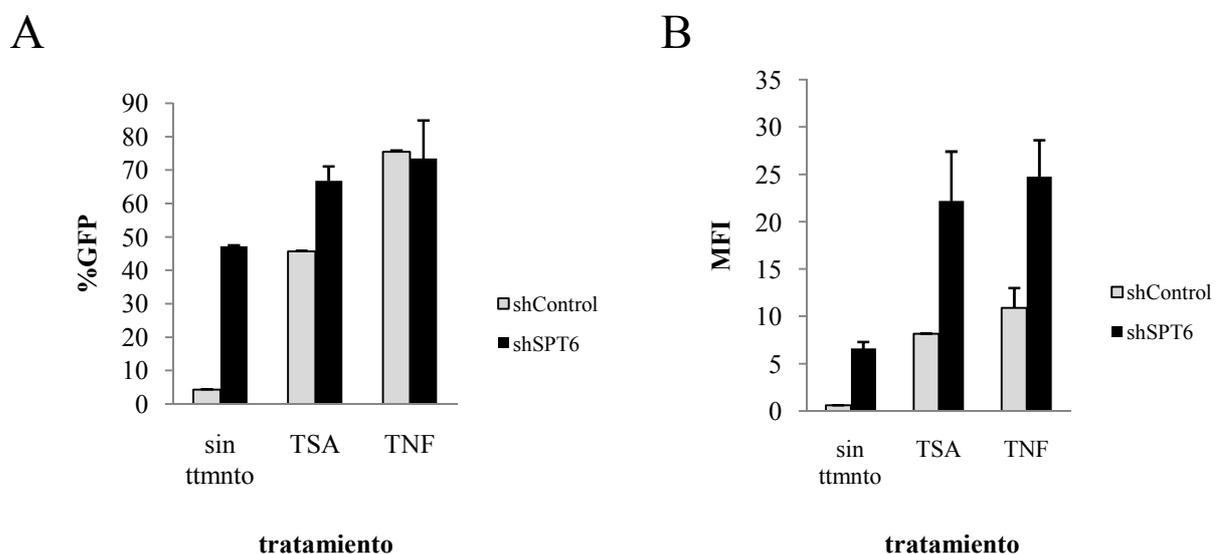


Figura 34. La reactivación del promotor del HIV se ve aumentada en las células infectadas con el shRNA de Spt6 tras la inducción del promotor con TSA y TNF. El clon 27 fue infectado con los shRNAs de SPT6 y Control y las células expresando dichos shRNAs fueron seleccionadas durante 6 días con Puromicina, tras lo cual se trataron con TSA (400nM) y TNF (10ng/ml) durante 24 horas. La expresión del promotor en células tratadas y no tratadas fue analizada tras el tratamiento mediante el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como porcentajes de GFP (panel A) e Intensidad de Fluorescencia o MFI (panel B) y son un ejemplo representativo de tres experimentos diferentes.

CLONES H2, A1 Y C9+

Una vez comprobado que estos dos factores están relacionados con la represión del HIV en clones cuya integración se encuentra en intrones de genes activos, nos propusimos estudiar si tendrían algún papel en otro tipo de clones con integraciones diferentes. Para ello, se escogieron un clon activo llamado C9+ y dos clones latentes, H2 y A1. Como ya se ha comentado anteriormente, la integración del HIV en el clon H2 se produjo en una región alfoidea y en el caso del clon A1, en una región intergénica. El haber escogido estos tres clones con integraciones en distintos lugares y cuya compactación de la cromatina era también diferente permitía conocer en más profundidad en qué ambiente eran necesarias las proteínas relacionadas con el reensamblaje de la cromatina en el papel de la represión del HIV en la latencia. Con dicho propósito, se infectó el shRNA de SPT6, juntamente con el shRNA Control, en los 3 clones y se analizó tanto el porcentaje de expresión del promotor mediante GFP (Figura 35A, paneles superiores) como la intensidad de fluorescencia de la GFP o MFI (Figura 35A, paneles inferiores). Cabe comentar que decidimos centrarnos en el estudio de SPT6 como proteína de reensamblaje de la cromatina, debido a que sus niveles de desrepresión del promotor del HIV habían sido mayores hasta el momento. En estudios previos se demostró que en determinados casos, el efecto de un shRNA en la desrepresión del promotor del HIV se observa en mayor medida si se añade algún agente activador del HIV (Kauder et al. 2009). Por esta razón, las células fueron tratadas con TNF durante 16 horas y la reactivación del HIV también fue seguida mediante GFP y MFI. En este experimento se pudo observar que el hecho de estar expresando el shRNA de SPT6 en los clones H2, A1 y C9+ no tenía ningún efecto significativo sobre la desrepresión del HIV en ninguno de los tres clones, ni midiendo dicha desrepresión por GFP ni por MFI en estado basal (Figura 35A, barras azules). La reactivación del HIV tras el tratamiento con TNF tampoco era diferente en ninguno de los tres clones comparando las células que expresaban el shRNA de SPT6 con las que expresaban el shRNA Control (Figura 35A, barras rojas).

La disminución en la expresión de SPT6 en los tres clones que estaban expresando dicho shRNA fueron analizadas mediante RT-PCR a tiempo real, observándose inhibiciones de aproximadamente un 71% (clon H2), 75% (clon A1) y un 77% (clon C9+) (Figura 35B).

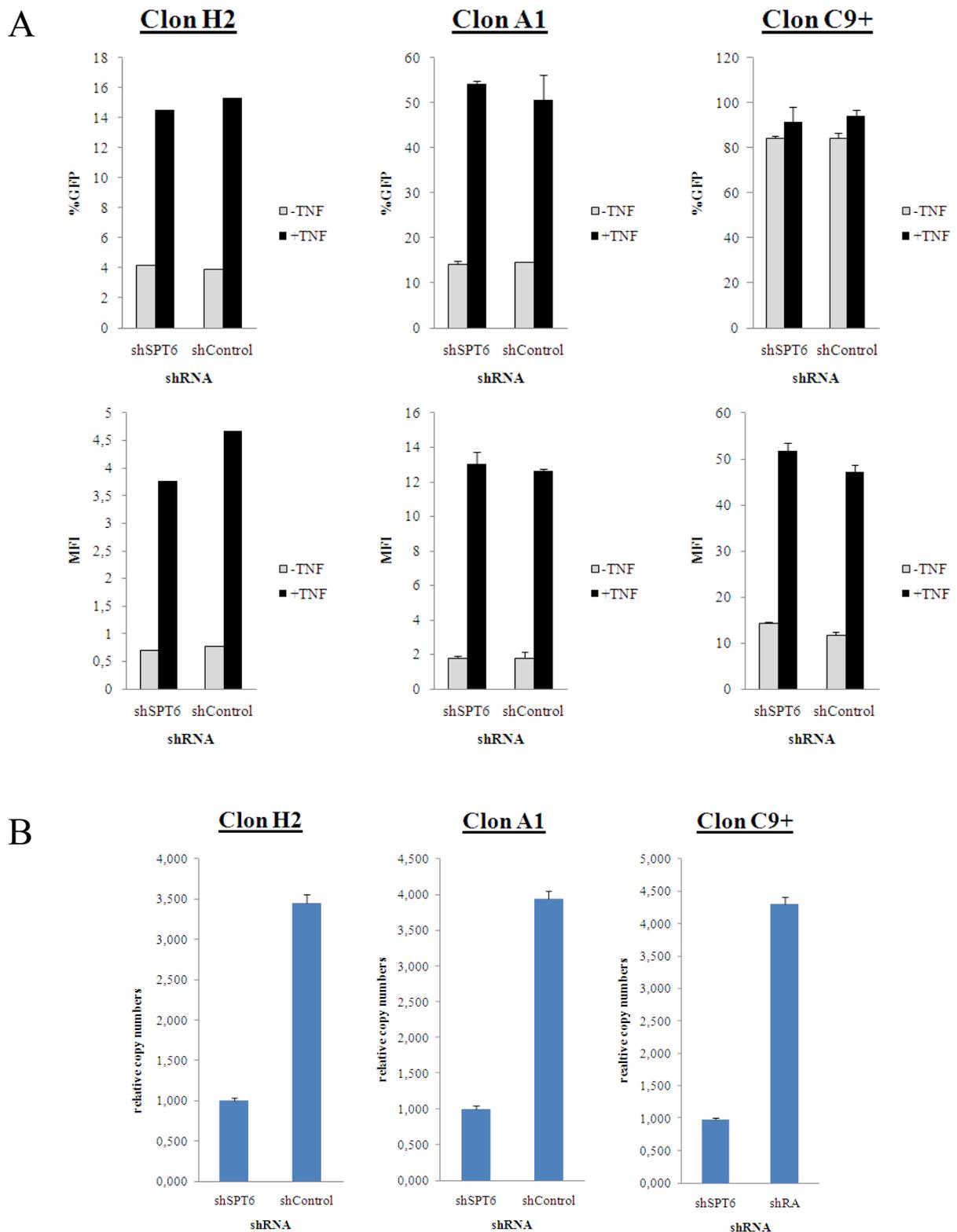


Figura 35. La expresión del shRNA de SPT6 en un clon activo y en dos clones latentes cuyas integraciones están en zonas transcripcionalmente poco activas no tiene ningún efecto sobre la **desrepresión del HIV.** (A) Los clones H2 (región alfoidea), A1 (región intergénica) y C9+ (clon constitutivamente activo) fueron infectados con los shRNAs de SPT6 y el Control. Las células fueron seleccionadas durante 6 días con Puomicina y se les añadió TNF (10ng/ml) a la mitad de ellas. La

expresión de GFP (paneles superiores) y la intensidad de fluorescencia o MFI (paneles inferiores) fueron seguidas mediante el citómetro de flujo a las 16 horas del tratamiento con TNF. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos. **(B)** Se muestran los niveles de inhibición de SPT6 en células que expresan el shRNA de SPT6 comparando con el shRNA Control. El ARN de las células infectadas y seleccionadas con Puromicina se extrajo y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real para medir los niveles de depleción en las células que expresaban el shRNA de SPT6. Los datos se expresan como niveles de transcrito de SPT6 producidos en relación al transcrito producido de RPL31 como control externo de los niveles de ADNc utilizados en la PCR a tiempo real.

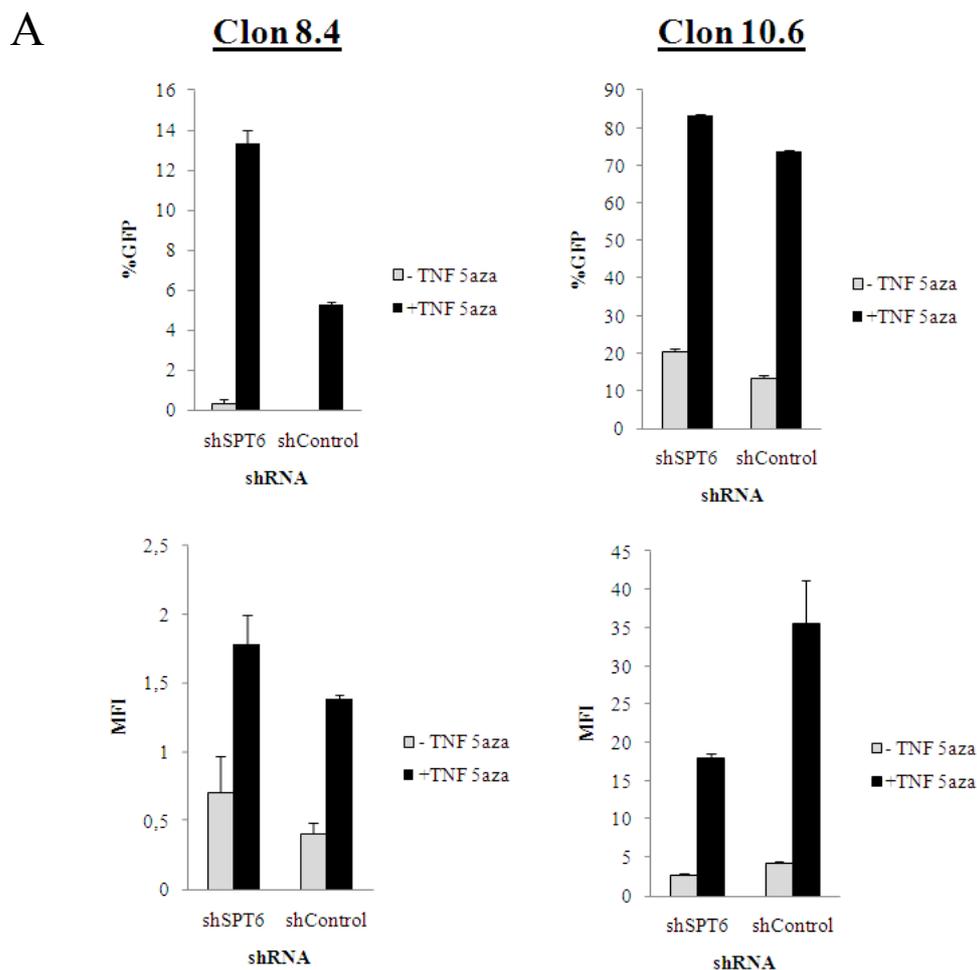
Este experimento sugería por una parte que en un ambiente donde hay una cromatina altamente compacta y donde los niveles de transcripción son muy bajos o casi inexistentes (clon H2), o bien en zonas pobres en genes donde se dan pocos procesos de transcripción (clon A1), los factores de reensamblaje no tienen ningún efecto sobre la latencia del promotor del HIV. Por otra parte, en células con un HIV constitutivamente activo como es el caso del clon C9+, tampoco parece ser que SPT6 tenga ningún papel.

CLONES 8.4 Y 10.6

Por último y tras haber estudiado varios tipos diferentes de clones latentes con un mini-genoma del HIV de 4Kb de longitud, nos propusimos utilizar clones latentes que contenían el genoma de 9Kb (GFP en lugar de *Nef* y una mutación en *Env*, véase Tabla 1) para comprobar si respondían de igual manera que los clones con el mini-genoma. Los clones utilizados con tal finalidad fueron el 8.4 y el 10.6, los cuales están integrados en intrones de genes (en ambos casos, en sentido contrario al de expresión del gen huésped). Tal y como se había procedido anteriormente con otros clones, los dos clones con el genoma de 9Kb de longitud fueron infectados con los shRNAs de SPT6 y shRNA Control. Las células que expresaban los shRNAs fueron seleccionadas con Puromicina y la desrepresión del promotor del HIV fue medida en un citómetro de flujo, mediante el análisis de la expresión de GFP (Figura 36A, paneles superiores) y de la intensidad de la fluorescencia MFI (Figura 36B, paneles inferiores). Parte de las células infectadas se trataron con TNF y 5-aza-2'-deoxicitidina (aza-CdR o 5-aza), molécula que ha sido descrita como un inhibidor de la metilación del ADN. Esta combinación de TNF y 5-aza ha sido descrita anteriormente como un fuerte inductor de la reactivación del promotor del HIV en clones latentemente infectados con el genoma de 9Kb de longitud, debido a la existencia de una relación directa entre la metilación del ADN y la latencia (Kauder et al. 2009). Nuestro tratamiento con TNF y 5-aza pretendía ayudar a ver algún tipo de

reactivación por parte del shRNA en el caso que con solo el shRNA no fuera suficiente, en parte debido a que el genoma viral necesita ser desmetilado. Tanto las células sin tratar como tratadas fueron analizadas, pudiéndose ver que en el caso del clon 8.4 la desrepresión del promotor medida por el porcentaje de GFP se podía observar sólo tras el tratamiento con TNF y 5-aza. Sobre la intensidad de la fluorescencia se pudo observar que la fluorescencia era mayor en las células infectadas con el shRNA de SPT6 (Figuras 36A, izquierda). En cuanto al clon 10.6, los porcentajes de GFP eran ligeramente mayores en el shRNA de SPT6 comparando con el shRNA Control, aunque la intensidad de la fluorescencia era mayor en el shRNA Control (Figura 36A, derecha). En ambos casos se puede concluir que la depleción en la expresión de SPT6 en clones con un genoma del HIV de 9Kb de longitud desreprime el promotor del HIV de la latencia.

Las inhibiciones de SPT6 en los dos clones fueron analizadas mediante RT-PCR en tiempo real. Se pudo observar que la depleción en la expresión de SPT6 en el clon 8.4 había disminuido un 61%, y un 86% en el clon 10.6 (Figura 36B).



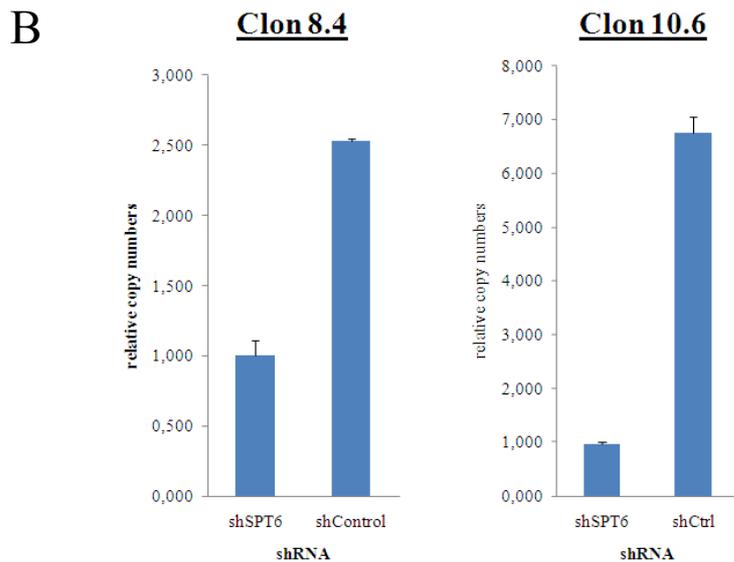


Figura 36. Desrepresión del promotor del HIV en clones latentemente infectados con un genoma del HIV de 9Kb de longitud. (A) Los clones 8.4 y 10.6 fueron infectados con los shRNAs de SPT6 y un shRNA Control. Las células expresando dichos shRNAs fueron seleccionadas con Puromicina durante 6 días y tratadas con TNF (10ng/ml) y 5-aza-2’deoxicidina (5 μ M) durante 30 horas. El porcentaje de GFP y la intensidad de fluorescencia (MFI) fueron analizados mediante un citómetro de flujo. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. **(B)** Los niveles de inhibición de SPT6 fueron medidos tras extraer el ARN de las células infectadas y seleccionadas durante 7 días con Puromicina, mediante RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para la secuencia de SPT6. Se representan los niveles de transcritos de SPT6 en referencia a los transcritos de RPL31 como control externo de carga.

Estos resultados obtenidos nos llevan a pensar que los factores de reensamblaje están relacionados con el estado latente del promotor del HIV solo en los casos en que dicho HIV se encuentre integrado en regiones transcripcionalmente activas, como es el caso de intrones de genes activos, pero no en regiones de cromatina cerrada, donde estos factores no parecen tener ningún papel importante.

5.1.2. Depleción de factores de reensamblaje de la cromatina en un modelo de latencia en Hela

Tras haber visto que los factores de reensamblaje de la cromatina tenían un papel importante en la represión del promotor del HIV y en su estado de latencia en linfocitos, nos propusimos estudiar si este efecto que se había observado se podía reproducir en otros modelos celulares. Para ello, utilizamos el mismo sistema previamente utilizado

para producir células Jurkat con un promotor latente. Las células Hela fueron infectadas con un vector retroviral que expresaba las proteínas Tat y GFP bajo el promotor del HIV (LTR-Tat-GFP-LTR) con varias multiplicidades de infección. Cinco días después de la infección la expresión de GFP de las células fue analizada en un citómetro de flujo y las células GFP-positivas y GFP-negativas fueron aisladas. La población GFP-negativa fue tratada con TNF, tras lo cual se aislaron las células que se habían vuelto GFP-positivas. Estas células correspondían a la población de células Hela latentemente infectadas y se mantuvo dicha población como un grupo heterogéneo de células (Figura 37).

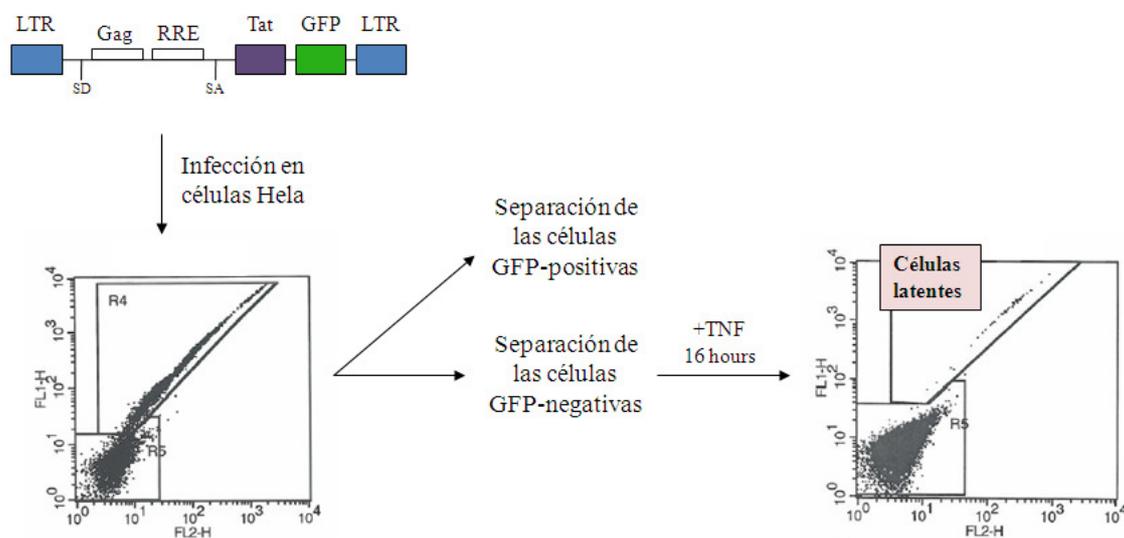


Figura 37. Producción de un modelo celular de latencia del HIV en Hela. El vector conteniendo la secuencia del mini-genoma LTR-Tat-GFP-LTR se infectó en células Hela y la expresión de GFP fue analizada mediante un citómetro de flujo cinco días después de la infección. Se seleccionaron las células GFP-positivas y negativas y éstas últimas fueron tratadas con TNF (10ng/ml) durante 16 horas. Las células que se volvieron GFP-positivas tras el tratamiento se seleccionaron para establecer una población de células Hela latentemente infectadas. Tras varias semanas en cultivo en ausencia de TNF, la gran mayoría de las células se volvieron GFP-negativas de nuevo.

Tras la obtención de la población Hela latentemente infectada con el mini-genoma del HIV, se analizó la actividad transcripcional de la población latente. Para ello se trataron las células con PMA, TSA y TNF α o una combinación de los tres tratamientos y se analizaron las células en el citómetro. Con todos los tratamientos por separado se pudo ver una desrepresión del promotor latente de las células, aunque con unos porcentajes

más elevados tras los tratamientos con TSA y TNF. La combinación de los tres compuestos permitió una reactivación mayor aunque sin presentar un efecto (Figura 38).

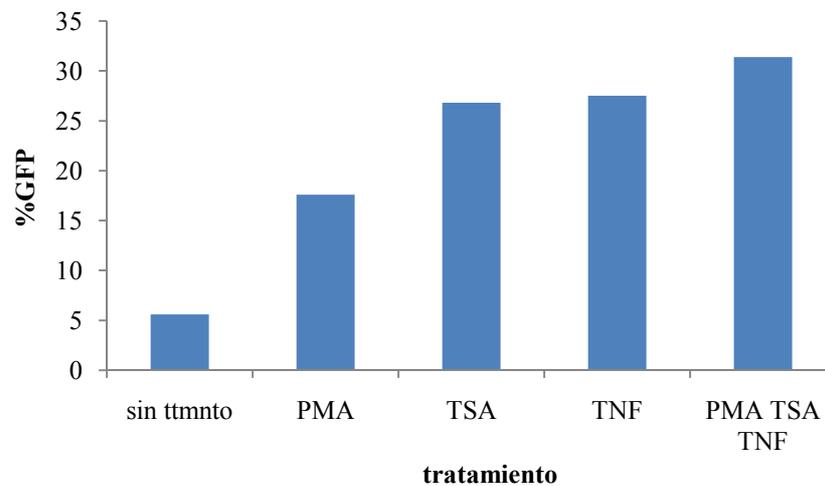


Figura 38. Desrepresión de las células Hela latentemente infectadas tras añadir activadores del promotor del HIV. Las células Hela latentes fueron tratadas con PMA (10nM), TSA (400nM), TNF (10ng/ml) y una combinación de los tres compuestos durante 16 horas y la expresión de GFP fue analizada mediante el citómetro de flujo y comparada con las células sin tratamiento (estado basal). Se muestra un gráfico representativo de 2 experimentos independientes.

Una vez se tuvieron las células Hela latentes y se conocía su respuesta a diferentes estímulos, se infectaron dichas células con el shRNA de SPT6 y el shRNA Control. Se seleccionaron las células expresando los shRNAs con Puromicina y se analizó la desrepresión del promotor del HIV a los 9 y a los 19 días después de la infección mediante GFP (Figura 39B). La inhibición de SPT6 fue analizada mediante Western Blot en ambos días (Figura 39A). Se pudo observar que la depleción de SPT6 era capaz de reactivar el promotor silente del HIV en el modelo latente en Hela a los 9 días después de la infección, momento en que los niveles de proteína SPT6 eran prácticamente indetectables. Por otra parte, al dejar las células en cultivo durante diez días después del primer análisis se observó que la proteína SPT6 volvía a expresarse y este hecho se relacionaba directamente con una vuelta al estado latente del promotor (Figura 39A y 39B).

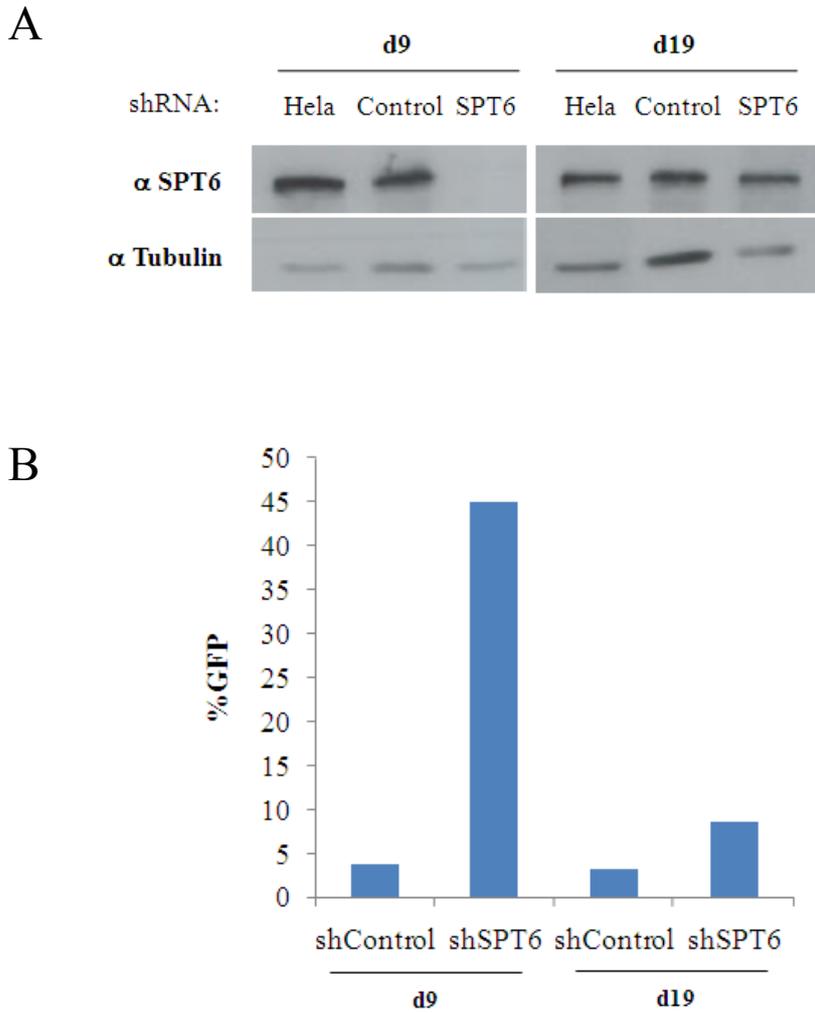


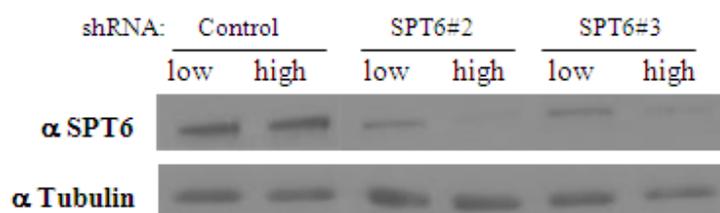
Figura 39. La depleción de SPT6 reactiva el promotor silente del HIV en un nuevo modelo de latencia en células Hela. (A) Células Hela latentemente infectadas fueron infectadas con los vectores lentivirales que expresan los shRNA de SPT6 y shRNA Control. Tras la selección con Puromicina, la depleción de este factor fue testada mediante Western Blot con un anticuerpo específico para SPT6 y un anticuerpo contra Tubulina como control de carga a los 9 y a los 19 días tras la infección. (B) La reactivación del promotor del HIV se siguió mediante el análisis de las células GFP-positivas en el citómetro de flujo. La depleción de SPT6 y la reactivación del HIV se observaron al día 9 después de la infección, pero la inhibición se perdió al día 19, observándose un restablecimiento del estado latente del promotor del HIV.

Tomando todos estos resultados en conjunto pudimos concluir que la proteína SPT6 relacionada con el reensamblaje de la cromatina es también necesaria para el establecimiento de la latencia en un modelo latente en Hela y que el efecto del shRNA es específico para tal fin, ya que la expresión de nuevo de la proteína en las células resulta en un restablecimiento del estado de latencia.

5.1.3. Especificidad de las secuencias de los shRNAs de SPT6 y CHD1

Con el propósito de descartar que el efecto que se estaba observando con los shRNAs de SPT6 y CHD1 sobre la latencia del HIV no fuera debido a la inhibición de estas proteínas sino a un efecto inespecífico del shRNA sobre algún otro factor, nos propusimos utilizar otros shRNAs específicos para estos dos factores de reensamblaje. Con tal finalidad, infectamos dos nuevos shRNAs con secuencias específicas para SPT6 y cuatro con secuencias específicas para CHD1. Los lentivirus para la expresión de los shRNAs fueron infectados en las células Hela latentemente infectadas con el promotor del HIV a dos multiplicidades de infección (MOI) diferentes (alta y baja) y tras seleccionar con Puromicina se analizaron los porcentajes de desrepresión del HIV medidos como porcentajes de células GFP-positivas tanto de las células expresando los shRNAs de SPT6 (Figura 40B) como los de CHD1 (Figura 40D). Los niveles de depleción de los dos factores de reensamblaje fueron medidos mediante Western Blot en el caso de SPT6 (Figura 40A) y mediante RT-PCR a tiempo real en el caso de CHD1 (Figura 40C). En este experimento se pudo observar que los efectos de desrepresión del HIV tras la expresión del shRNA de SPT6 se reproducían con los dos nuevos shRNAs, y dicha desrepresión se correlacionaba positivamente con el grado de inhibición de la proteína medida mediante western blot, al comparar las dos MOIs diferentes (Figuras 40A y 40B). En el caso de CHD1 también se pudo ver una correlación positiva entre la desrepresión del HIV y la depleción de CHD1, observándose una mayor desrepresión con los shRNAs número 1 y 3, los cuales expresaban una cantidad menor de transcritos de CHD1 (Figura 40C y 40D). Tomando todos los resultados en conjunto se pudo ver que los shRNAs más eficaces en reprimir la expresión de ambos factores de reensamblaje de la cromatina, eran más eficaces en promover la derepresión del HIV, la cual cosa nos llevó a descartar un efecto inespecífico de los shRNAs de SPT6 y CHD1 utilizados en los experimentos.

A



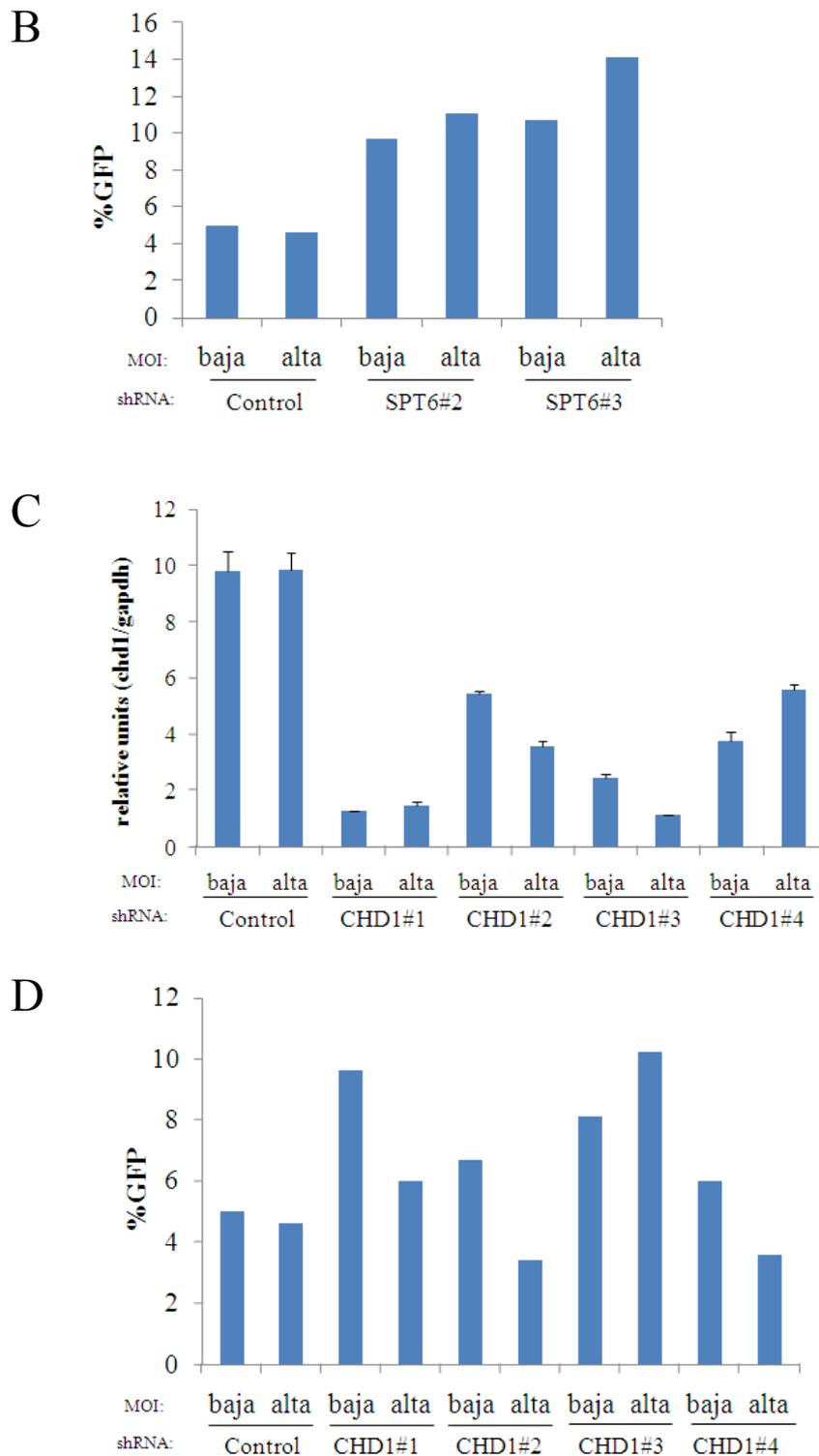


Figura 40. La reactivación del promotor del HIV mediante shRNAs de SPT6 y CHD1 es específica de estos factores de reensamblaje. (A) Dos shRNAs de SPT6 (pLOK1-Puro, MISSION, Sigma) fueron expresados en la población de células Hela latentemente infectada a dos diferentes multiplicidades de infección, marcadas como baja y alta (siendo la MOI alta 9 veces mayor que la baja). Los shRNAs fueron seleccionados con Puromicina (2mg/ml), tras lo cual se extrajeron muestras de proteínas totales que se usaron para mediar la inhibición de STP6 mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo contra

tubulina como control. **(B)** La reactivación del promotor HIV tras la selección de las células que expresaban los shRNAs de SPT6 fue medida mediante porcentaje de GFP en el citómetro de flujo. **(C)** Se infectaron cuatro shRNA distintos para CHD1 con dos MOIs diferentes (baja y alta) en las células Hela latentes. Tras la selección de la expresión de los shRNAs se extrajo RNA para llevar a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para la secuencia de CHD1. Los resultados se muestran como la relación entre transcritos de CHD1 y transcritos de GAPDH como control externo. **(D)** Se midió la desrepresión del HIV mediante el porcentaje de GFP en el citómetro de flujo tras la selección de las células que expresaban los diferentes shRNAs de CHD1.

5.1.4. Efecto de la depleción de SPT6 sobre la síntesis de transcritos desde el promotor del HIV

En nuestros estudios decidimos centrar nuestra atención en el factor de reensamblaje SPT6 por sus mayores efectos observados sobre el estado latente del promotor del HIV y seguimos analizando su papel en los clones 27 y A2.

Nos propusimos estudiar como afectaba la depleción de SPT6 sobre la síntesis de transcritos desde el promotor HIV, y en particular, si se estimulaba la iniciación, la elongación o ambas tras la depleción de SPT6. Para ello, se llevaron a cabo una serie de PCRs con los cuatro pares oligonucleótidos específicos para ciertas regiones del genoma del HIV utilizados previamente: “8+9” para la región posterior al origen de la transcripción, Tat, GFP y “HIV_U3”, situados en la región final de la transcripción (Figura 41). Todos estos oligonucleótidos nos ayudaban a tener una idea de la síntesis de transcritos desde el promotor del HIV.

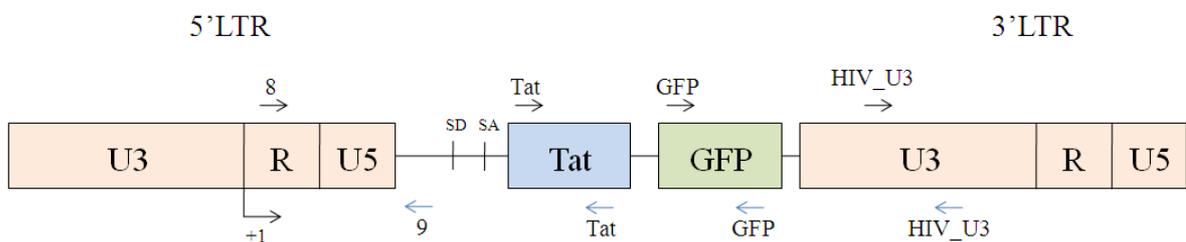


Figura 41. Representación esquemática de los oligonucleótidos utilizados para conocer la cantidad de transcritos del HIV producidos. Los oligonucleótidos 8+9, Tat, GFP y HIV_U3 representan diversas regiones cubriendo el transcrito HIV, desde su inicio en el +1 (8+9), pasando por las secuencias de Tat y GFP y acabando en el 3'LTR (HIV_U3).

Así pues se infectó el clon 27 con los shRNA de SPT6 y el shRNA Control. Las células expresando dichos shRNAs se seleccionaron con Puromicina tras lo cual se extrajo el ARN y se hizo una RT-PCR a tiempo real con los oligonucleótidos mencionados. Tal y como se había hecho en experimentos anteriores, para poder comparar los diferentes oligonucleótidos entre sí (los cuales tienen eficiencias distintas) se utilizó el ADN genómico para normalizar muestras. Los resultados mostraron que la cantidad de transcrito al origen de la transcripción era mucho mayor en las células con depleción de SPT6 en comparación con el control, y que dicha cantidad disminuía drásticamente en las regiones de Tat, GFP y HIV_U3. Aún así, se está expresando mayor cantidad de transcrito total de longitud entera del HIV en las células con SPT6 respecto a las células control (Figura 42). Tomando estos resultados en conjunto, parece ser que la inhibición de SPT6 mejora la iniciación de la transcripción en el promotor del HIV, aunque sigue habiendo un fuerte bloqueo a nivel de elongación.

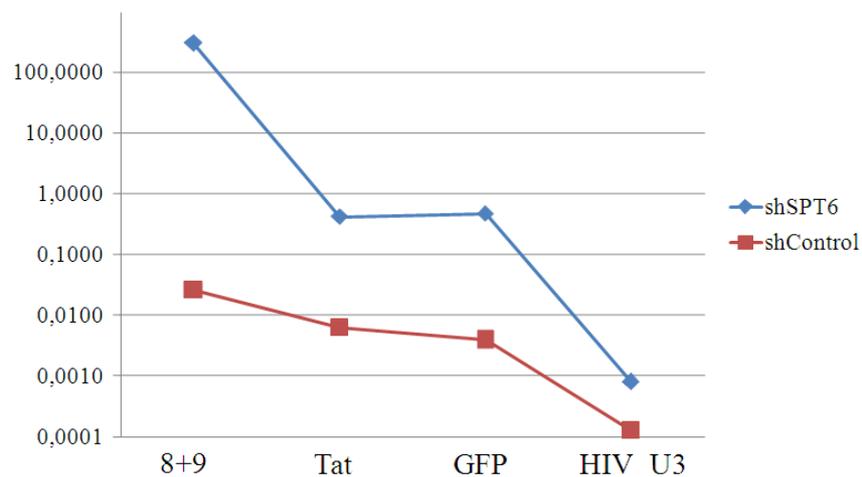


Figura 42. La proteína de reensamblaje de la cromatina SPT6 reprime el promotor del HIV a nivel de iniciación en el clon 27. El clon 27 fue infectado con los shRNAs de SPT6 y shRNA Control. Tras la selección con Puromicina de las células expresando los shRNAs, se extrajo el ARN de las células, con el cual se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real utilizando los oligonucleótidos 8+9, Tat, GFP y HIV_U3, cubriendo la secuencia del transcrito del HIV. Los resultados se muestran como los valores de la PCR con ADNc respecto a la PCR con ADN genómico para cada par de oligonucleótidos y el gráfico se muestra en escala logarítmica. Se muestra un resultado representativo de dos experimentos diferentes.

Una vez estudiado el clon 27, se realizó el mismo tipo de experimento utilizando el clon A2. Para ello, se extrajo ARN de células que expresaban el shRNA de SPT6 y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con los 4 pares de oligonucleótidos de la

secuencia del HIV. Se observó que la expresión de transcritos en el clon A2 expresando el shRNA de SPT6 era similar a la del clon 27 en las mismas condiciones, notándose una mayor desrepresión de la expresión de transcritos virales sobre todo a nivel de iniciación (Figura 43).

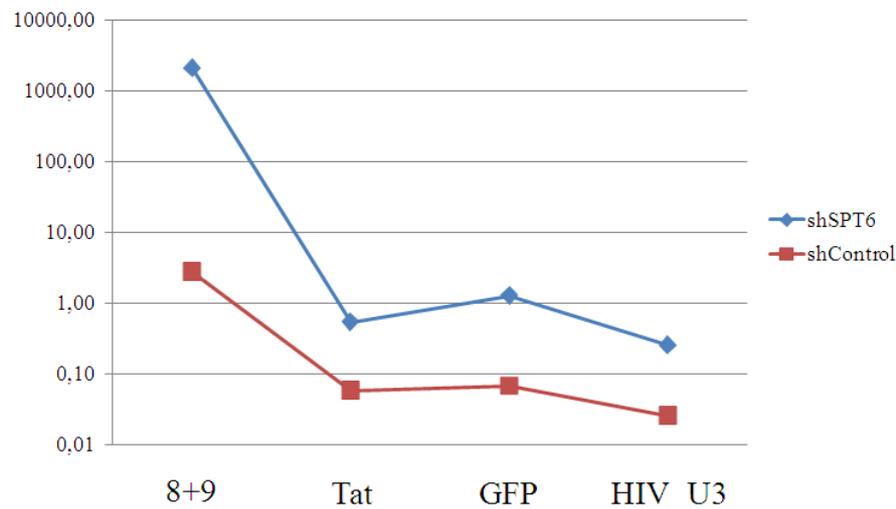


Figura 43. SPT6 es responsable de la represión del promotor del HIV a nivel de iniciación en el clon A2. Las células del clon A2 fueron infectadas con el shRNA de SPT6 y el shRNA Control y seleccionadas, hecho tras el cual se extrajo el ARN de las células y se hizo una RT-PCR a tiempo real con los oligonucleótidos 8+9, Tat, GFP y HIV_U3. Los resultados se muestran como los valores de la PCR con ADNc respecto a la PCR con ADN genómico para cada par de oligonucleótidos. El gráfico se muestra en escala logarítmica.

5.1.5 Efecto combinado de inhibición de SPT6 y tratamientos con TNF o HMBA sobre la reactivación del HIV latente

Los resultados obtenidos hasta el momento nos hicieron pensar en posible papel de SPT6 en la represión de la transcripción a nivel de iniciación en mayor grado. Para estudiar más en detalle esta posible implicación en iniciación, se decidió tratar las células con los compuestos TNF y HMBA, los cuales habían sido caracterizados como activadores de la iniciación y de la elongación en el HIV, respectivamente. Esperábamos que el hecho que el shRNA de SPT6 mejoraba la iniciación del transcrito, sumado a que el tratamiento con HMBA se había descrito como un promotor de la elongación de la transcripción, pudiera favorecer un aumento de los transcritos salvajes de longitud completa.

Tras infectar las células del clon 27 con los shRNAs de SPT6 y shRNA Control y seleccionarlas durante seis días, se trataron con TNF y HMBA durante 24 horas y el porcentaje de GFP y la MFI fueron analizados en un citómetro de flujo. Se pudo observar que las células expresando el shRNA de SPT6 desreprimían en mayor grado el promotor del HIV en presencia de TNF a nivel de MFI (Figura 44A) y en presencia de HMBA, a nivel de GFP y MFI (Figuras 44A y 44B), en comparación con el shRNA Control con los mismos tratamientos. Probablemente el hecho que con TNF prácticamente se lleguen a niveles de saturación de GFP hace imposible diferenciar si hay una inducción mayor en un shRNA u otro, pero dichas diferencias son muy claras a niveles de MFI.

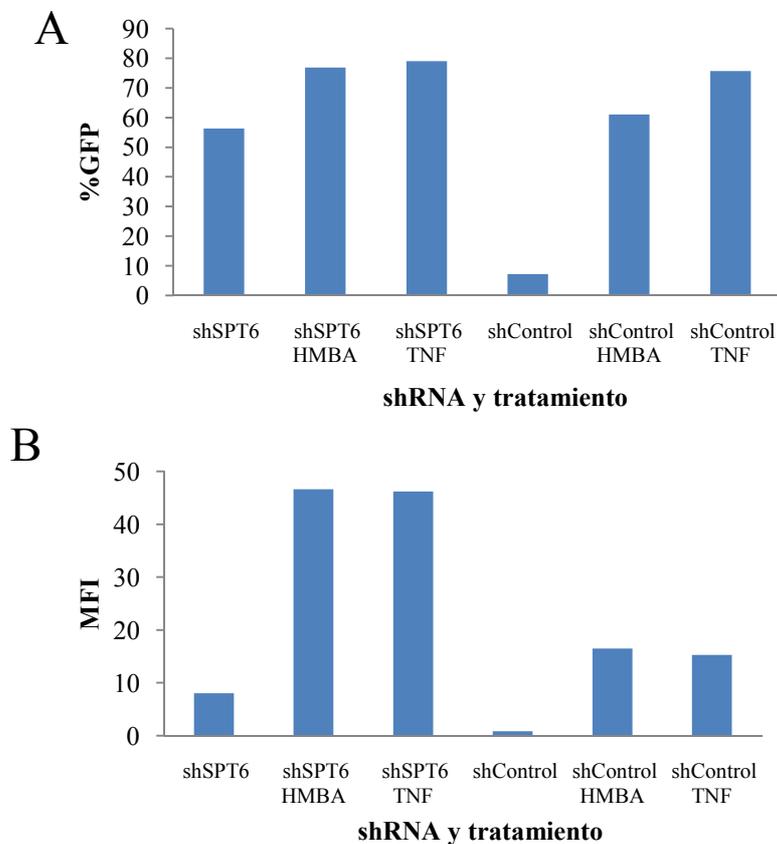
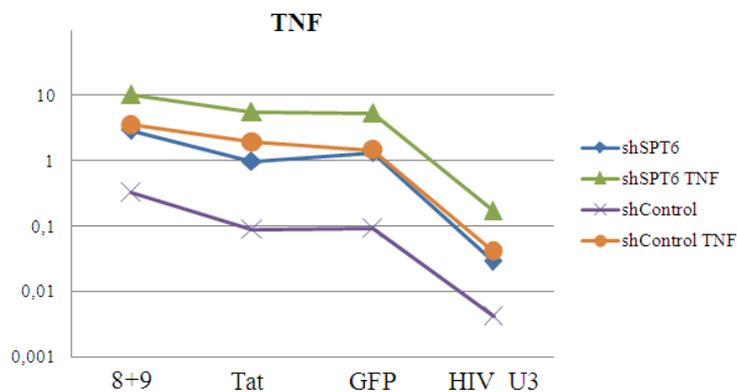


Figura 44. La reactivación del promotor del HIV en células expresando el shRNA de SPT6 se ve inducida por el tratamiento con HMBA y TNF. Las células del clon 27 fueron infectadas con los shRNAs de SPT6 y CHD1 y fueron seleccionadas con Puromicina durante 6 días, selección tras la cual se trataron con TNF (10ng/ml) y HMBA (10mM) durante 24 horas. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo y en los gráficos se muestran los porcentajes de GFP (A) y la intensidad de fluorescencia de la GFP (B).

La cantidad de transcritos de las células expresando los shRNAs de SPT6 y Control y con los tratamientos de TNF y HMBA fueron analizados. Para ello, se llevaron a cabo PCRs a tiempo real con el ADNc y ADN genómico de las células con los oligonucleótidos 8+9, Tat, GFP y HIV_U3, tal y como se ha explicado anteriormente. Se pudo observar que el tratamiento con TNF aumentaba los niveles de transcritos virales en mayor medida en el caso de las células que expresaban el shRNA de SPT6 (Figura 45A), tal y como también ocurría al añadir HMBA a estas células (Figura 45B). En ambos casos, el patrón de expresión de transcritos virales es parecido, habiendo una mayor cantidad a nivel de la iniciación del transcrito y disminuyendo en la zona final de la transcripción (Figuras 45A y 45B). Tras el tratamiento con HMBA de las células expresando el shRNA de SPT6 (en las que la iniciación transcripcional se había visto aumentada) no se observó un aplanamiento de la curva tal y como se podría pensar que ocurriría con un compuesto que promueve la elongación de la transcripción. Una posible explicación de este resultado podría ser el hecho de que en el clon C9+ constitutivamente activo también se observaba este patrón de disminución de la cantidad de transcrito que llega al final de la transcripción (Figura 45C). Por lo tanto parece ser que este patrón es característico de los transcritos del HIV cuando el promotor está activado y la adición de HMBA no puede aplanar más la curva en la región final del transcrito.

Por último, otro dato que se observó en los resultados era que la cantidad de transcritos producidos tras la depleción de SPT6 era similar a la producida tras el tratamiento con TNF o HMBA de las células expresando el shRNA Control.

A



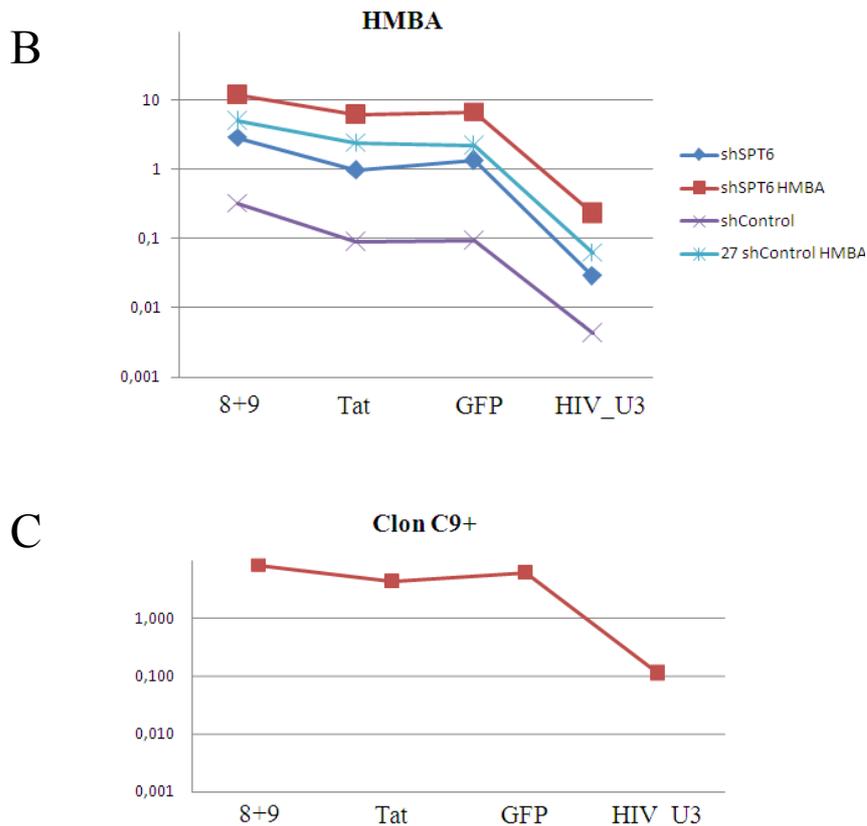


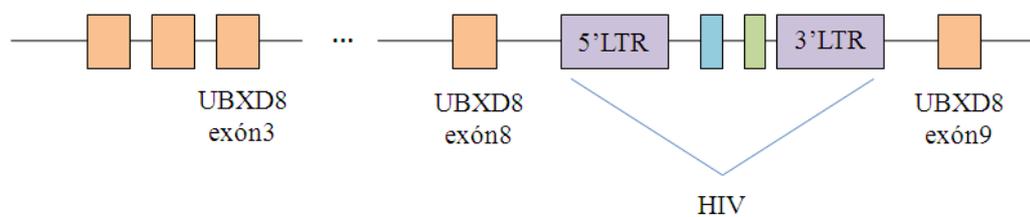
Figura 45. Los transcritos virales producidos en las células expresando los shRNAs de SPT6 se ven aumentados en mayor medida tras el tratamiento con TNF o HMBA comparando con el shRNA Control. Las células del clon 27 fueron infectadas con los shRNA de SPT6 y shRNA Control, y tras seleccionarlas con Puromicina durante 6 días se trataron con TNF (10ng/ml) (A) o HMBA (10mM) (B) durante 24 horas. El ARN de las células fue extraído y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con el ADNc y ADN genómico utilizando oligonucleótidos específicos para diversas partes de la secuencia del HIV (8+9, Tat, GFP, HIV_U3) así como oligonucleótidos de GAPDH como control de carga. (C) El ARN de células del clon C9+ también fue extraído y se midió el transcrito en dicho clon de igual manera que para el clon 27.

5.1.6. Efectos globales de la depleción de SPT6 sobre la expresión génica

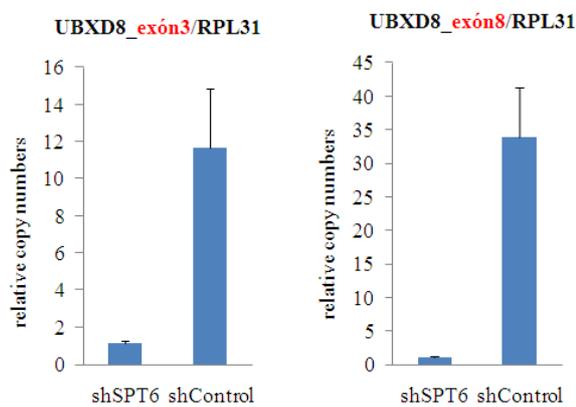
A continuación, nos propusimos estudiar si la inhibición de SPT6 podía producir un efecto a nivel global en la transcripción génica, dado sus papeles descritos en elongación y en mantener la estructura de la cromatina (Kaplan et al. 2003). Para ello, se utilizaron los ARNs de los clones 27 y A2 infectados con los shRNAs de SPT6 y Control en un experimento inicial en el que se calcularon los niveles del transcrito UBXD8 en dos zonas de este gen, en el tercer exón (UBXD8_exón 3) y en el octavo exón (UBXD8_exón8), siendo éste último el exón localizado justamente anterior a la

integración del promotor del HIV en el clon 27 (Figura 46A). Como control para normalizar las muestras, se utilizaron los oligonucleótidos del gen RPL31. Se ha descrito anteriormente que SPT6 es una proteína asociada a la ARN polimerasa II, a la cual puede unirse directamente mediante su dominio SH2 (Yoh et al. 2007). La Proteína Ribosomal L31 o RPL31, entre otros ARNs ribosomales y ARNs de transferencia, se transcribe mediante la ARN polimerasa III y por lo tanto, la transcripción de RPL31 no debería verse influenciada por SPT6, ya que dicho factor no viajaría durante la transcripción con esta ARN polimerasa. Los resultados mostraron que los niveles de transcritos del gen UBXD8 se veían drásticamente disminuidos tras la inhibición de SPT6, y dicha disminución se podía observar tanto en el clon 27 como en el clon A2 (Figuras 46B y 46C).

A Gen UBXD8



B



C

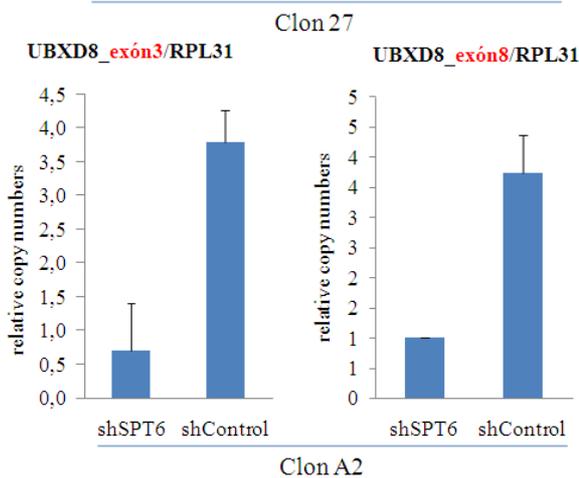
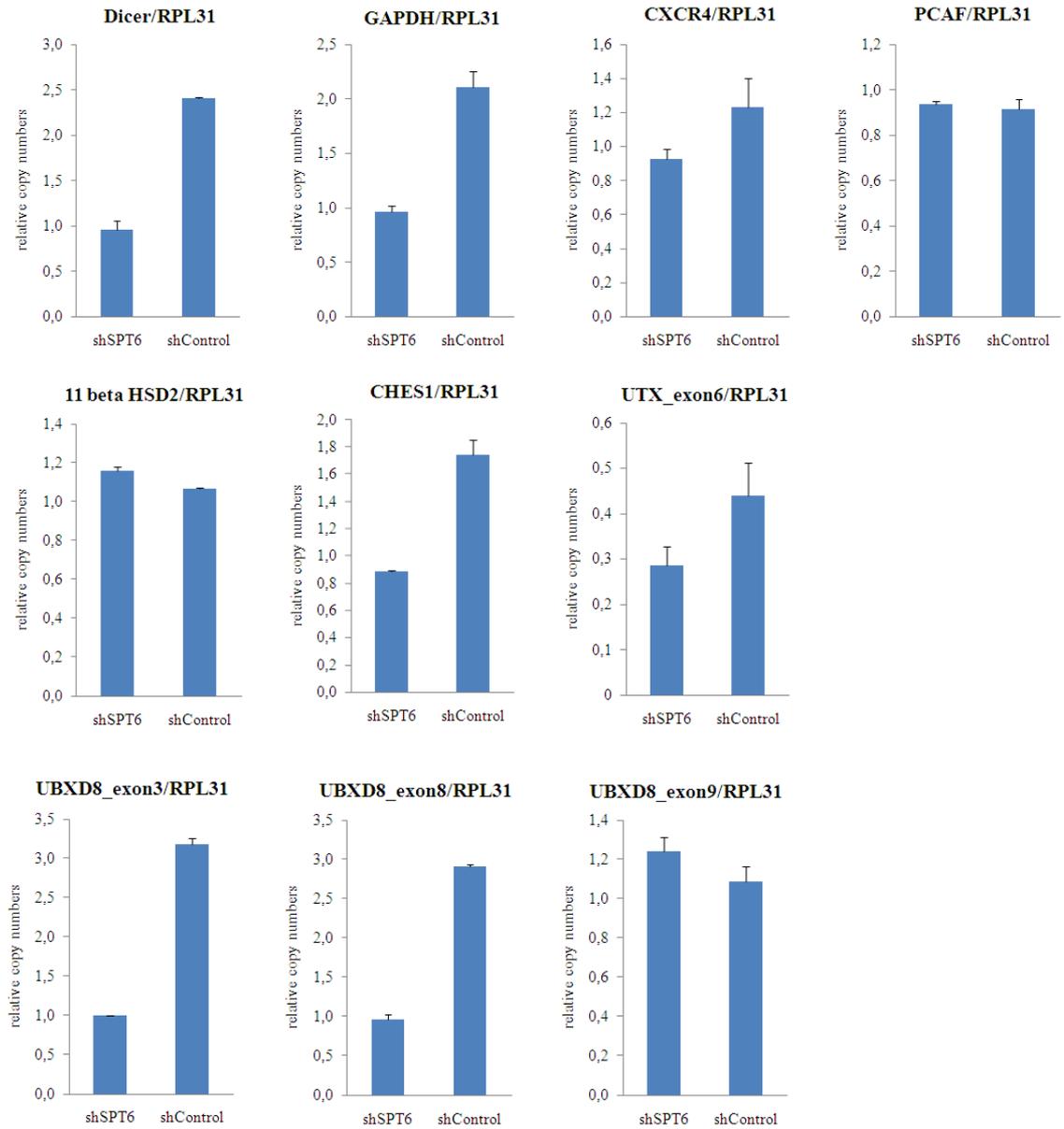


Figura 46. La depleción de SPT6 en células de los clones 27 y A2 disminuye la expresión del gen UBXD8. (A) Esquema de los oligonucleótidos específicos del gen UBXD8. En este experimento se utilizaron los oligonucleótidos del exón 3 y del exón 8. (B) y (C) El ARN de las células del clon 27 (B) y del clon A2 (C) que expresaban los shRNAs de SPT6 y shRNA Control fue utilizado en un RT-PCR con los oligonucleótidos de las regiones de UBXD8. Se utilizaron oligonucleótidos del gen RPL31 como control de carga. Los resultados se muestran como los datos para el gen UBXD8 en referencia al gen RPL31. Se presenta un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

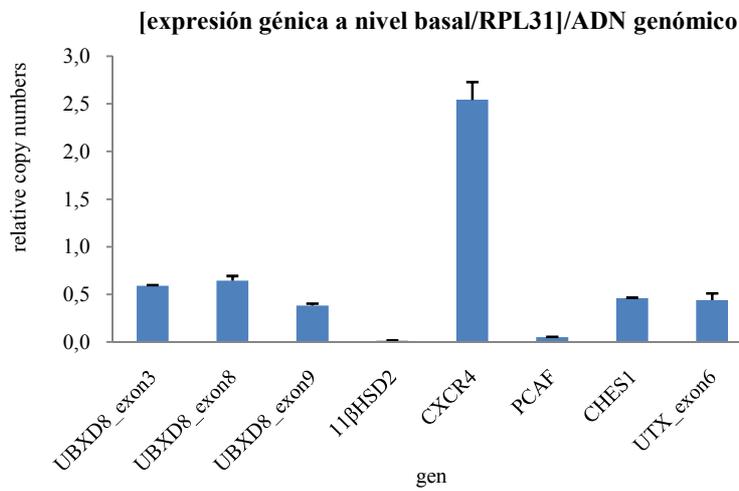
Tras haber comprobado que la transcripción del gen UBXD8 se veía afectada tras la depleción de SPT6, nos propusimos analizar la expresión de un conjunto de genes, con el fin de verificar si este efecto solo se producía en un grupo reducido de genes (entre los que se encontraba el gen UBXD8) o si por el contrario era un efecto global en la transcripción génica dependiente de ARN polimerasa II. Para dicho objetivo se eligieron los genes 11 beta hidroxio-esteroide deshidrogenasa 2 (11beta HSD2), DICER, GAPDH, CXCR4, PCAF, CHES1 y UTX (región del exón 6), juntamente con 3 zonas del gen UBXD8 de nuevo (exón 3, exón 8 y exón 9, véase Figura 47A), genes con funciones dispares dentro de la célula. Se llevó a cabo una PCR a tiempo real con las muestras de ADNc de células del clon 27 expresando el shRNA de SPT6 y shRNA Control y se utilizó el gen RPL31 como control para normalizar las cantidades de las muestras. Los resultados de este experimento mostraron que la expresión de la gran mayoría de los genes testados se veía disminuida en las células en que se había deplecionado la proteína SPT6 (Figura 47A). Del total de 10 oligonucleótidos utilizados, solo la expresión de los genes 11beta HSD2, PCAF y UBXD8_exón9 en las células expresando el shRNA de SPT6 era prácticamente igual al shRNA Control (Figura 47A). A continuación, se analizó el nivel basal de expresión de los genes 11beta HSD2, CXCR4, PCAF, CHES1, UTX y UBXD8 en el clon 27. Para tal fin, se utilizó la muestra del clon 27 expresando el shRNA Control, muestra que nos permitiría conocer el nivel basal de los genes en estas células. Se utilizaron los valores obtenidos en la PCR a tiempo real de cada uno de los genes utilizando el ADNc y se pusieron en relación a los valores obtenidos en la misma PCR con el ADN genómico. De esta manera se pudieron comparar los niveles de expresión de los genes entre sí. El resultado mostraba diferentes niveles de expresión génica, siendo CXCR4 el gen mayormente expresado en estas células y los genes 11beta HSD2 y PCAF los que tenían un nivel de expresión más bajo,

casi hasta niveles indetectables (Figura 47B). En el momento en que se comparó la expresión génica de las muestras del clon 27 expresando el shRNA de SPT6 y el shRNA Control corrigiendo con la PCR a partir de ADN genómico, se pudo observar que los genes 11beta HSD2 y PCAF no mostraban ninguna diferencia en cuanto a niveles de expresión en ambas muestras, probablemente debido a que su expresión es prácticamente indetectable (Figura 47C). En el caso del gen UBXD8, utilizando los oligonucleótidos en el exón 9, exón inmediatamente posterior a la integración del promotor del HIV, se pudo ver que había un pequeño incremento en la expresión del gen en las células en las que se había deplecionado SPT6. En el resto de genes (CXCR4, CHES1, UTX y el gen UBXD8 en las zonas de los exones 3 y 8) se observó una disminución en la expresión génica en las muestras del clon 27 donde se había expresado el shRNA de SPT6 (Figura 47C). Tomando estos resultados en conjunto, se pudo concluir que al deplecionar la proteína SPT6 solo se estaba afectando negativamente la expresión de los genes transcripcionalmente activos. Aquellos genes como el 11beta HSD2 o PCAF cuya expresión es muy baja o prácticamente indetectable a nivel basal en estas células, no se ven influenciados por la inhibición de SPT6. Este hecho confirma que SPT6 es un factor necesario durante el proceso de transcripción de los genes y su inhibición provoca una disminución en la expresión de los genes que se están transcribiendo. Por otra parte, el aumento en la expresión de la zona del exón 9 del gen UBXD8 en la muestra del shRNA de SPT6 (aunque las zonas del exón 3 y 8 muestran una disminución en la expresión) posiblemente es debido al hecho que tras la depleción de SPT6 no solo se desreprima el promotor del HIV 5'LTR sino también el promotor presente en el 3'LTR, aparte de que parte de la transcripción empezando en el 5'LTR puede no estar deteniéndose completamente en el poli-A presente en el 3'LTR (tal y como ocurre al tratar las células con un activador del promotor del HIV, véase Figura 23D). Como hemos descrito, la activación del promotor del HIV en los LTR conlleva la síntesis de transcritos que contienen regiones (intrones y exones) del gen huésped en la zona corriente abajo al lugar de integración del provirus.

A



B



C

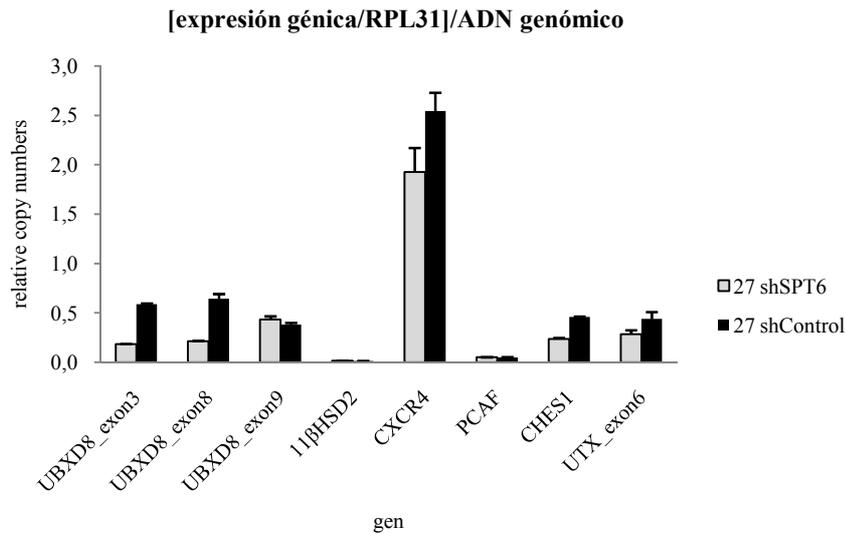
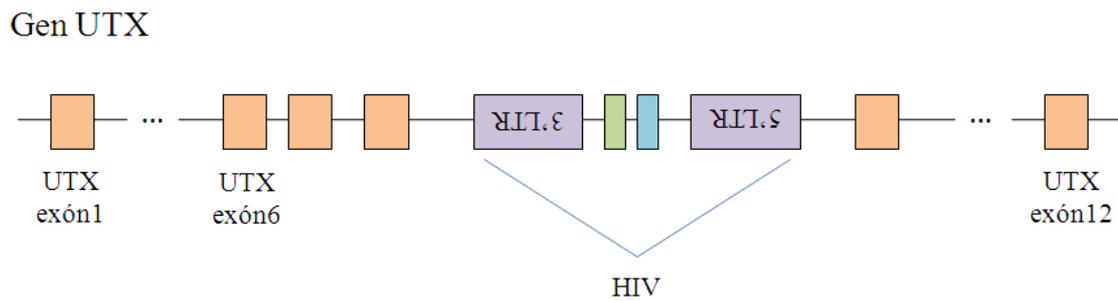


Figura 47. La depleción de SPT6 disminuye la expresión de los genes transcripcionalmente activos pero no tiene ningún efecto sobre los que tienen una expresión basal baja. (A) El ARN de las células del clon 27 expresando el shRNA de SPT6 o shRNA Control se utilizó para llevar a cabo una RT-PCR a tiempo real con la finalidad de detectar la expresión de ocho genes (11beta HSD2, DICER, GAPDH, CXCR4, PCAF, CHES1, UTX y UBXD8). Se analizaron los niveles de transcritos del gen UBXD8 en tres zonas distintas, dos de ellas anteriores a la integración del promotor del HIV (exón 3 y 8) y una de ellas posterior a la integración (exón 9). Los datos se representan como niveles de transcrito de cada gen en referencia al gen RPL31. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos. **(B)** La expresión génica a nivel basal fue analizada en varios genes. Los datos se muestran como niveles de transcrito de cada gen en relación al transcrito de RPL31 y todo ello en relación a la PCR con el ADN genómico del clon 27 utilizando los oligonucleótidos para el gen de interés. **(C)** Se observa la expresión génica de las muestras del clon 27 expresando los shRNAs de SPT6 y shRNA Control. Los datos se representan como los niveles de transcrito del gen en relación a RPL31 y todo ello en relación al valor de la PCR obtenido con el ADN genómico del clon 27 y utilizando los mismos oligonucleótidos para el gen de interés. Se muestra un experimento representativo de un total de 2 experimentos.

A continuación se llevó a cabo un estudio de la expresión de los genes UBXD8 y UTX en las células del clon A2 que expresaban los shRNAs de SPT6 y shRNA Control, análisis que se realizó de igual manera que se había procedido con el clon 27. Se analizaron tres zonas del gen UTX, dos de ellas anteriores a la integración del promotor del HIV en este clon, y la tercera en la zona posterior (Figura 48A). Se pudo observar de nuevo que la depleción de SPT6 afectaba la expresión de ambos genes, expresión que se veía disminuida respecto a su expresión basal (Figura 48B).

A



B

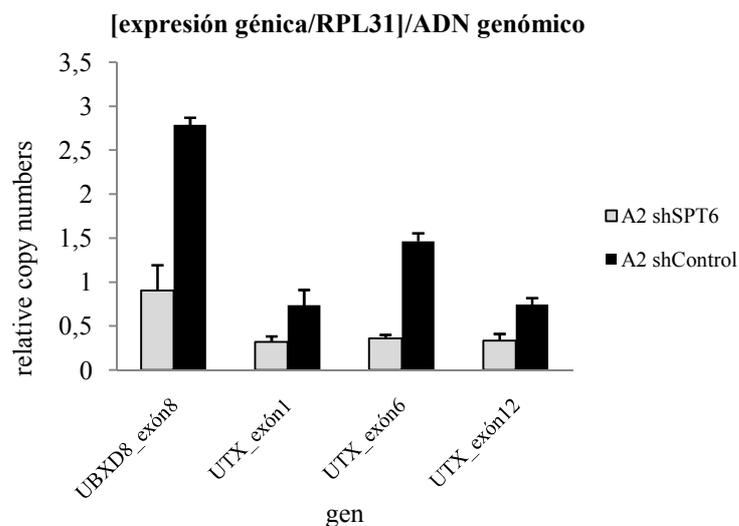


Figura 48. La depleción de SPT6 en el clon A2 disminuye la expresión génica. (A) Esquema de la localización de los oligonucleótidos específicos del gen UTX. **(B)** La expresión génica de UTX (exones 1, 6 y 12) y UBXD8 de las muestras del clon A2 expresando los shRNAs de SPT6 y shRNA Control se muestra como los niveles de transcrito del gen en relación a RPL31 y este valor en relación a la PCR con el ADN genómico del clon A2. Se muestra un experimento representativo de un total de 2 experimentos.

5.1.7. Relación entre los niveles de expresión del gen huésped y los del provirus del HIV integrado

Hasta el momento hemos descrito que la depleción de SPT6 provoca un aumento en la expresión de HIV cuando éste se encuentra integrado en intrones de genes transcripcionalmente activos. Tenemos dos modelos principales para explicar este hecho:

1. SPT6 viajaría con al ARN polimerasa II y estaría jugando un papel de represor mediando el cierre de la cromatina tras el paso de la polimerasa por el ADN. Así

pues, la ausencia de SPT6 (u otros miembros de la maquinaria de reensamblaje de la cromatina co-transcripcional) haría que la transcripción del gen huésped dejase tras el tránsito de la ARN polimerasa II una cromatina mal compactada o más relajada de lo normal, lo cual podría permitir el acceso de factores de transcripción al promotor del HIV.

2. La ausencia de SPT6 afecta la transcripción de genes dependientes de ARN polimerasa II. Al disminuir su expresión disminuiría el fenómeno de interferencia transcripcional sobre el promotor del HIV. Así pues, el HIV, el cual se comportaría como un promotor críptico en estado basal de las células, sería reactivado tras la disminución de la expresión del gen huésped mediada por la inhibición de SPT6.

Una manera de investigar si esta segunda posibilidad es correcta es intentar alterar la expresión del gen huésped (UBXD8 en el clon 27) por otros medios para ver si hay siempre una relación inversa entre los niveles de expresión del gen huésped y el HIV integrado. También sería posible que esta relación ocurriese al revés, es decir, que al inducir el HIV se viese afectada a la baja la expresión del promotor del gen huésped corriente arriba.

Tal y como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que el gen UBXD8 es capaz de activarse mediante el tratamiento con PMA e Ionomicina (Imai et al. 2002). Dicha activación se observó en nuestros experimentos previos no solo al combinar PMA e Ionomicina sino también con un tratamiento del agente mitogénico PMA (véase Figura 16). Éste no era un tratamiento muy útil para estudiar los efectos de la inducción del gen huésped sobre la expresión del HIV integrado, puesto que PMA también induce el promotor viral. Como alternativa, nos propusimos disminuir la cantidad de agentes mitogénicos en el medio de cultivo, creciendo las células en medio sin suero. Suponíamos que esto alteraría a la baja la expresión del UBXD8. Con este crecimiento en medio sin suero, queríamos simular una expresión génica de UBXD8 similar a la observada en las células deplecionadas para SPT6, es decir, queríamos disminuir la expresión del gen UBXD8 con la finalidad de conocer si al disminuir la actividad transcripcional del gen se podía observar algún efecto de desrepresión en el HIV, la cual cosa demostraría que el gen activo estaría influenciando negativamente en la expresión del HIV.

Las células del clon 27 fueron sembradas en medio con suero y sin suero (arrestadas) durante 48 horas, tras lo cual se analizó la desrepresión del promotor del HIV, tanto por porcentaje de GFP como por intensidad de fluorescencia MFI. Los datos mostraron una clara reactivación del promotor en aquellas células que no contenían suero en el medio (Figura 49A). El ARN de ambas condiciones se extrajo y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para los exones 3, 8 y 9 del gen UBXD8. Se observó que en las muestras del clon 27 crecido en medio sin suero, la expresión de las diferentes partes del gen UBXD8 se veía disminuida en comparación con las células creciendo en medio normal (Figura 49B). Al comparar la expresión de otro gen, como es el caso de CXCR4, se vio que este gen también se veía afectado por la ausencia de suero en el medio de cultivo (Figura 49C). En experimentos anteriores se había observado que la desrepresión del promotor del HIV debida a la depleción de SPT6 no solo se daba a nivel del 5'LTR sino también se veía un ligero aumento de la transcripción en el promotor localizado en el 3'LTR y que se traduciría en un aumento de la expresión de exones de UBXD8 posteriores al HIV (véase Figura 47C). Este hecho no se veía en el caso de las células con medio sin suero (Figura 49B, exón 9). Para corroborar este hecho se realizaron dos PCRs, la primera para comprobar la expresión del promotor presente en el 5'LTR (oligonucleótidos 8+9), y la segunda con un oligonucleótido de la región U5 del LTR y otro oligonucleótido en la zona intrónica del UBXD8 justamente posterior a la integración del HIV. Los resultados mostraron que la activación del promotor del HIV se produce a nivel del 5'LTR pero los niveles de expresión a nivel del 3'LTR son prácticamente indetectables y no hay inducción mediada por el arresto de las células (Figura 49D). Esto explicaría que en este caso no veamos inducción (o ausencia de inhibición) en medio sin suero en el exón 9 de UBXD8 corriente abajo del provirus.

Estos resultados podrían indicar que en efecto al disminuir la expresión del gen huésped (en ausencia de suero), disminuía la interferencia transcripcional y el HIV aumentaba su expresión. Pero también podría haber un efecto directo de la composición del medio de cultivo sobre la capacidad de activación del promotor del HIV.

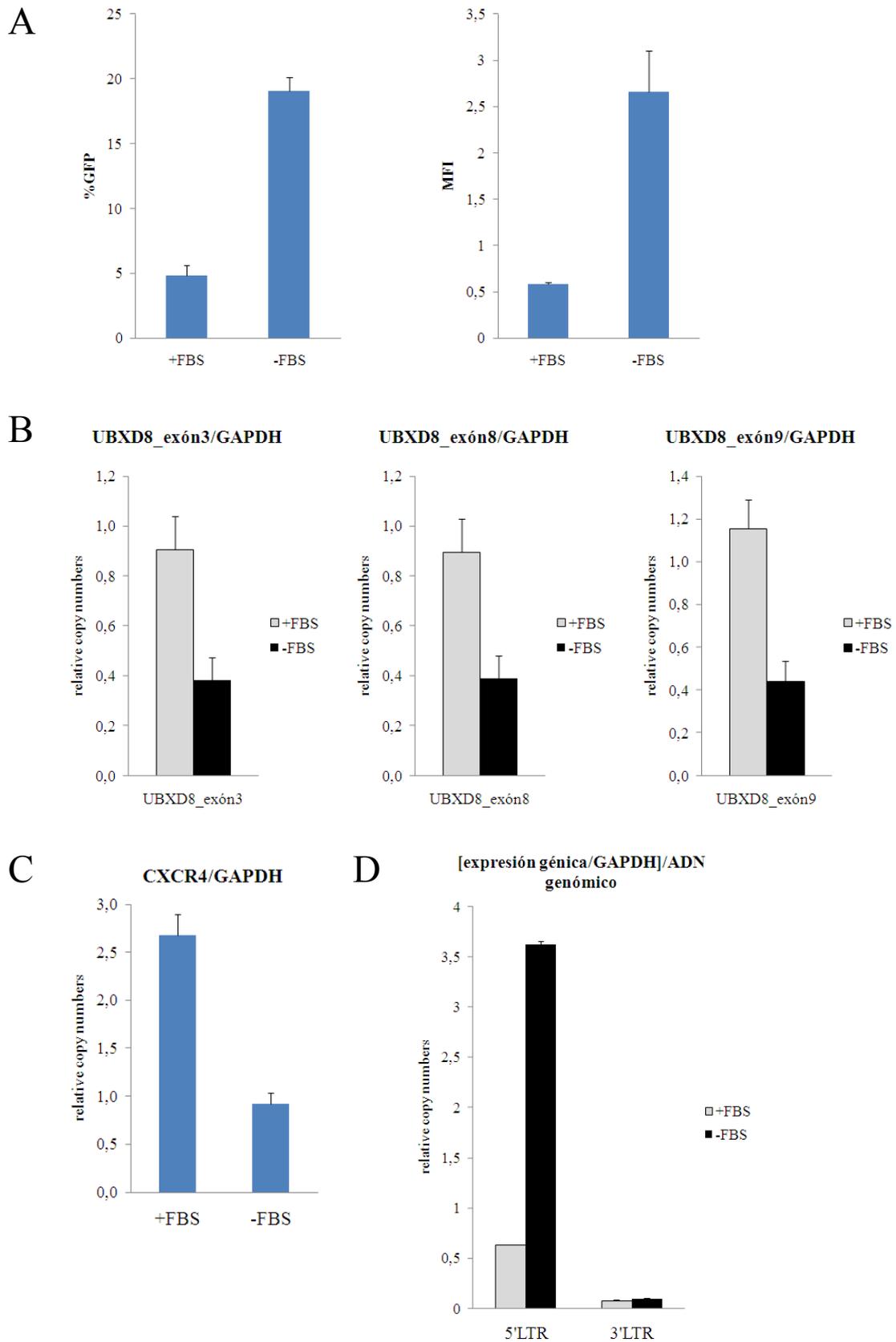


Figura 49. El promotor del HIV en células del clon 27 se desreprime tras su crecimiento en un medio sin suero. (A) Las células del clon 27 fueron crecidas en medio sin suero (-FBS) o en medio normal con suero (+FBS) durante 48 horas. Se analizaron el porcentaje de expresión de GFP (izquierda) y

la intensidad de fluorescencia (derecha) tras este periodo de tiempo. Se muestra un experimento de al menos tres experimentos representativos. **(B)** El ARN de las células del clon 27 creciendo en medio con y sin suero (+FBS y -FBS respectivamente) fue extraído y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos de 3 regiones del gen UBXD8, regiones localizadas en los exones 3, 8 y 9. Los datos se muestran como los valores de expresión de cada zona del gen respecto a GAPDH como control de carga. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes. **(C)** Se utilizaron oligonucleótidos para el gen CXCR4 para conocer su expresión génica en las muestras del clon 27 crecido en medio con y sin suero. Los datos se muestran como la expresión génica de CXCR4 en referencia a GAPDH. **(D)** Se calcularon los niveles de desrepresión del promotor del HIV situado en el 5' LTR y en el 3'LTR. Los datos se muestran como los valores utilizando los oligonucleótidos específicos de 5' ("8+9") y de 3'LTR ("8+10") en referencia a GAPDH y todo ello en referencia a la misma PCR con ADN genómico del clon 27 con el fin de poder comparar las cantidades de transcritos.

El siguiente paso fue repetir el mismo experimento con dos clones latentes diferentes, para comprobar si el efecto observado para el clon 27 era específico de este clon o si ocurría de igual manera en varios clones. Para ello se eligieron los clones A2 y H2, los cuales fueron sembrados en medio con suero y sin suero durante 48 horas, periodo tras el cual se extrajo el ARN y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos tanto para el gen UBXD8 como para detectar la expresión del HIV (oligonucleótidos 8+9). Los resultados mostraron que el promotor del HIV se estaba induciendo en ambos clones pero los niveles de expresión del gen UBXD8 eran iguales en las células creciendo en medio normal que en medio sin suero (Figura 50).

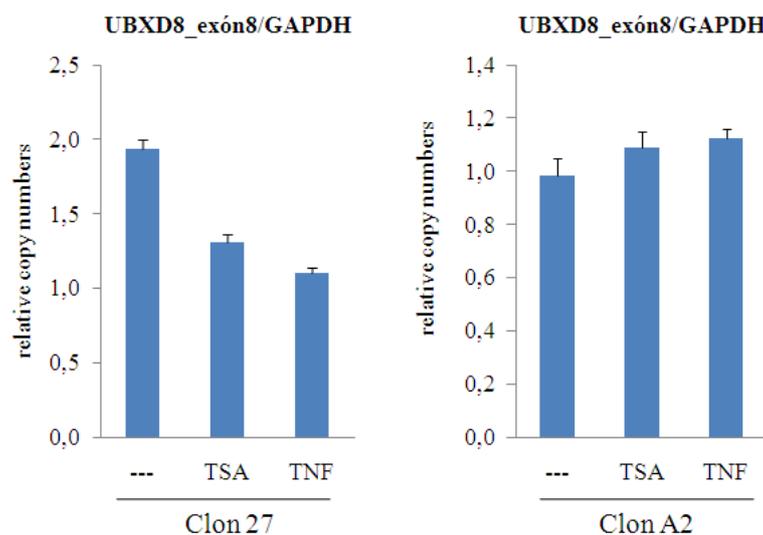


Figura 50. El medio sin suero estimula el HIV en los clones A2 y H2 pero la expresión del gen UBXD8 no varía. El ARN de los clones A2 y H2 creciendo en medio con suero (+FBS) y sin suero (-FBS) fue extraído y utilizado en una RT-PCR con oligonucleótidos para detectar la expresión del HIV en

el promotor del 5'LTR (izquierda) y con oligonucleótidos para el gen UBXD8 (exón 8). Los datos se muestran como los niveles de transcrito respecto a GAPDH.

Poniendo en conjunto todos estos resultados pudimos concluir que el hecho de arrestar las células por falta de suero activaba de algún modo el promotor del HIV latente de manera independiente del lugar de integración. Este hecho se demostraba al observar desrepresión del promotor en 3 clones diferentes al crecerlos en medio sin suero. Esta reactivación se producía a nivel del promotor localizado en el 5'LTR pero no en el 3'LTR. En cambio, contrariamente a lo esperado, UBXD8 no responde a la ausencia de suero en todos los clones. El otro punto que se pudo concluir de este experimento fue que posiblemente el hecho de que se desreprima el HIV en el clon 27 creciendo en medio sin suero es el responsable de la disminución en la expresión del gen UBXD8 en este clon ya que en otros clones no se observa esta disminución del gen UBXD8.

Con el fin de corroborar el hecho que en el clon 27 la expresión del promotor del HIV esté disminuyendo la expresión del gen UBXD8, se trataron células de los clones 27 y A2 con TNF durante 16 horas y la expresión génica de UBXD8 se midió mediante PCR a tiempo real. Los datos indicaron que la expresión del gen UBXD8 solo disminuía tras la inducción del HIV en el caso del clon 27, pero no del clon A2 (Figura 51). Este resultado apoyaría nuestra observación que en el clon 27, la expresión del HIV afecta negativamente la expresión del gen donde está integrado el HIV. Esto demostraría que la interferencia transcripcional puede ser bidireccional, del promotor HIV sobre el gen huésped. Pero hasta el momento no hemos sido capaces de alterar la expresión de UBXD8 con agentes químicos para poder estudiar su efecto sobre el provirus.

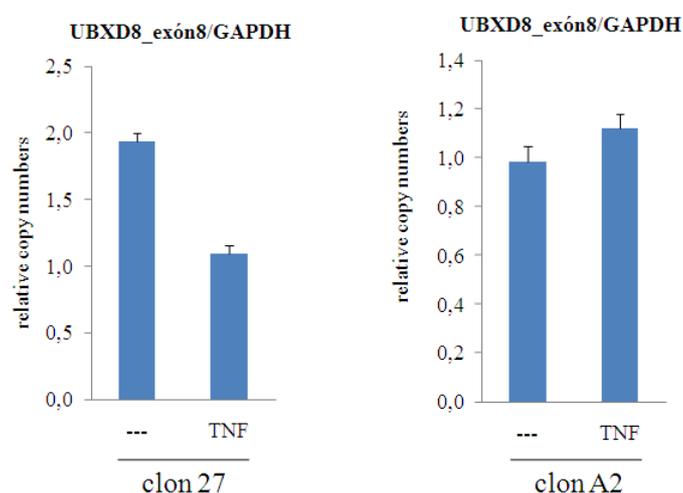


Figura 51. La expresión del HIV mediante el tratamiento con TNF disminuye la expresión del gen UBXD8 en el clon 27, pero no en el clon A2. Las células de los clones 27 y A2 se trataron con TNF durante 24 horas, tiempo tras el cual se extrajo el ARN y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos del exón 8 del gen UBXD8. Los datos se muestran como la expresión del gen UBXD8 en referencia a GAPDH como control de carga.

Con la finalidad de conocer qué cantidad de transcrito salvaje (eliminando el intrón que contiene el HIV) del gen UBXD8 se está formando en el clon 27 tras la inducción del promotor viral, las células de dicho clon se trataron con TNF, TNF HMBA y HMBA, y tras 24 horas de tratamiento se hizo una RT-PCR a tiempo real utilizando un par de oligonucleótidos en los exones 8 (anterior a la integración) y 9 (posterior a la integración). Se pudo observar que el tratamiento con TNF o TNF HMBA estaba afectando negativamente la formación del transcrito salvaje, debido a un efecto negativo de la activación del HIV sobre la expresión del gen endógeno (Figura 52). Tanto el TNF como el HMBA pueden reactivar el promotor viral latente hasta niveles de GFP entre 60 y 90% (véase Figura 24C).

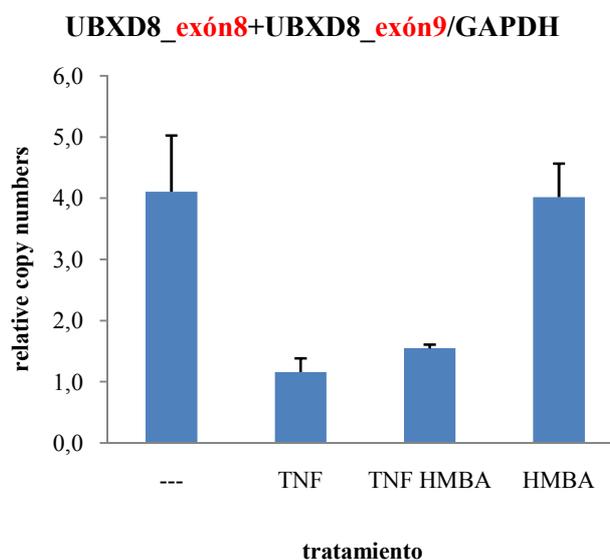


Figura 52. La activación del promotor del HIV disminuye la expresión de transcrito salvaje del gen UBXD8. Las células del clon 27 fueron tratadas con TNF, TNF+HMBA y HMBA durante 24 horas, periodo tras el cual se extrajo el ARN de las células y se usó para hacer una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos situados antes y después de la integración del HIV en el genoma. Se muestran los datos de los valores de la PCR en relación a los valores obtenidos con GAPDH como control de carga.

5.1.8. Efectos a corto plazo de la inhibición de SPT6 sobre la expresión de HIV y UBXD8

Los experimentos anteriores habían mostrado que tras la depleción de SPT6 se observaba un aumento en la expresión del HIV y una disminución a nivel global de la expresión de los genes transcripcionalmente activos. A continuación nos propusimos estudiar si tras la depleción de SPT6 se producía primero una disminución de la expresión del gen UBXD8 la cual cosa llevaría a una menor interferencia transcripcional del gen huésped sobre el HIV, o si por el contrario, la inhibición de SPT6 promovería un estado de la cromatina más laxo por falta de reensamblaje de los nucleosomas que activaría el promotor latente viral.

En un primer experimento para dilucidar cuál de estas dos hipótesis era la que estaba promoviendo la desrepresión del promotor viral latente se analizó el efecto de la inhibición de SPT6 sobre la expresión del gen UBXD8 y del HIV a corto plazo con el fin de conocer si se producía primero una disminución de la expresión del gen huésped y la consecuente reactivación del HIV o si primero se desreprimía el promotor viral latente debido al estado de la cromatina relajada.

Para ello, se infectaron las células del clon 27 con el shRNA de SPT6 y el shRNA Control y se extrajo el ARN de las células que habían sido seleccionadas durante un día y dos días con Puromicina. El ARN se utilizó en una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos que detectaban la depleción de SPT6, y las expresiones del promotor viral y del gen huésped. Los resultados mostraron que en la muestra del primer día ya se podía observar la inhibición de SPT6 (Figura 53A). Durante el primer día tras la adición de Puromicina, se observó que no había expresión del promotor viral, y la expresión del gen UBXD8 tenía los mismos niveles tanto en las células expresando el shRNA de SPT6 como las que expresaban el shRNA Control. En cambio, en el segundo día se observó un aumento en la expresión del promotor viral, aunque el gen UBXD8 seguía expresándose a unos niveles similares en ambas muestras (Figuras 53B y 53C). Estos datos mostraron que tras la depleción de la proteína SPT6, el promotor latente se desreprimía antes de empezar a disminuir la expresión del gen UBXD8. Este hecho, favorecía la hipótesis de un papel de SPT6 en el cierre de la cromatina tras el paso de la ARN polimerasa, función que se vería alterada tras la depleción de SPT6 y que

conllevaría un estado de la cromatina más relajado, permitiendo la activación del promotor viral por factores de transcripción celulares.

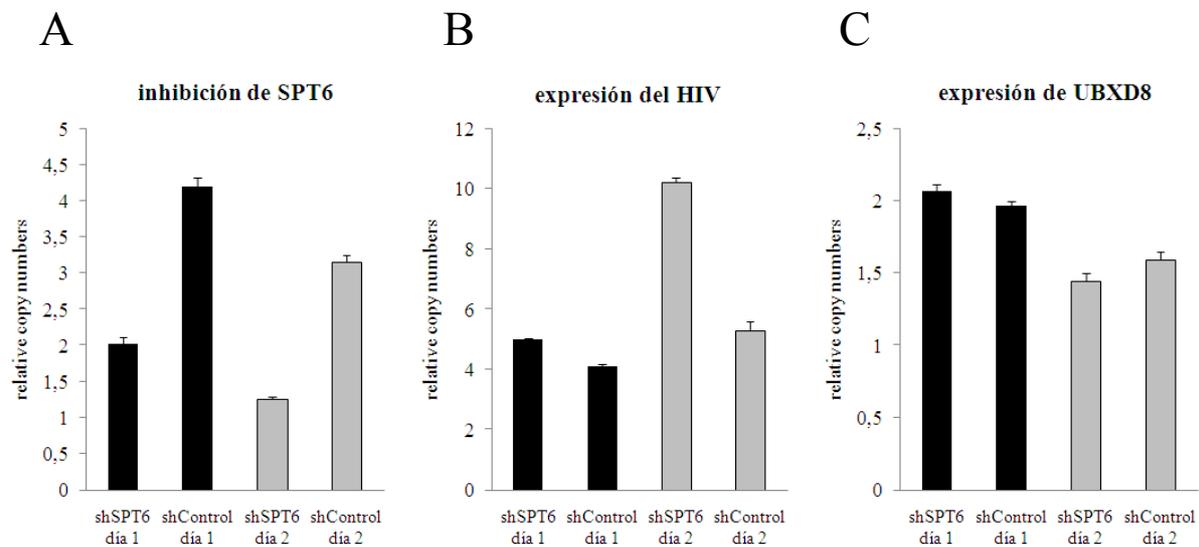


Figura 53. La activación del promotor del HIV tras la depleción de SPT6 precede a la disminución de la expresión del gen UBXD8. Las células del clon 27 fueron infectadas con los shRNAs de SPT6 y el shControl. Tras un día y dos días de tratamiento de selección con Puromicina, el ARN de las células a dichos tiempos fue extraídos y utilizado para hacer una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para detectar la depleción de SPT6 (A), la expresión del promotor viral (B) y la expresión del gen huésped UBXD8 (C). Los valores con cada uno de los oligonucleótidos específicos fue puesto en relación a los valores para el transcrito de RPL31, para normalizar las muestras.

5.1.9. Análisis mediante digestión con mononucleasa del efecto de la depleción de SPT6 sobre la estructura cromatínica del promotor viral integrado

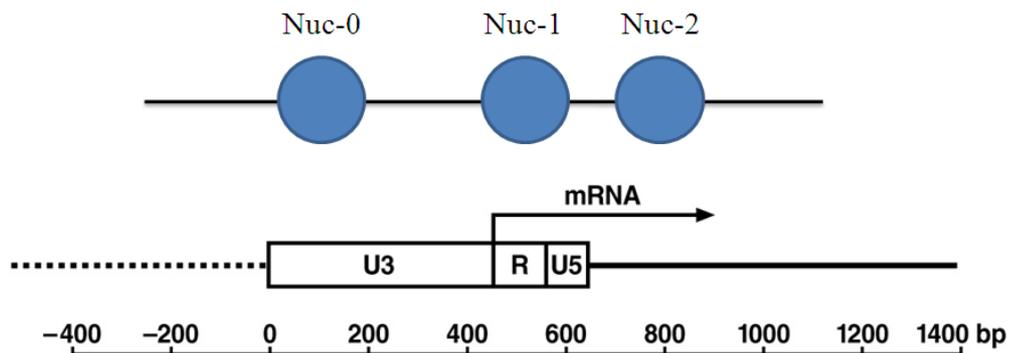
En un segundo experimento nos propusimos conocer el estado de la cromatina y la localización de los nucleosomas en el promotor viral latente tras la depleción de SPT6. En el caso de que la inhibición de SPT6 promueva la relajación de la cromatina tras el paso de la ARN polimerasa II, los nucleosomas situados en el promotor vírico se verían alterados, el ADN sería más accesible y se promovería la desrepresión del promotor del HIV.

Para conocer el estado de la estructura de la cromatina y la localización de los nucleosomas se utilizó la enzima Nucleasa Micrococcal o MNasa, la cual es capaz de digerir el ADN situado en las zonas de espaciamento entre nucleosomas, pero en cambio, no puede digerir el ADN presente en los mismo nucleosomas. Es por esta razón

que las regiones resistentes al corte de la MNasa muestran la localización de los nucleosomas y las regiones sensibles muestran las regiones libres de nucleosomas. Este hecho nos permite conocer, al analizar mediante PCR y amplicones cortos, qué porciones de ADN son resistentes o sensibles a la MNasa, donde se encuentran los nucleosomas y cuál es el efecto sobre la cromatina de un tratamiento determinado.

Históricamente se han representado los nucleosomas 0, 1 y 2 en los nucleótidos 40-200 de la región U3 (Nuc-0), 452-596 en la región R, coincidiendo con el principio de la transcripción del virus (Nuc-1), y en los nucleótidos 720-860 tras el LTR viral (Nuc-2) (Verdin et al. 1993) (Figura 54A). En nuestro estudio, se utilizaron una serie de oligonucleótidos que cubrían toda la región de estos nucleosomas 0, 1 y 2 y las regiones espaciadoras entre ellos, dando lugar a amplicones pequeños que se solapaban entre sí (Figura 54B).

A



B

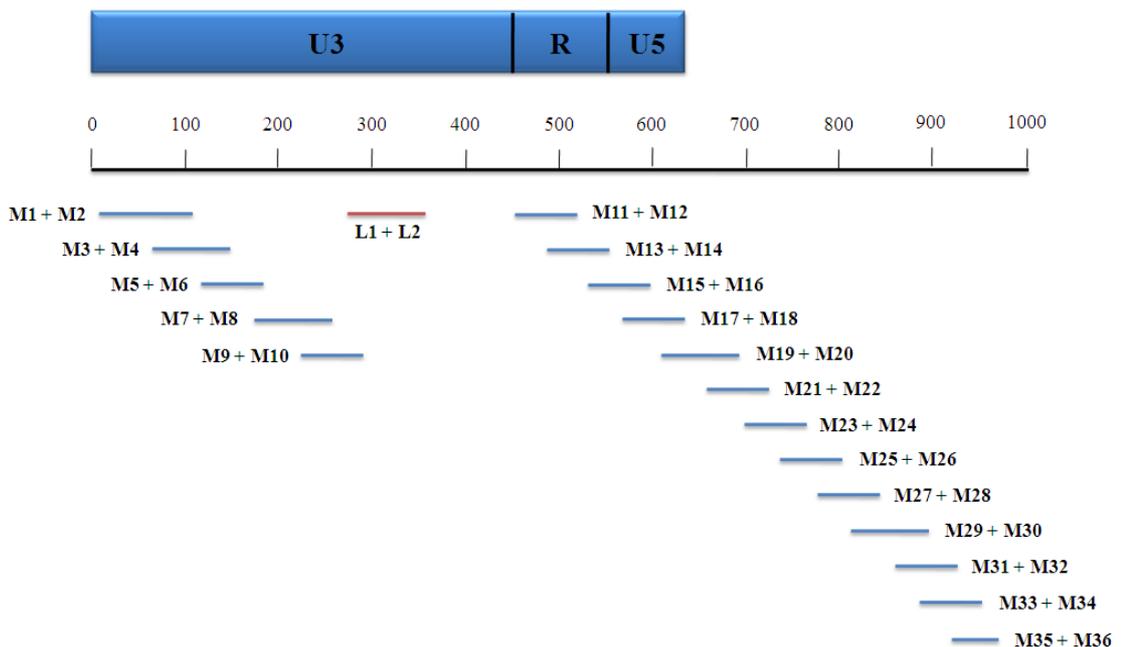


Figura 54. Posicionamiento de los nucleosomas en la secuencia viral y distribución de los oligonucleótidos utilizados en el experimento. (A) Se muestran los nucleosomas 0, 1 y 2 y su localización dentro de la secuencia del virus, según Verdin et al. 1993 **(B)** Los oligonucleótidos utilizados en el experimento y la longitud del amplicón que producen se muestran en la figura. Los oligonucleótidos se nombraron como M1-M36, y el par de oligonucleótidos utilizados como control y que están situados en la secuencia espaciadora entre el nucleosoma 0 y 1 se nombraron como L1 y L2.

La cromatina de las células del clon 27 infectadas con los shRNAs de SPT6 y shRNA Control se digirió con MNasa, se purificó el ADN correspondiente a los mononucleosomas y se analizó el posicionamiento de los mismos, medido por la resistencia al corte de la enzima, mediante PCR a tiempo real. Células del clon 27 también se trataron durante 4 horas con PMA, TSA y TNF y se analizó el posicionamiento de los nucleosomas, como control positivo del efecto que tiene la activación del promotor viral en el desplazamiento de sus nucleosomas.

En estos experimentos, la cromatina digerida con MNasa se corre en un gel de agarosa. Los mononucleosomas obtenidos se cortan y se purifican del gel, y se utiliza este ADN en una PCR a tiempo real con los oligonucleótidos mencionados. Como control de carga se utiliza el valor de la PCR a tiempo real de cada muestra utilizando unos oligonucleótidos presentes en la región espaciadora entre el nucleosoma 0 y 1, debido a que el corte con MNasa en esta región debería ser igual en todas las muestras, y por lo tanto, las diferencias que se puedan observar se deben a la diferente cantidad de ADN de dichas muestras. Como control para normalizar las PCRs, los valores se pusieron en relación a un ADN genómico desnudo digerido con MNasa, el cual se debe cortar de manera homogénea debido a la ausencia de nucleosomas en dicho ADN.

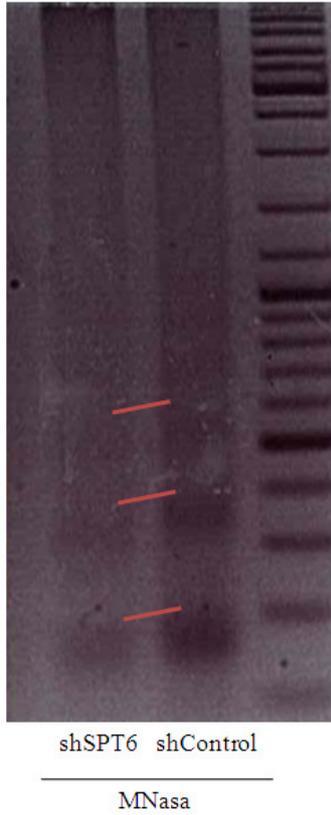
Al correr en un gel de agarosa la cromatina digerida con MNasa de las células expresando el shRNA de SPT6 y Control se observó una disminución en el espaciamiento entre los nucleosomas en las células deplecionadas para SPT6 (Figura 55A). Los mononucleosomas de las muestras fueron utilizados en una PCR a tiempo real utilizando los oligonucleótidos específicos de cada zona del LTR viral y regiones corriente abajo del LTR. En la región del nucleosoma 0 (Nuc-0) se observó la presencia de dicho nucleosoma en los nucleótidos 180-250 de la región U3 debido a un pico máximo de resistencia a la MNasa visto con los oligonucleótidos M7+M8. Este nucleosoma parece estar desplazado hacia regiones corriente abajo del promotor viral, ya que históricamente se lo había descrito en los nucleótidos 40-200. En las muestras de

los shRNAs de SPT6 y Control se observó dicho nucleosoma y no se observaban grandes diferencias entre ambas muestras a nivel de valores de resistencia a MNasa, aunque parece ser que la región del nucleosoma tras la depleción de SPT6 es menos extensa. En el caso de las células control sin tratar o tratadas con PMA+TSA+TNF se vio que el nucleosoma estaba posicionado en la misma región en los nucleótidos 180-250 (Figura 55B).

En la región del nucleosoma 1 (Nuc-1) se pudo ver que la protección con la MNasa cubría una región que iba desde el nucleótido 570 hasta el 850, región que se encuentra en una posición más corriente abajo de lo esperado (Figura 55C y 55D, oligonucleótidos M17 hasta M28). El hecho que la protección a la enzima cubría una región muy amplia nos hizo pensar en la posibilidad de la presencia de dos nucleosomas muy cercanos el uno al otro o bien que el nucleosoma 1 no esté del todo bien posicionado. La protección a la MNasa en esta región 570-850 desaparecía completamente tras el tratamiento con PMA+TSA+TNF, debido a la activación del promotor. En el caso de las células expresando el shRNA de SPT6, la resistencia a la MNasa era menor que las células expresando el shRNA Control. Este hecho indicaba una cromatina más abierta y más expuesta a la MNasa en aquellas células infectadas con el shRNA de SPT6. El hecho que no haya una sensibilidad total a MNasa en esta región, y por tanto tampoco una desaparición total del nucleosoma, correlaciona con el hecho que la activación del HIV con el shRNA de SPT6 no sea tan acusada como con el tratamiento con PMA+TSA+TNF (Figura 55C).

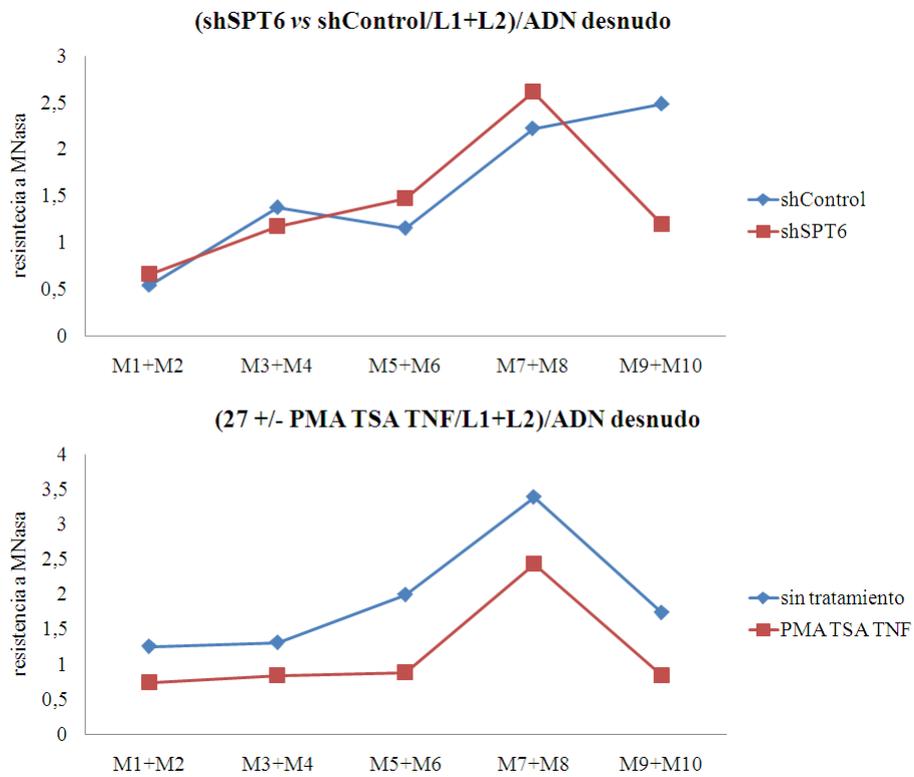
En el caso del nucleosoma 2 (Nuc-2) se observó el nucleosoma alrededor del nucleótido 900-950 (entre oligonucleótidos M32 y M36), o más allá. Tras tratar con PMA+TSA+TNF, este nucleosoma desaparecía completamente coincidiendo con la activación transcripcional del promotor viral, aunque anteriormente se había descrito que el nucleosoma 1 es el único que se altera tras la activación (Verdin et al. 2003). Las células expresando el shRNA de SPT6 disminuían su protección frente a la digestión con MNasa, la cual cosa vuelve a sugerir un ambiente más abierto de la cromatina tras la expresión de dicho shRNA (Figura 55D).

A



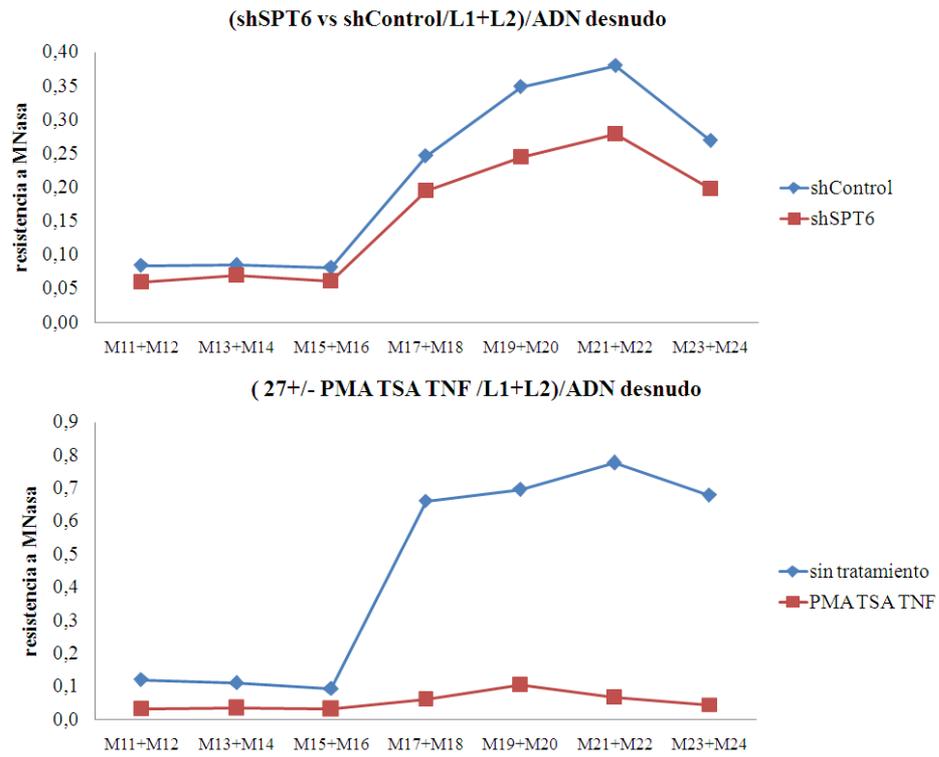
B

Nuc-0



C

Nuc-1



D

Nuc-2

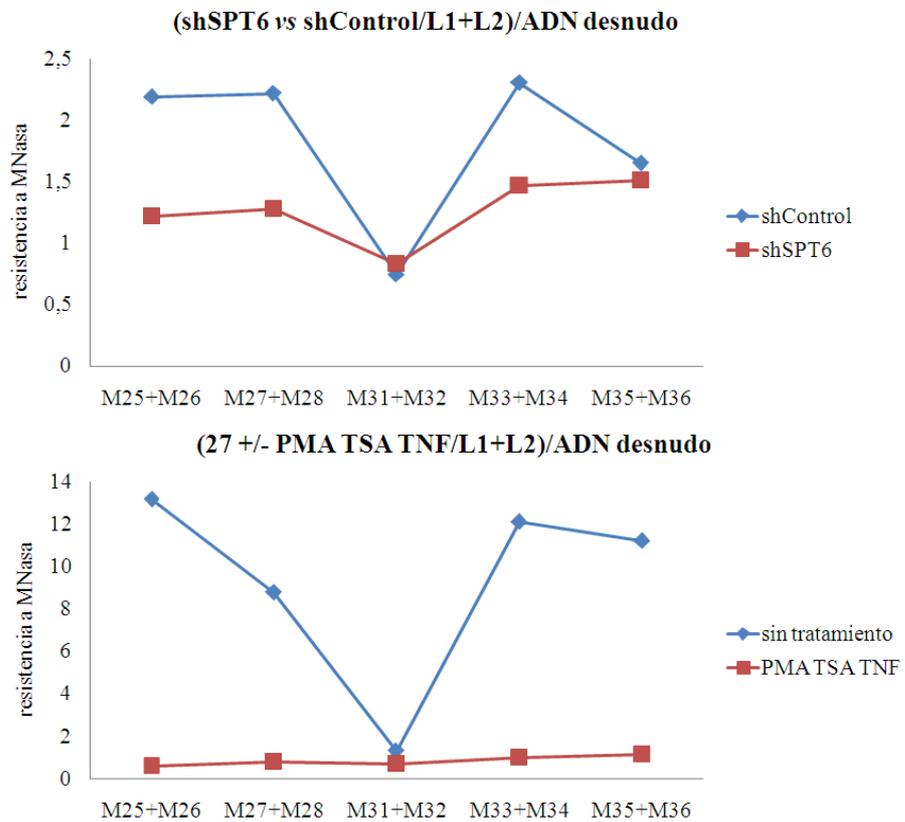
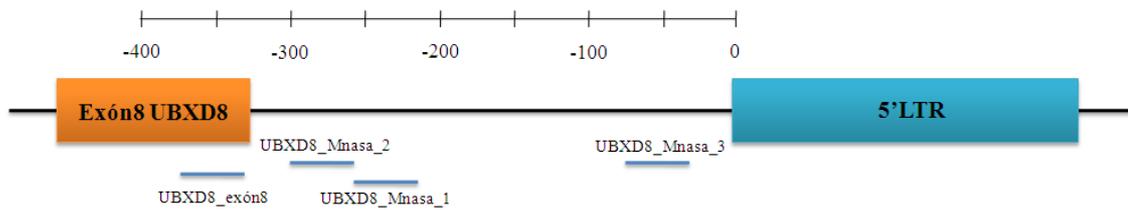


Figura 55. Los nucleosomas 1 y 2 están más abiertos y por tanto más expuestos a la digestión con MNasa en las células infectadas con el shRNA de SPT6 y sobre todo, en el caso de las las células tratadas con activadores. (A) Las células del clon 27 fueron infectadas con los shRNAs de SPT6 y el Control. Tras 7 días de selección con Puromicina la cromatina fue digerida con MNasa y se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. **(B) (C) (D)** Los mononucleosomas obtenidos tras la digestión con MNasa fueron utilizados en una PCR a tiempo real con oligonucleótidos cubriendo toda la región del LTR viral y regiones corriente abajo de la secuencia viral (M1-M36). Los valores obtenidos de cada PCR se pusieron en relación al valor obtenido con los oligonucleótidos L1+L2 (región espaciadora entre Nuc-0 y Nuc-1, utilizada como control de carga) y todo ello en relación a ADN genómico desnudo previamente cortado con MNasa.

Todos estos resultados sugieren una localización de los nucleosomas hacia regiones corriente abajo de donde se las había descrito previamente. También se ha podido observar que mientras el nucleosoma 0 no se ve afectado por el tratamiento con PMA+TSA+TNF o por el shRNA de SPT6, los nucleosomas posteriores a la región del +1 de la transcripción están más abiertos tras la infección de las células con el shRNA de SPT6 y desaparecen totalmente tras la desrepresión mediante activadores del promotor viral.

A continuación se quiso estudiar el estado de la cromatina en la región justamente anterior a la integración del promotor del HIV en el genoma tras la depleción de SPT6. Esta región sería indicativa del estado cromatínico del gen, la cual cosa mostraría si la cromatina se ha visto afectada tras la infección con el shRNA. Para ello se utilizaron 3 pares de oligonucleótidos en el intrón entre el exón 8 de UBXD8 y la integración del HIV, y un par dentro del exón 8 (Figura 56A). Al comparar la resistencia a MNasa de las células expresando el shRNA de SPT6 y el shRNA Control se pudo observar que la cromatina estaba más abierta en las células deplecionadas para SPT6, la cual cosa indicaba que la inhibición de esta proteína estaba afectando la estructura cromatínica no sólo del promotor viral sino también en el gen huésped, debido posiblemente al papel de este factor en el cierre co-transcripcional de la cromatina (Figura 56B).

A



B

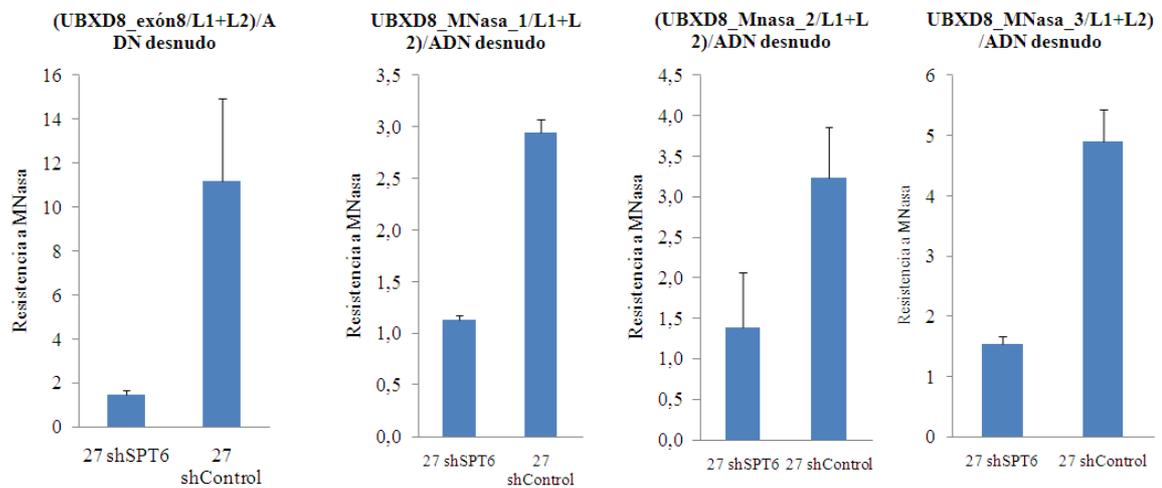


Figura 56. La expresión del shRNA de SPT6 produce un ambiente más relajado de la cromatina, permitiendo un mayor acceso a la MNasa. (A) Representación de los oligonucleótidos utilizados en este experimento. Se muestra una escala entre el nucleótido 0 y el -400 respecto al inicio del 5'LTR. **(B)** La cromatina de las células expresando los shRNAs de SPT6 y Control fue digerida con MNasa y corrida en un gel de agarosa al 1.5%. Los mononucleosomas obtenidos fueron purificados del gel y utilizados en una PCR a tiempo real con los oligonucleótidos de la región del gen UBXD8 inmediatamente anterior de la integración viral. Los valores obtenidos de cada PCR se pusieron en relación al valor obtenido con los oligonucleótidos L1+L2 (utilizada como control de carga) y todo ello en relación a ADN genómico desnudo previamente cortado con MNasa

Tomando todos estos resultados en conjunto pudimos concluir que el hecho de estar deplecionando SPT6 conllevaba una apertura y relajación de la cromatina, la cual cosa finalizaba en una desrepresión del promotor del HIV. Probablemente, no podemos descartar tampoco el hecho que tras la depleción de SPT6 pueda haber una reducción de la interferencia transcripcional debido al efecto de disminución de la transcripción

global y del gen UBXD8, en particular. Puede ser que la expresión del promotor viral latente tras la depleción de SPT6 sea debida a un efecto doble: relajación de la cromatina sumado al efecto global sobre la expresión génica y sobre la expresión del gen huésped donde HIV se halla integrado.

5.2 ASF1A, HIRA Y SUPT16H

Las proteínas ASF1, SPT16 y HIR1, además de SPT6 y CHD1, habían sido descritas como factores cuyos mutantes en *Saccharomyces cerevisiae* podían activar la transcripción de promotores crípticos, es decir, promotores que se encontraban dentro de genes con promotores activos (Cheung et al. 2008). Por este motivo se decidió estudiar el papel de estas proteínas en nuestro modelo celular. ASF1A y SUPT16H (homólogos en humanos) son proteínas relacionadas con el remodelamiento de la cromatina, y HIRA (homólogo en humanos de HIR1) se encarga de la regulación génica de histonas. HIRA y ASF1A son proteínas chaperonas que en el contexto que nos ocupa, estarían implicadas en aportar las histonas necesarias para el reensamblaje de nucleosomas tras el paso de la maquinaria transcripcional.

Con el fin de conocer el papel de estas tres proteínas en la latencia del HIV, se infectaron los shRNAs para dichos factores en los clones 27 y A2. Las células expresando vectores de expresión de los shRNAs de ASF1A, SUPT16H y HIRA (pLKO.1-Puro, MISSION, Sigma) se seleccionaron durante siete días con Puromicina, tiempo tras el cual se analizó tanto la expresión del promotor del HIV como la inhibición de los 3 factores mediante PCR a tiempo real. Los datos mostraron que la depleción de estas tres proteínas era capaz de reactivar el promotor del HIV, tal y como ocurría con los shRNAs de SPT6 y CHD1. Al mirar en detalle los valores de reactivación del promotor viral se pudo observar que el shRNA de ASF1A podía desreprimir mucho más que los shRNAs de HIRA y SUPT16H (Figura 57, superior).

En todos los casos se produjo inhibición en la expresión de los correspondientes factores (Figura 57, inferior). Esta desrepresión era independiente del sentido de la integración del virus ya que se observa tanto en el clon 27 como en el clon A2.

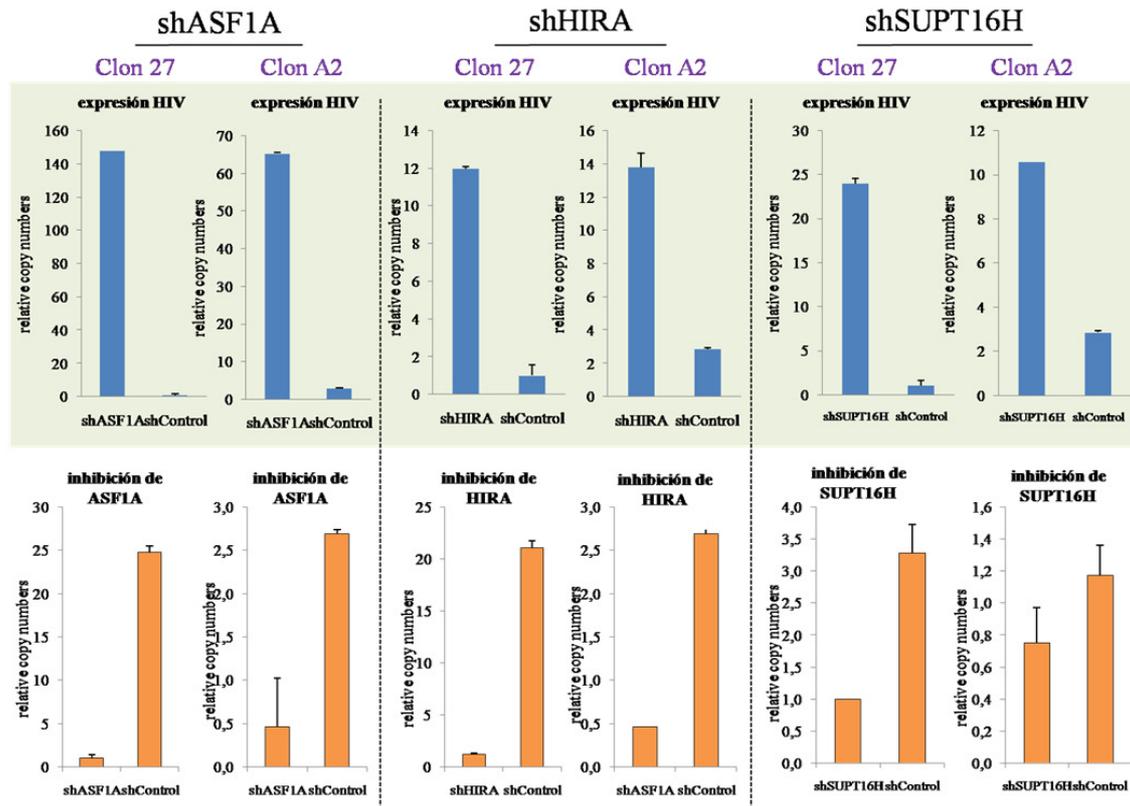


Figura 57. La inhibición de ASF1A, HIRA y SUPT16H desreprime el promotor del HIV en los clones 27 y A2. Los clones 27 y A2 fueron infectados con los shRNAs de ASF1A, HIRA, SUPT16H y el Control, y se seleccionaron las células expresando dichos shRNAs con Puomicina durante siete días. El ARN de las células fue extraído y se realizó una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos 8+9 (específicos para detectar la expresión del HIV) (paneles superiores) y oligonucleótidos para detectar los transcritos de cada uno de los factores (paneles inferiores).

El siguiente paso consistió en conocer si la depleción de estas proteínas podía tener un efecto represivo sobre la expresión del gen endógeno UBXD8, tal y como se había observado al deplecionar SPT6. Para ello, se utilizaron los ADNc de las células expresando los shRNAs de ASF1A, HIRA, SUPT16H y el Control y los oligonucleótidos para detectar la expresión del gen UBXD8 se encontraban en los exones 5 y 6. Los resultados mostraron una disminución en la expresión del gen UBXD8 tras la depleción de estas proteínas, la cual cosa podría indicar un papel de dichas proteínas en la correcta transcripción de genes (Figura 58).

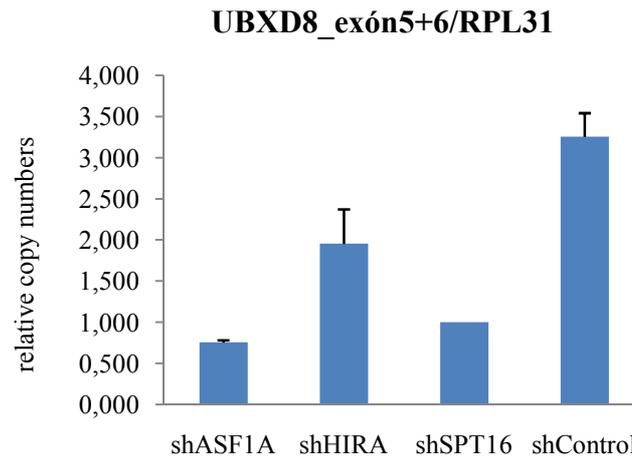


Figura 58. La depleción de ASF1A, HIRA y SUPT16H afecta negativamente la expresión del gen UBXD8. Las células del clon 27 fueron infectadas con los shRNAs de ASF1A, HIRA, SUPT16H y el shRNA Control. Tras 7 días de selección con Puromicina, el ARN de las células fue extraído y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos del gen UBXD8, en los exones 5 y 6. Los valores se pusieron en relación al gen RPL31 como control externo.

5.3 TFIIS

TFIIS (o TCEA1) es la proteína responsable de liberar la ARN polimerasa pausada de su estado de arresto y así estimular el proceso de elongación. Es capaz de inducir un corte en el transcrito naciente y reposicionar el extremo 3' del transcrito en el centro catalítico de la RNA polimerasa II (Fish et al. 2002).

En levadura, el mutante de TFIIS mostraba un patrón salvaje, no influenciando la expresión del HIV. De ello se deducía que la transcripción del HIV en levadura no dependía de este factor (Sebastián Chávez, comunicación personal). Si en nuestro modelo de células Jurkat TFIIS tampoco desreprimía el promotor del HIV, el hecho de utilizar el shRNA de este factor nos permitía tener otro shRNA control que podíamos utilizar en experimentos posteriores y que demostraba que no todos los shRNAs probados eran capaces de desreprimir el promotor viral latente.

Al infectar las células de los clones 27 y A2 con los shRNAs de TFIIS y del Control se pudo observar que tras la depleción de este factor se veía una clara desrepresión del promotor del HIV medido por porcentaje de GFP o por MFI (Figura 59A). La depleción de TFIIS se midió mediante PCR a tiempo real (Figura 59B). Este hecho indicaba, que a

diferencia de lo que se observaba en levadura este factor tiene un papel importante en la represión del promotor. El hecho de que TFIIIS esté relacionado con la salida del arresto de la polimerasa puede estar indicando que la depleción de esta proteína promovería un aumento de la cantidad de polimerasa arrestada, hecho que podría estar disminuyendo la interferencia transcripcional sobre el HIV y aumentando su expresión.

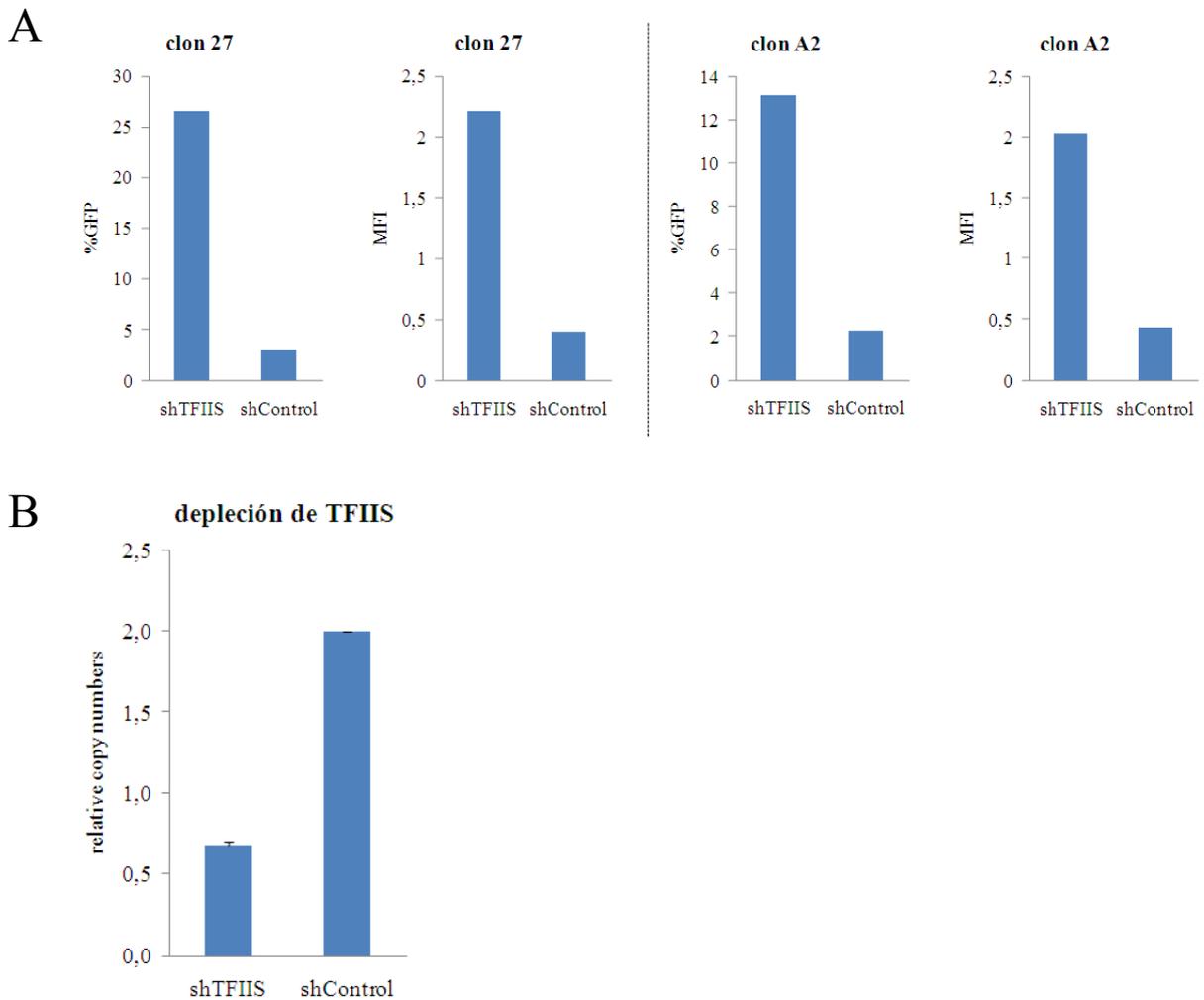


Figura 59. La depleción del factor TFIIIS es capaz de reactivar el promotor HIV latentemente infectado. (A) El shRNAs de TFIIIS fue infectado en los clones 27 y A2, juntamente con el shRNA Control. Tras la selección con Puromicina durante 7 días, las células fueron analizadas en el citómetro y se muestran los porcentajes de GFP y MFI. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes. **(B)** La depleción de este factor fue testada mediante PCR a tiempo real y los valores de los transcritos de TFIIIS se pusieron en relación a GAPDH como control.

5.4 BRG1

BRG1 (o SMARCA4) forma parte del complejo SWI/SNF, como subunidad catalítica del mismo, y utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para remodelar la estructura de la cromatina (revisado en Trotter et al. 2004). BRG1 se puede encontrar tanto en las subfamilias de SWI/SNF BAF como en PBAF.

Al igual que TFIIIS, un mutante en levadura de BRG1 no modificaba la expresión del promotor del HIV en este sistema celular (Sebastián Chávez, comunicación peronal) así que se decidió utilizar un shRNA de este factor en nuestro sistema de linfocitos humanos.

Tras infectar los clones 27 y A2 con el shRNA de BRG1 y comparando con el shRNA Control se observó que tras la inhibición de esta proteína se veía desrepresión del promotor viral latente medida tanto por porcentaje de GFP como por MFI (Figura 60A). La disminución de la expresión de BRG1 se midió mediante Western Blot (Figura 60B). De nuevo se obtenía un resultado diferente al visto en el modelo de HIV de levadura ya que en Jurkat, BRG1 parece tener un papel en la represión del promotor del HIV.

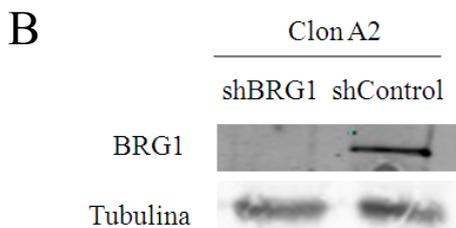
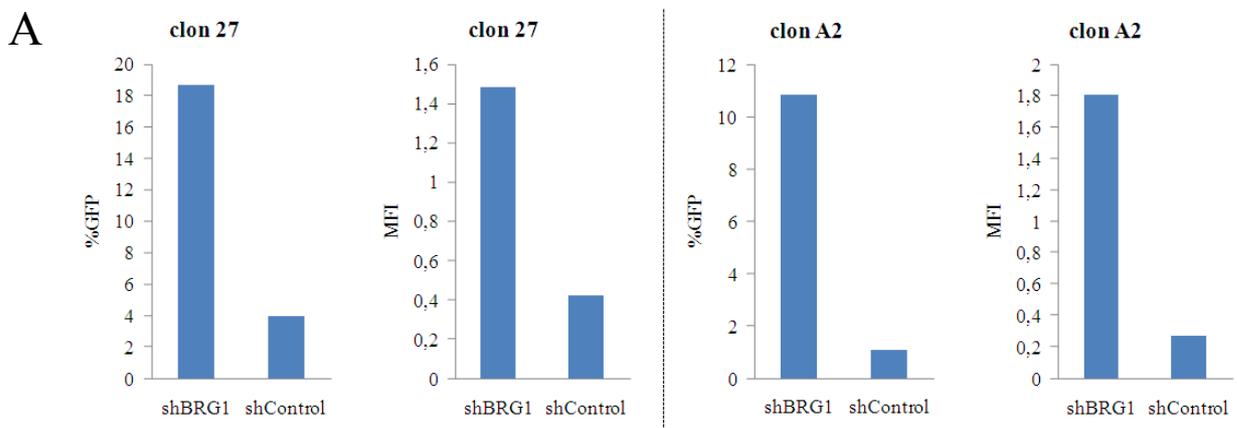


Figura 60. La depleción de BRG1 reactiva el promotor HIV latentemente infectado. (A) Se infectaron los shRNAs de BRG1 y Control en los clones 27 y A2. Tras siete días de selección con Puromicina se analizaron las células en el citómetro de flujo. Se muestran los porcentajes de GFP y MFI de un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes. (B) La depleción de este factor fue testada mediante Western Blot con anticuerpos específicos para BRG1 y Tubulina, como control de carga.

5.5 YY1

También analizamos las consecuencias sobre la expresión del HIV de la depleción del factor de transcripción Ying Yang 1 (YY1). Se había descrito que esta proteína era capaz de reclutar la histona deacetilasa 1 (HDAC1), llevando a un estado de represión al promotor del HIV mediado por la deacetilación (Coull et al. 2000, Williams et al. 2006). Se infectó el shRNA de YY1 y el shRNA Control en la población heterogénea latentemente infectada y tras la selección de las células expresando los shRNAs se miró la expresión del promotor mediante GFP en el citómetro de flujo. La infección mostró una desrepresión del promotor de unas 9 veces sobre los valores del shRNA Control (Figura 61A). El análisis de la depleción de la proteína mediante Western Blot mostró la alta eficiencia del shRNA de YY1 (Figura 61B). Estos datos confirmaron la implicación de la proteína YY1 en la represión del promotor del HIV, posiblemente tras el reclutamiento de HDAC1.

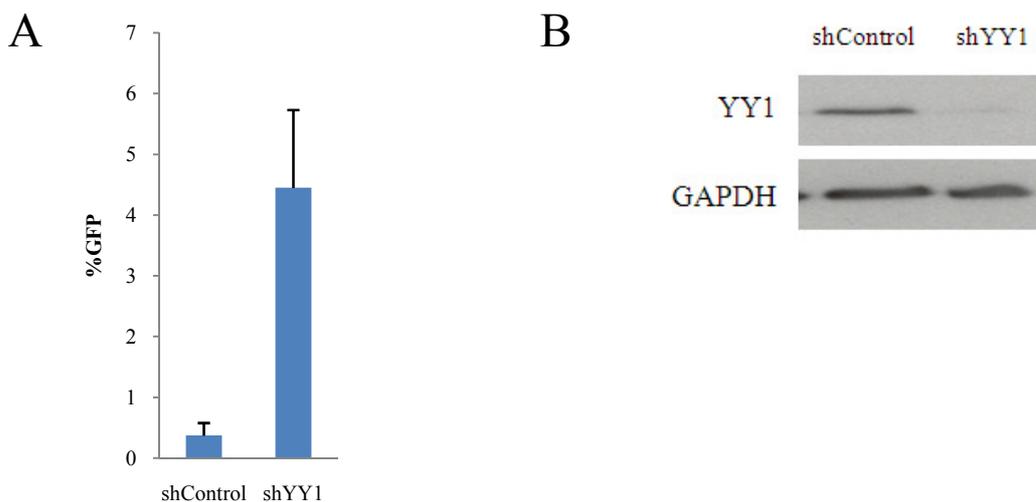
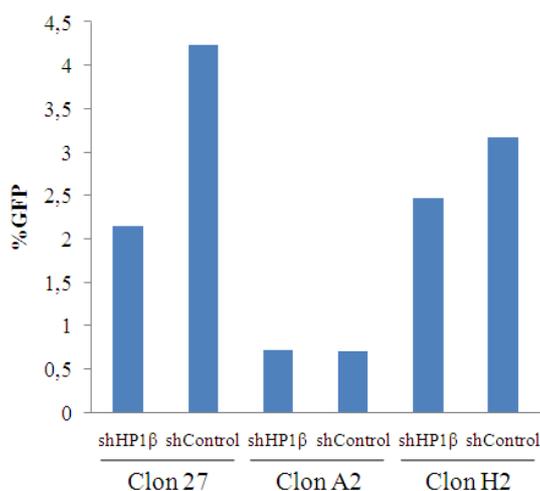


Figura 61. La proteína YY1 está relacionada con la latencia del virus del HIV. (A) Las células de la población latentemente infectada fueron infectadas con los vectores con los shRNAs de YY1 y el Control. Las células fueron tratadas con Puromicina durante 7 días, tras lo cual se analizaron en el citómetro de flujo. (B) La depleción de la proteína YY1 fue analizada mediante Western Blot utilizando anticuerpos específicos para dicha proteína y GAPDH como control de carga.

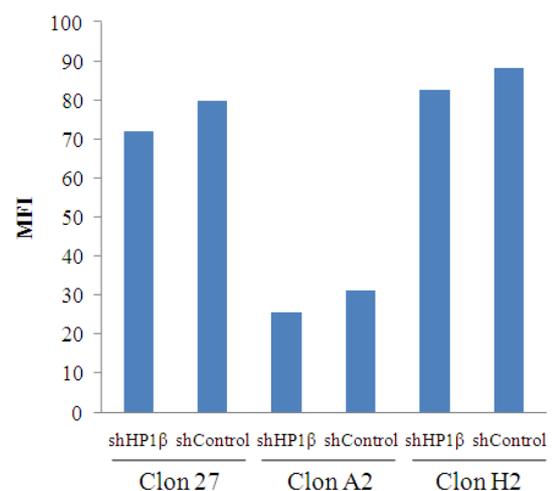
5.6 HP1 β

La proteína heterocromatínica HP1 es capaz de unirse a residuos metilados en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), modificación que ha sido relacionada con silenciamiento génico en una gran variedad de organismos tras la formación local de heterocromatina (Snowden et al. 2002). En el promotor viral latente se ha visto el reclutamiento de SUV39H1, HP1 γ y la trimetilación de H3K9 durante el estado de represión del HIV (du Chene et al. 2007). En ausencia de estímulo se ha descrito la presencia de HP1 β en el promotor del HIV juntamente con una ARN polimerasa II inactiva (Mateescu et al. 2008). Es por esta razón que en el presente estudio nos propusimos probar si la depleción de esta proteína reactivaba el promotor viral latente, y para ello se infectaron los shRNAs de HP1 β y el shRNA Control en los clones 27, A2 y H2. Tras la selección de las células expresando dichos shRNAs, el porcentaje de GFP y la MFI de las células fueron analizados, mostrando que en ninguno de los 3 clones, la depleción de HP1 β tenía algún efecto en la desrepresión del promotor (Figuras 62A y 62B). La inhibición de HP1 β fue medida por PCR a tiempo real, mostrando una depleción de aproximadamente el 64% del total (Figura 62C). Estos resultados indicaban que en nuestro modelo celular de Jurkat, esta proteína no está relacionada con el estado latente del promotor del HIV.

A



B



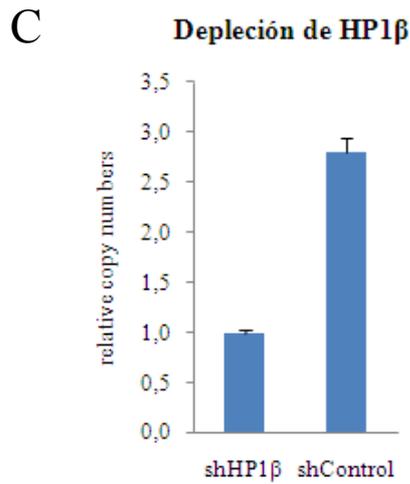
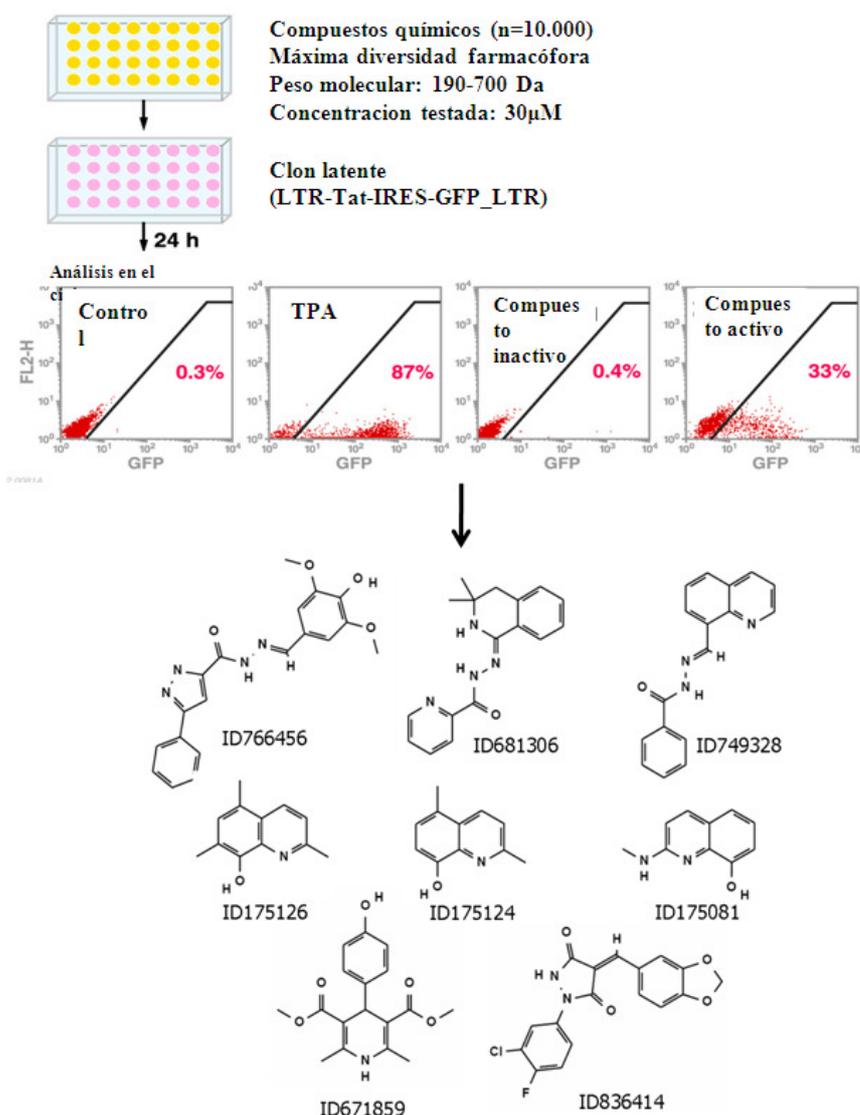


Figura 62. La proteína HP1 β no está implicada en la latencia del promotor del HIV. Los clones 27, A2 y H2 fueron infectados con los vectores para los shRNAs de HP1 β y Control. Se añadió Puromicina durante 7 días, tiempo tras el cual se analizó la expresión del promotor, medida por porcentaje de GFP (**A**) y MFI (**B**) Se muestra un ejemplo representativo de un total de dos experimentos. (**C**) El ARN de las células fue extraído y se llevó a cabo una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos para HP1 β . Los valores se muestran como los transcritos de HP1 β en relación a GAPDH como control.

6. Cribado de moléculas químicas que pueden reactivar el virus HIV latentemente infectado

6.1. ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS POR CRIBADO DE UNA LIBRERÍA DE MOLÉCULAS QUÍMICAS

En la presente tesis se colaboró con el Dr. Eric Verdin (Gladstone Institutes-UCSF, San Francisco, EEUU) en un proyecto que consistió en probar compuestos químicos que pudieran reactivar el promotor HIV latente en el modelo celular de latencia en Jurkat. En el laboratorio del Dr. Verdin se llevó a cabo un cribado de 10.000 compuestos químico, obteniéndose 8 de ellos que eran capaces de reactivar de forma considerable la expresión del vector HIV, midiendo la reactivación mediante la expresión de GFP de las células (Figura 63).



- ID 766456: compuesto #1
- ID 681306 : compuesto #2
- ID 671859 : compuesto #3
- ID 175126 : compuesto #4
- ID 836414 : compuesto #5
- ID 175081 : compuesto #7
- ID 175124 : compuesto #8
- ID 749328 : compuesto #9

Figura 63. El cribado de 10.000 compuestos en un clon latentemente infectado dio como resultado 8 moléculas que eran capaces de reactivar el promotor del HIV. Los 10.000 compuestos de la librería fueron testados en el laboratorio de Eric Verdin en un clon latentemente infectado, a una concentración final de 30µM durante 24 horas. De dicho estudio se obtuvieron 8 compuestos capaces de reactivar el promotor latente, cuyas estructuras se muestran en la figura. Los compuestos positivos fueron numerados para una mayor facilidad de nomenclatura.

Desde un punto de vista estructural, 6 de los 8 compuestos positivos se podían clasificar en dos grupos químicos diferentes, los de clase 1 y los de clase 2. Los compuestos números 4, 7 y 8 pertenecían a los de clase 1 y los compuestos 1, 2 y 9, a los de clase 2 (Figura 64).

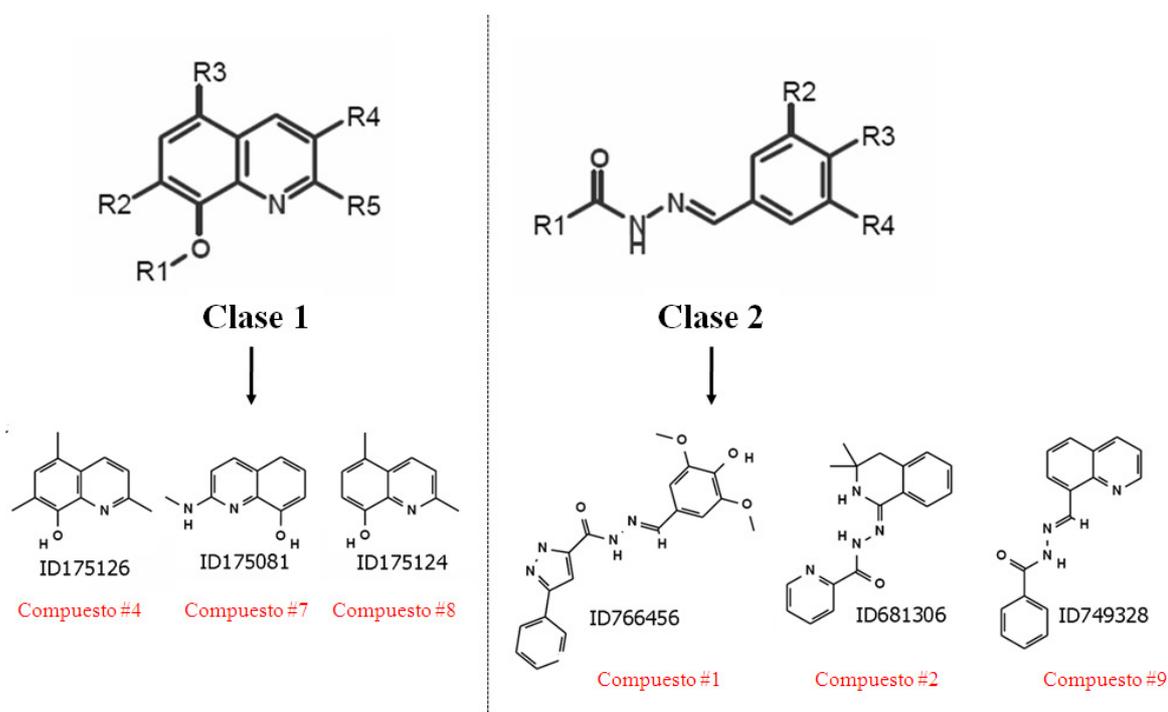


Figura 64. Seis de los ocho compuestos positivos obtenidos del cribado podían clasificarse en dos grupos según su estructura química. Los compuestos números 4, 7 y 8 pertenecían a los compuestos de clase 1 cuya característica son dos anillos aromáticos como estructura principal y los compuestos 1, 2 y 9 se podían clasificar dentro de los de clase 2.

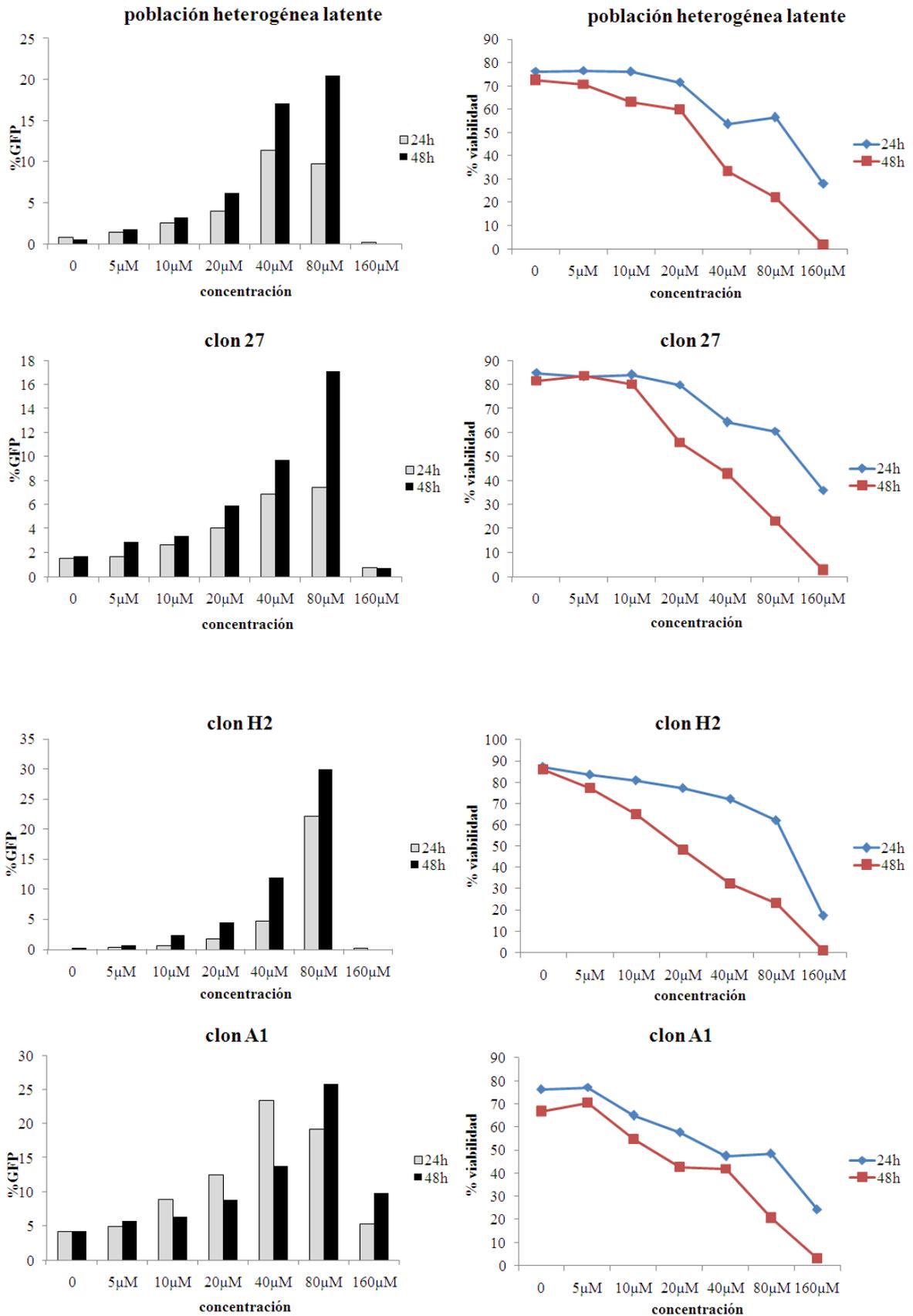
Para profundizar en el estudio, se eligieron los compuestos número 1 y 4 del total de 8 compuestos positivos obtenidos en el cribado. Cada uno de estos compuestos era perteneciente a una de las dos clases con estructuras químicas diferentes y en los

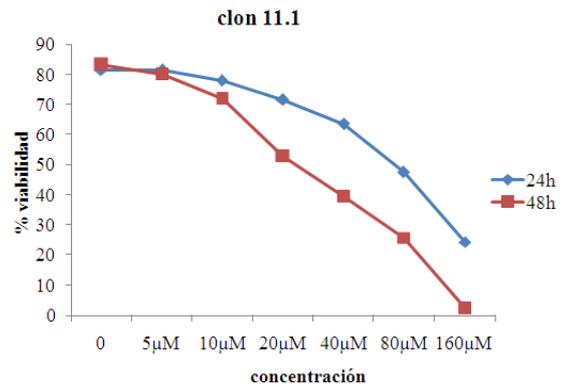
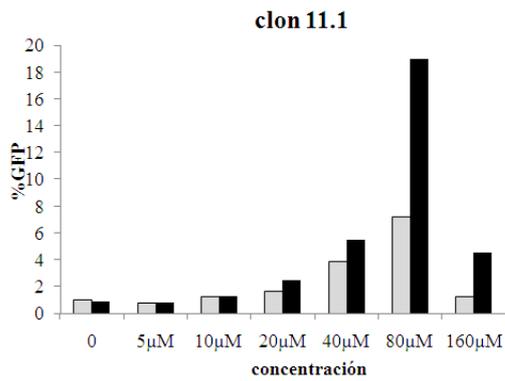
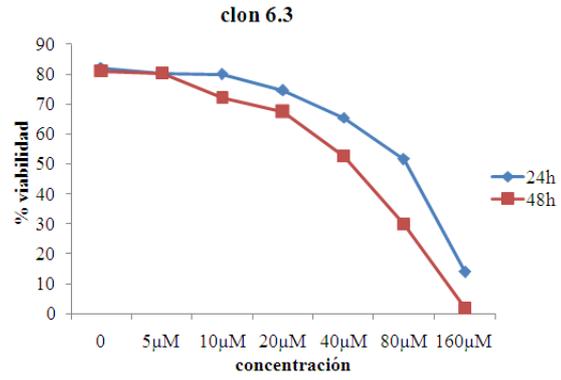
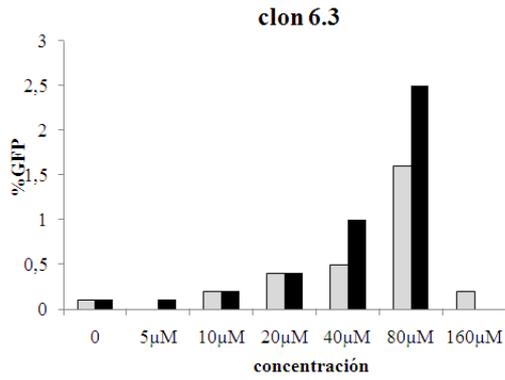
estudios iniciales se había observado una gran activación de las células latentes con dichos compuestos. Los compuestos 1 y 4 fueron testados en la población heterogénea latentemente infectada, en 3 clones latentes portadores del mini-genoma viral LTR-Tat-IRES-GFP-LTR (clones 27, H2 y A1) y en dos clones latentes con el genoma viral de 9Kb (clones 6.3 y 11.1). Estas células fueron tratadas durante 24 y 48 horas con los dos compuestos a diferentes concentraciones desde 5 μ M a 160 μ M. Los resultados con el compuesto número 1 mostraron buenos niveles de reactivación del promotor, reactivación que llegaba a su máximo a una concentración de 80 μ M (Figura 65A). En el caso del compuesto número 4 también se observó reactivación en todas las células, llegando a unos valores de reactivación máxima usando concentraciones entre los 40 μ M y los 160 μ M, dependiendo de las células (Figura 65B). La viabilidad de las células se calculó mediante un histograma que relacionaba dos parámetros de dispersión, el *forward-scatter* o FSC, que es una media proporcional al tamaño de la célula, y el *side-scatter* (SSC), proporcional a la complejidad y rugosidad de la partícula que pasa por el citómetro. Este tipo de histograma nos permite diferenciar entre las células vivas y muertas, así como también los agregados celulares (Figura 65C, izquierda). En el histograma de fluorescencia se representan solo las células vivas y se utilizan los valores obtenidos tras la excitación con un láser que cubre el rango de longitud de onda donde se encuentra la proteína GFP (FL1) en relación a los obtenidos con otro láser con excitación en una longitud de onda lejana a GFP (FL3) (Figura 65C, derecha).

Estos resultados indicaban una buena reactivación del promotor latente con los compuestos, reactivación que no se ceñía a un único clon latente (por tanto a un lugar de integración determinado) sino que tenía un mayor espectro, capaz de reactivar el promotor del HIV en distintos entornos tales como repeticiones alfoideas, intrones de genes o regiones intergénicas. Otra observación de los resultados fue la alta mortalidad celular que provocaban los compuestos tras el tratamiento con altas concentraciones. Este punto podía ser un gran problema para la posible aplicación terapéutica de los compuestos en pacientes.

A

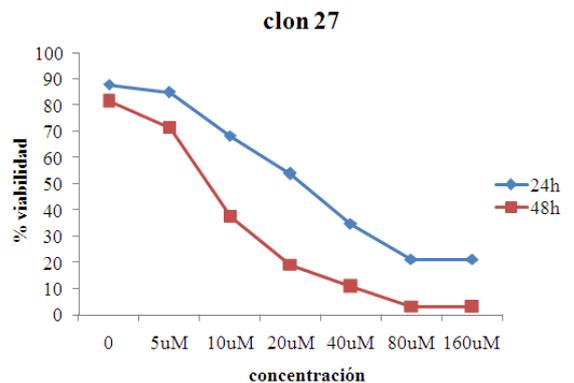
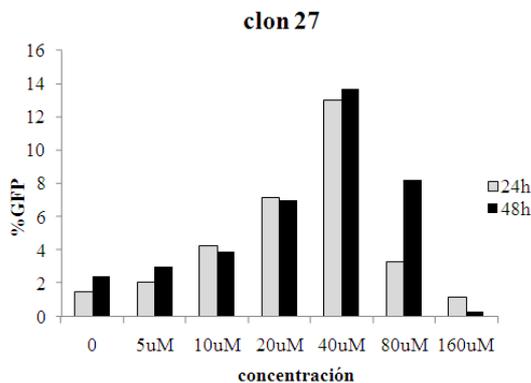
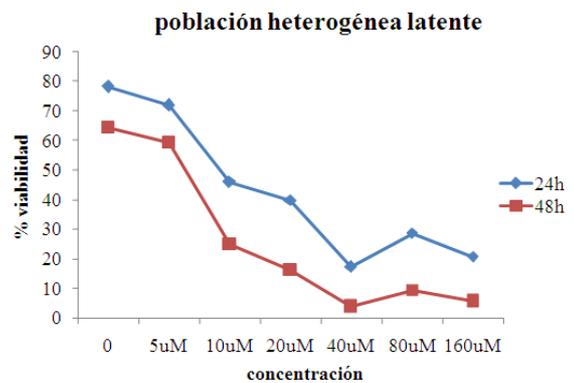
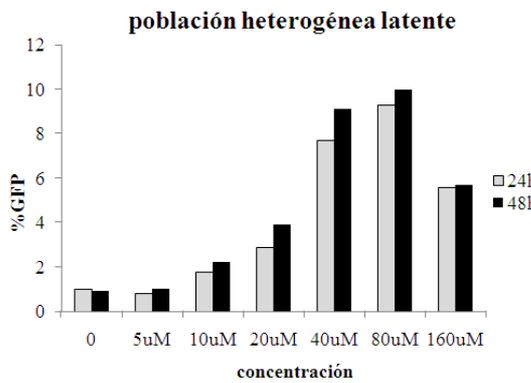
Compuesto número 1



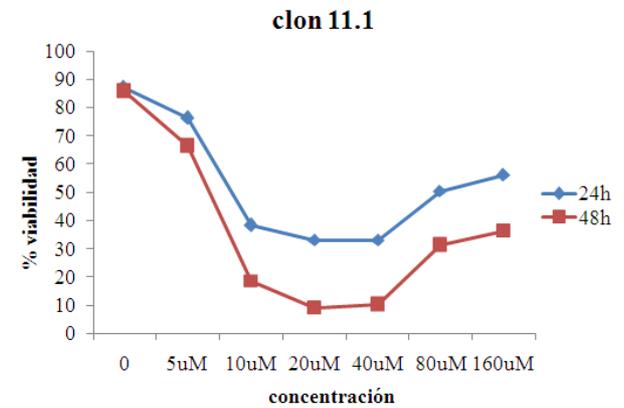
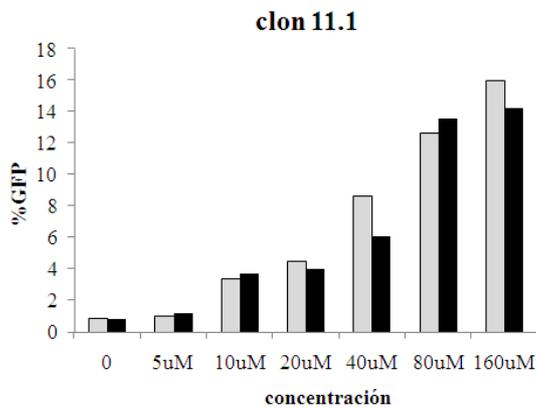
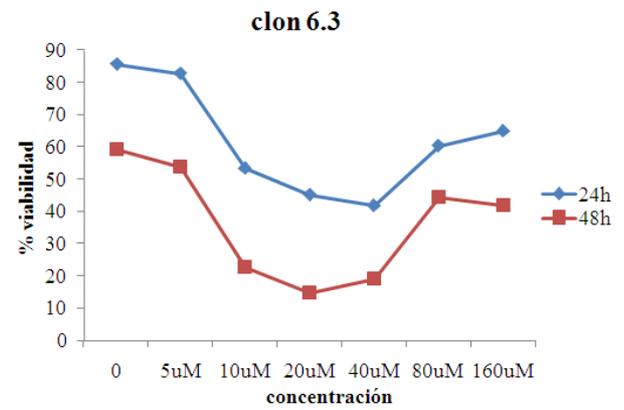
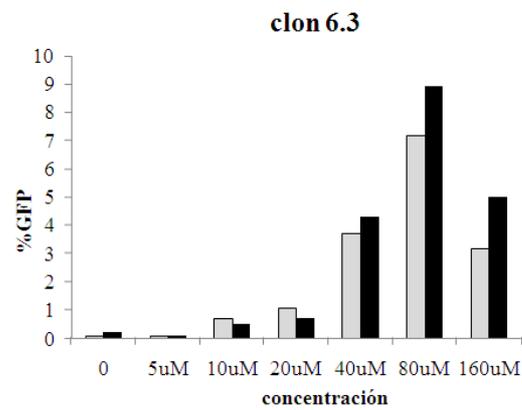
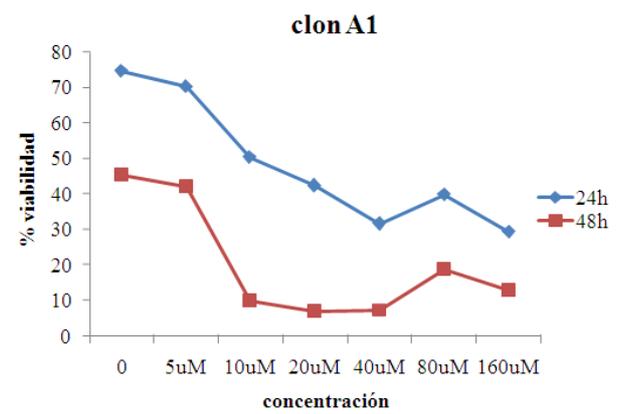
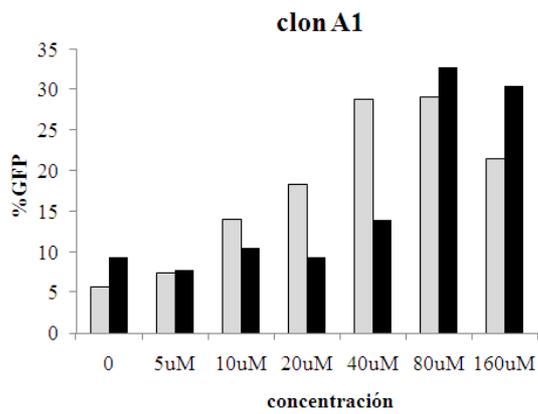
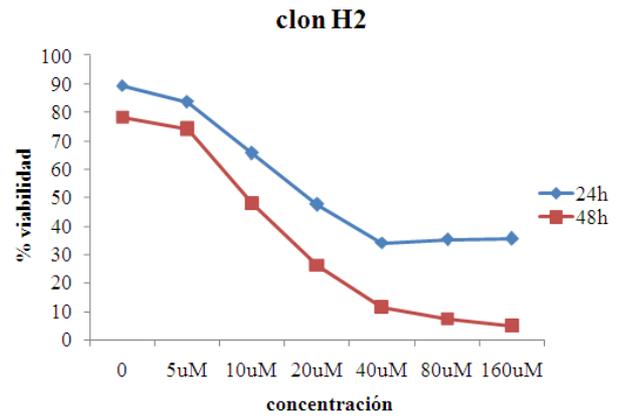
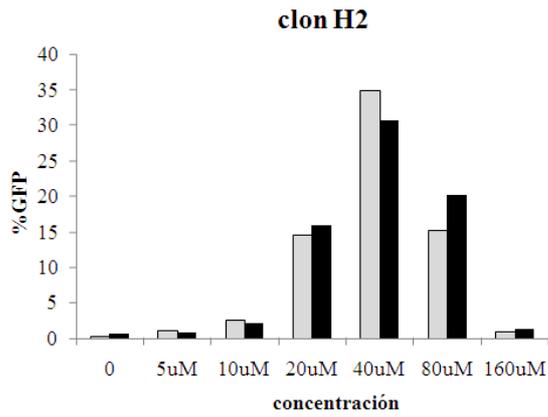


B

Compuesto número 4



RESULTADOS



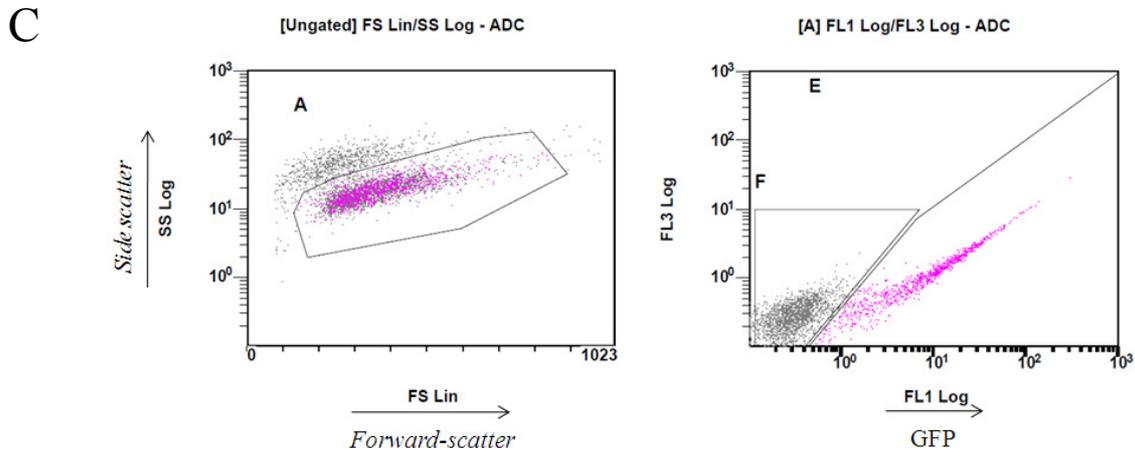


Figura 65. Los compuestos número 1 y 4 son capaces de reactivar el promotor del HIV en la población heterogénea latente y en diferentes clones. La población latentemente infectada y los clones 27, H2, A1, 6.3 y 11.1 fueron tratados con los compuestos 1 (apartado A) y 4 (apartado B) a concentraciones de 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 160 μ M. Las células fueron analizadas mediante el citómetro de flujo tras 24 y 28 horas de tratamiento. Se muestran los datos de los porcentajes de GFP (paneles de la izquierda) y los porcentajes de viabilidad (paneles de la derecha). **(C)** Representación de los histogramas obtenidos en el citómetro de flujo, los cuales muestran la viabilidad de las células (*forward-scatter vs. side-scatter*) (izquierda) y la expresión de GFP (derecha).

El haber observado una gran mortalidad con ambos compuestos, mortalidad que se correlacionaba con las concentraciones a las que se veía la reactivación del promotor nos hizo pensar si ambos factores estaban relacionados. Para testar la posibilidad de que cualquier compuesto que produjese mortalidad celular activase el promotor HIV latente, se trataron las células del clon H2 con varios compuestos con mayor o menor toxicidad y se siguió la expresión de GFP y la mortalidad en el citómetro de flujo. Los compuestos elegidos fueron los compuestos 1 y 4, Puromicina, camptotecina, metil metano sulfonato (MMS), hidroxiurea (HU), colcemida e higromicina. Se puso observar que la camptotecina, que es un compuesto descrito como un inductor de la apoptosis, desreprimía el promotor, pero otros factores que también producían una mortalidad elevada, tales como la colcemida o la higromicina, tenían unos valores de GFP muy bajos. Los compuestos 1 y 4 producían una mortalidad moderada, y se obtenían elevados valores de desrepresión (Tabla 2).

Tratamiento	%GFP	%viabilidad
---	0,3	89,7
Compuesto 1	24,3	39,4
Compuesto 4	25,7	58,8
Puromicina	1,3	18,2
Camptotecina 10 μ M	10,6	3,2
Camptotecina 100 μ M	12,9	3,9
Metil metano sulfato (MMS)	0,2	90,8
Hidroxiurea (HU)	3,3	27,4
Colcemida	3,3	4,4
Higromicina	4,2	14,9

Tabla 2. Tratamiento con diferentes compuestos de las células H2. Las células del clon H2 fueron tratadas con diversos compuestos. La Puromicina (2 μ g/ml), y los compuestos 1 (80 μ M) y 4 (80 μ M) fueron añadidos durante 24 horas. La camptotecina (10 μ M y 100 μ M), MMS (1mM), HU (1mM), higromicina (1.6mg/ml) y colcemida (20ng/ml) fueron añadidos durante 48 horas. Tras el tratamiento las células fueron analizadas en el citómetro de flujo, donde se miró la expresión de GFP y el porcentaje de células vivas.

Todo ello, nos indicaba que no había una correlación directa entre la mortalidad de las células y la desrepresión del promotor, aunque en casos concretos como la camptotecina sí que se veía un ligero aumento de la expresión de la GFP. A parte, también se pudo concluir que la reactivación del promotor tras el tratamiento con los compuestos 1 y 4 era específica de la acción sobre su diana de acción y no debida a la mortalidad celular causada.

6.2. CRIBADO VIRTUAL Y *TARGET FISHING*

Posteriormente, empezamos una colaboración con el Dr. Jordi Mestres (IMIM y Chemotargets S.L., Barcelona) con los objetivos de conocer las dianas de acción de los ocho compuestos obtenidos, así como para poder optimizar su actividad mediante la selección de compuestos similares que pudieran tener una mayor actividad o una menor toxicidad.

Para poder conocer las dianas de acción y los mecanismos que se podrían estar activando tras el tratamiento con los compuestos (mecanismos que estarían produciendo la reactivación del promotor viral) se llevó a cabo el llamado *target fishing*. Dicho

procedimiento consiste en comparar estructuralmente los ocho compuestos obtenidos en la librería con una base de datos de compuestos, las dianas de acción de los cuales son conocidas. En un primero intento se compararon los ocho compuestos con una base de datos de 60.000 compuestos cuyas dianas de acción sumaban un total de 541. Desafortunadamente, no se encontró ningún compuesto estructuralmente parecido a nuestros compuestos. El siguiente paso fue utilizar unos parámetros menos restrictivos en el *target fishing*, con los cuales se tenía acceso a un total de 100.000 que cubrían 687 dianas de acción. Este análisis mostró que 3 de los 8 compuestos iniciales eran estructuralmente muy parecidos a compuestos cuya diana de acción se encontraba entre las 687 de la base de datos. Más en concreto, el compuesto número 9 se parecía a una molécula activadora del receptor metabotrópico del glutamato tipo 5 cuya función es modificar la respuesta de determinados canales de membrana y está asociado a la plasticidad sináptica. Por otra parte, los compuestos 4 y 8, pertenecientes ambos a la clase 1 de compuestos que contienen un anillo quinoleína como estructura principal, se parecían estructuralmente a dos compuestos que son inhibidores de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa, o PARP-1. Esta enzima cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa a proteínas y ha sido descrita su relación con la reparación del ADN y en la regulación transcripcional. Comparando los compuestos originales con los inhibidores de PARP-1 obtenidos de la base de datos, se pudo comprobar que las estructuras químicas tenían un gran parecido (Figura 66)

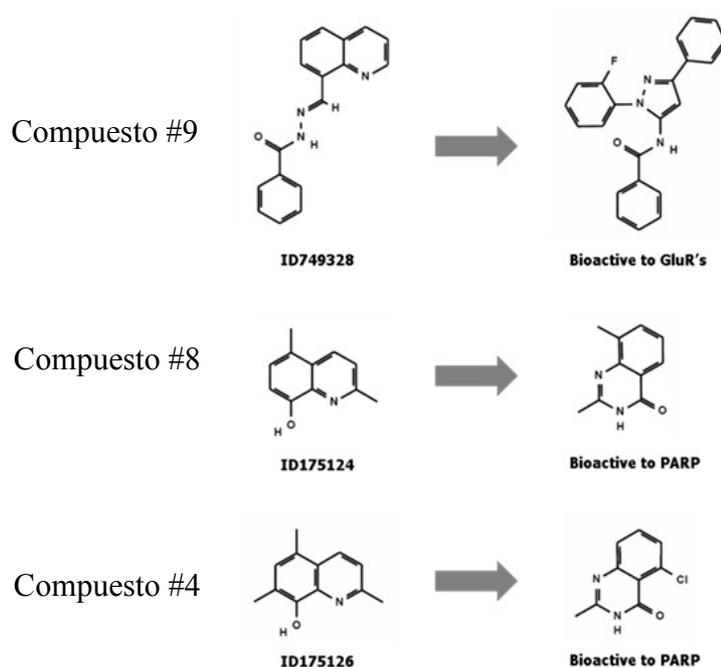


Figura 66. El compuesto 9 (ID 749328) es parecido a una molécula cuya función es activadora del receptor metabotrópico de glutamato tipo 5. Los compuestos 4 (ID 175126) y 8 (ID 175124) son estructuralmente parecidos a dos compuestos obtenidos en el *target fishing* que son inhibidores de PARP-1.

El hecho de haber tenido que usar unos parámetros poco restrictivos en el *target fishing*, ya que con otros parámetros iniciales no se encontró ninguna diana, y tras ello solo haber obtenido 2 dianas de acción para 3 de los compuestos originales, hizo pensar en una segunda estrategia para encontrar más dianas de acción. Para ello, se utilizó el principio por el cual compuestos similares deberían tener un ambiente biológico similar, y por lo tanto, moléculas similares a los 8 compuestos similares deberían tener similares funciones en la célula. Así pues, se realizó un cribado virtual de los 8 compuestos, obteniéndose 25.000 compuestos que eran estructuralmente similares a las moléculas iniciales, los cuales fueron usados contra la base de datos de las 541 dianas de acción. Del resultado se obtuvieron una serie de dianas que se podían dividir según los compuestos de clase 1 y clase 2, excepto el compuesto número 5, que no fue clasificado inicialmente en ninguna de las dos clases. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Compuestos de clase 1
Inhibidores de PARP-1
Inhibidores de fosfodiesterasas del AMP cíclico 7A (PDE7A)
Inhibidores de Anhidrasas carbónicas
Compuestos de clase 2
Inhibidores de la proteína tirosina quinasa Lck
Moduladores positivos del receptor metabotrópico de Glutamato tipo 5
Antagonistas del receptor A3 de adenosina
Compuesto #5 (ID 836414)
Inhibidores de la proteína tirosina quinasa Lck

Tabla 3. Dianas de acción obtenidos tras hacer un cribado virtual de los ocho compuestos iniciales y un posterior *target fishing*. Partiendo de los compuestos originales se encontraron un total de 25.000 compuestos similares, los cuales fueron utilizados en el *target fishing*, encontrándose una serie de dianas de acción, las cuales podrían ser las mismas que las dianas de los compuestos iniciales. Dichas dianas se

clasificaron según las dos clases en las que se clasificaron los compuestos originales. Se clasificó a parte el compuesto #5, ya que no pertenecía a ninguna de las dos clases.

Mirando detenidamente los resultados, se pudo observar que no había una diana común en los 8 compuestos iniciales de la librería, así que posiblemente algunas de estas moléculas podrían tener mecanismos de acción o rutas diferentes. Es interesante remarcar que la diana PARP-1 fue obtenida en el *target fishing* partiendo de las moléculas iniciales y con parámetros permisivos, así como en esta segunda estrategia en la que se hizo primero un cribado virtual para luego hacer *target fishing* con los compuestos obtenidos.

Para confirmar dichas dianas, se decidió utilizar drogas comerciales descritas previamente con la misma función que se había obtenido de los compuestos en el *target fishing*. Las drogas elegidos fueron las siguientes:

- Inhibidores de PARP-1
 - PJ34
 - Benzamida
 - Minociclina
- Inhibidor de fosfodiesterasas del AMP cíclico 7A (PDE7A)
 - BRL50481
- Inhibidor de Anhidrasas carbónicas
 - Acetazolamida
- Inhibido de la proteína tirosina quinasa Lck
 - Damnacantal
- Modulador positivo del receptor metabotrópico de Glutamato tipo 5
 - DFB

Sobre el compuesto #3 (ID 671859) no se obtuvo ninguna diana de acción del *target fishing* pero se vio que la molécula era estructuralmente muy parecida a un compuesto comercial llamado Nifedipina, el cual bloquea un tipo específico de canales de calcio (Figura 67). Es por esta razón que también se decidió añadir dicha droga a nuestro análisis.

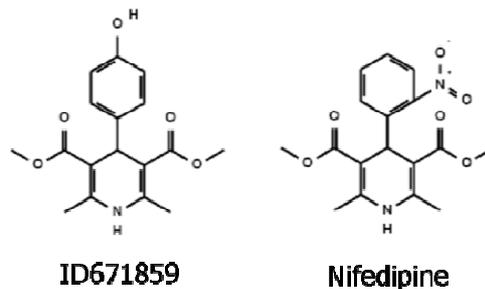
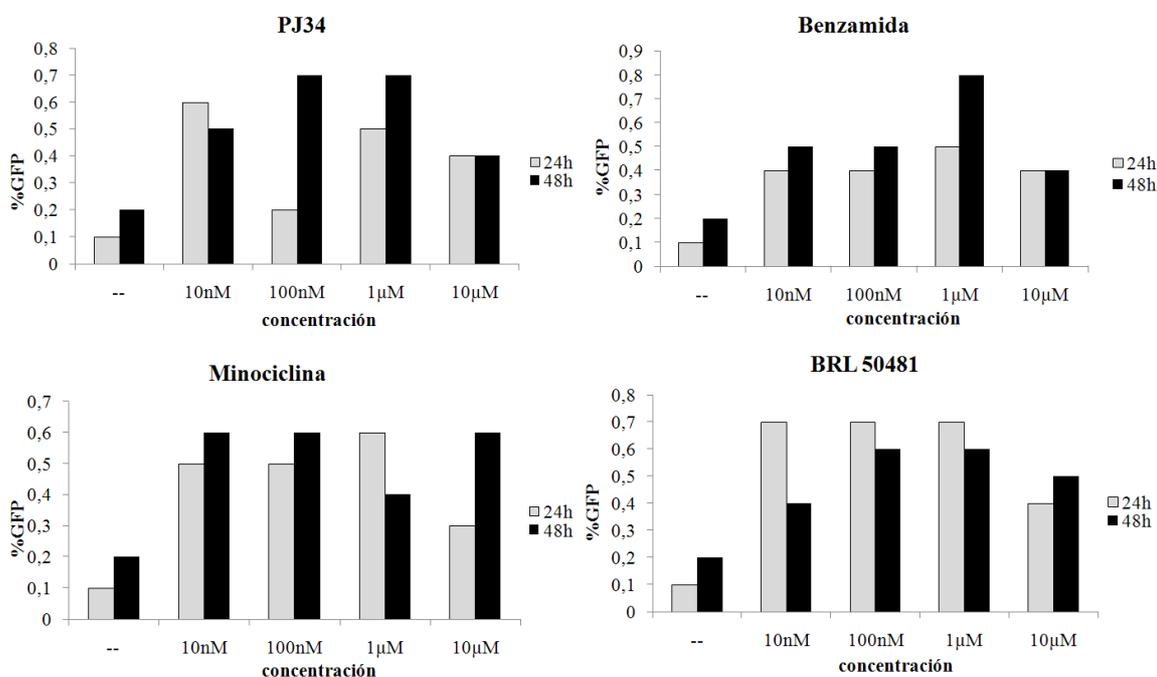


Figura 67. El compuesto #3 (ID 671859) se parece estructuralmente a la droga comercial nifedipina, utilizada para bloquear un tipo específico de canales de calcio.

Estas 8 drogas se probaron en los clones H2, 11.1 y 6.3 durante 24 y 48 horas y utilizando diferentes concentraciones, y se analizaron las células en el citómetro de flujo para comprobar la reactivación del promotor latente. Los resultados mostraron que ninguna de las 8 drogas testadas era capaz de desreprimir el promotor HIV de su estado latente. A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos con el clon H2 con todas las drogas (Figura 68). Esto nos llevó a concluir que el análisis computacional no había sido capaz de identificar las correctas dianas para los compuestos que sí eran eficaces para reactivar el virus latente.



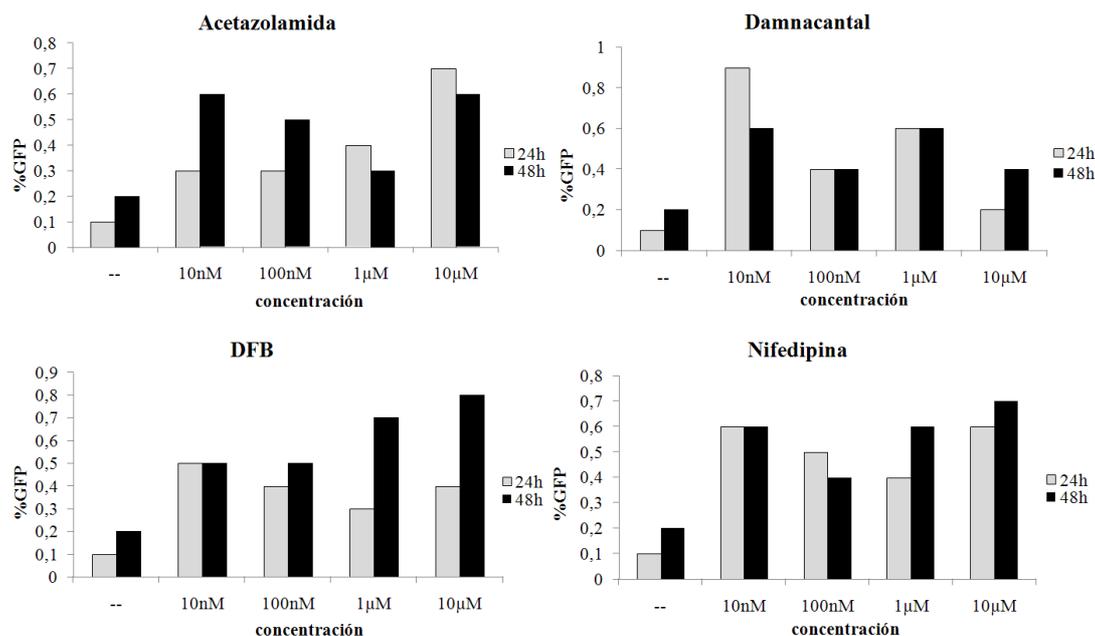


Figura 68. El tratamiento con las 8 drogas específicas para las diana de acción obtenidas en el *target fishing* no desreprimió el promotor HIV latente. Las células del clon H2 fueron tratadas con PJ34, Benzamida, Minociclina, BRL50481, Acetazolamida, Damnacantal, DFB y Nifedipina. En todos los casos, las concentraciones de los tratamientos fueron 10nM, 100nM, 1µM y 10µM durante 24 y 48 horas. Los resultados se muestran como porcentaje de GFP en los tiempos comentados. Con los compuestos originales #1 y #4, los porcentajes de reactivación suelen ser de 30-35% a 40-80µM y de 2-4% con 10µM (véase Figura 65).

6.3. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO COMPUESTO DERIVADO DE LOS COMPUESTOS POSITIVOS ORIGINALES DE CLASE I

6.3.1. Descubrimiento del compuesto A36

Nuestro segundo objetivo en colaboración con el Dr. Jordi Mestres consistía en optimizar los compuestos originales con la finalidad de encontrar nuevas moléculas con mayor actividad y/o menor mortalidad. Es por esta razón que se hizo un cribado virtual comparando los ocho compuestos iniciales con una base de datos de moléculas, que contenía un total de más de 7.000.000 de compuestos comercialmente accesibles. Del resultado del cribado se hizo una selección de 258 compuestos que cubrían los ocho compuestos originales, y de ellos, se propusieron 43 nuevas moléculas con variaciones respecto a los originales que fueron adquiridas. Se utilizaron todos los compuestos a dos concentraciones diferentes (5µM y 40µM) durante 24 y 48 horas en la población heterogénea latente y en el clon 27. El análisis de todos los compuestos dio como

resultado que uno de los compuestos testados, que se llamó A36 y derivaba de los compuestos de clase I, era capaz de reactivar la expresión del HIV latente (Figura 69).

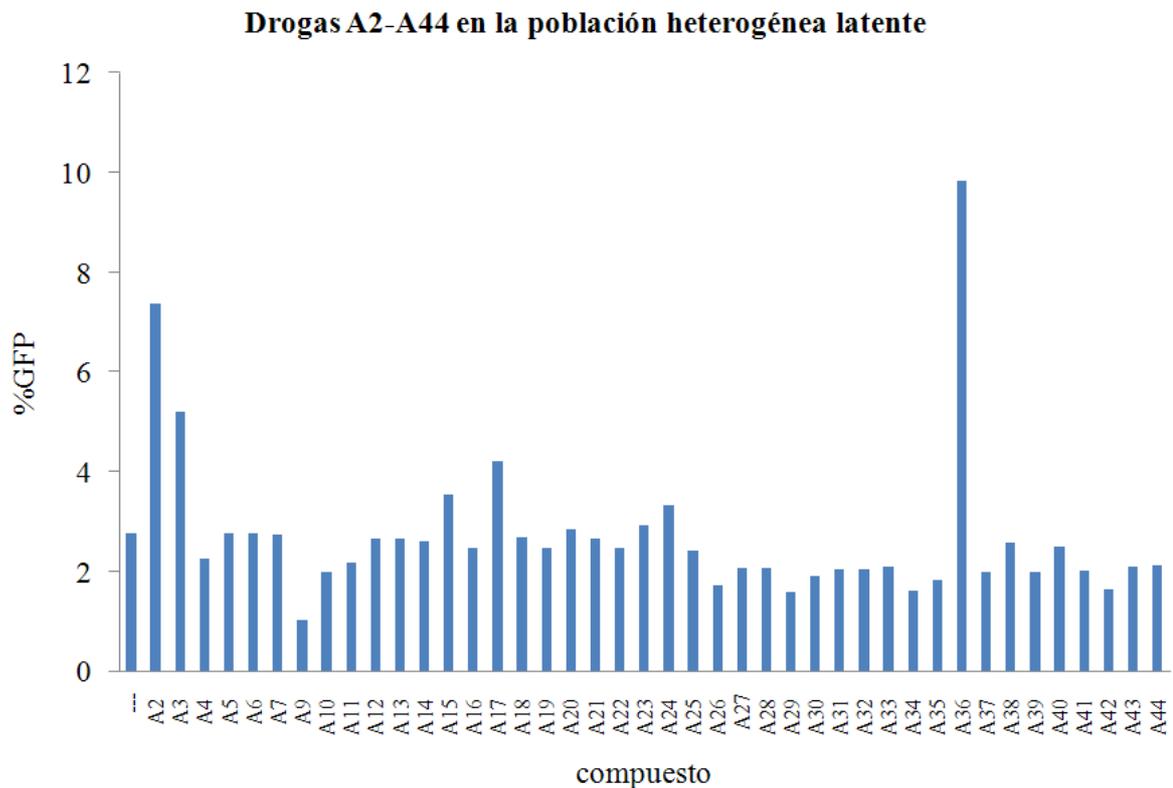


Figura 69. El compuesto A36 es capaz de reactivar el promotor del HIV latente. Las células de la población heterogénea latente fueron tratadas con los compuestos A2-A44 (40 μ M) durante 48 horas, periodo tras el cual se analizó la expresión de GFP en un citómetro de flujo.

A continuación, se repitió el experimento con un amplio rango de concentraciones del compuesto (entre 1 μ M y 160 μ M), sobre cuatro clones latentes, el clon 27, A2, H2 y 6.3. Los resultados mostraron que en los 3 primeros clones (con el mini-genoma del HIV), A36 era capaz de reactivar el promotor del HIV de manera eficiente y la mortalidad a elevadas concentraciones era prácticamente nula (Figuras 70A, 70B, y 70C). Aun teniendo que utilizar concentraciones elevadas a nivel de μ M de los compuestos, la disminución en la mortalidad del compuesto A36 ofrecía una gran ventaja sobre los ocho compuestos iniciales. En el caso del clon 6.3 (con el genoma de 9Kb de longitud), no se veía reactivación del promotor del HIV simplemente añadiendo dicho compuesto (Figura 70D). Probablemente, nos veríamos en la necesidad de combinar el A36 con otros compuestos para ver dicha reactivación.

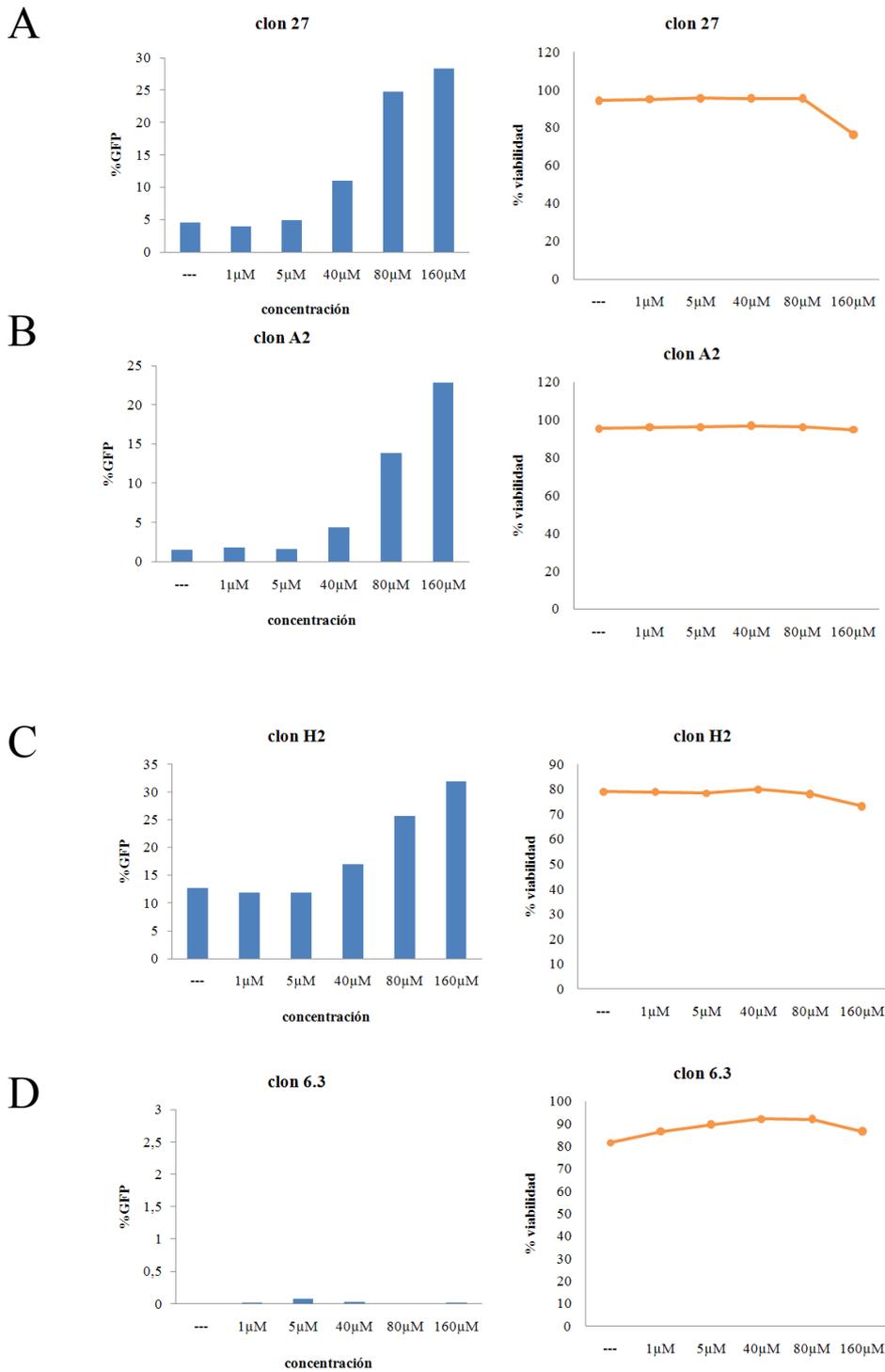


Figura 70. Los clones 27, A2 y H2 se reactivan tras el tratamiento con el compuesto A36 sin afectar la viabilidad de las células. Los clones 27 (A), A2 (B), H2 (C) y 6.3 (D) fueron tratados durante 24 horas con el compuesto A36. Las concentraciones oscilaron entre 1µM y 160µM. Tras el periodo de tratamiento, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo, midiéndose la expresión de GFP (izquierda) y el porcentaje de viabilidad (derecha). Los datos son gráficos representativos de un total de 3 experimentos.

Con el fin de conocer la IC₅₀ del compuesto que nos permite conocer la eficacia de una droga (ya que mide la cantidad de compuesto necesario para producir la mitad de la reactivación del promotor del HIV observable), se trató el clon 27 con concentraciones de A36 entre 1μM y 1.28mM, y tras 24 horas de tratamiento se analizaron las células en el citómetro de flujo. El máximo de actividad se encontró en la concentración de 320μM, llegándose a niveles de GFP de casi el 40%. La mitad de esta expresión máxima del promotor se encontró a una concentración de 80μM, con valores de desrepresión cercanos al 20%. Por ello, se describió la IC₅₀ del A36 en 80μM (Figura 71).

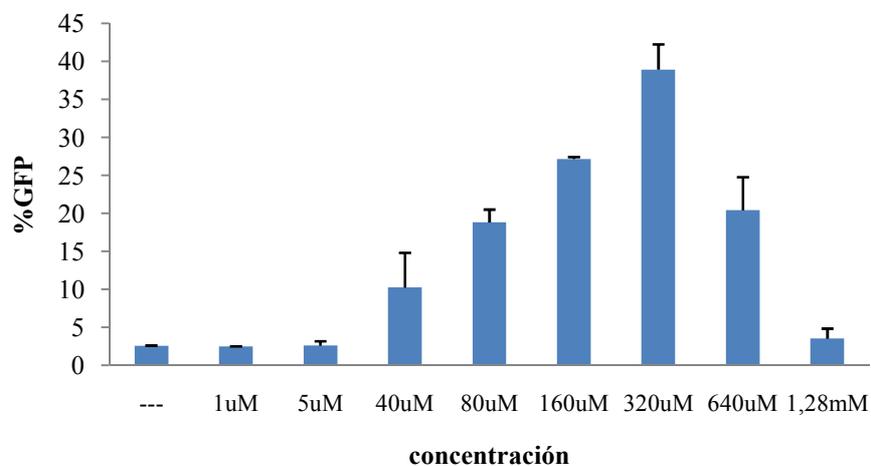


Figura 71. La IC₅₀ del compuesto A36 es de 80μM. Las células del clon 27 fueron tratadas con el A36 a concentraciones de 1μM, 5μM, 40μM, 80μM, 160μM, 320μM y 640μM durante 24 horas, periodo tras el cual se analizaron las células en el citómetro de flujo. Los valores de desrepresión del promotor se muestran como porcentajes de GFP.

6.3.2. Cuantificación de la transcripción del HIV en respuesta a A36

A continuación y siguiendo con la caracterización del compuesto A36, nos propusimos cuantificar la transcripción del HIV en respuesta a A36 mediante RT-PCR. Para ello, se utilizaron los 4 oligonucleótidos específicos para las regiones inmediatamente después del +1 en el 5'LTR (oligonucleótidos 8+9), Tat, GFP y la región final del transcrito en el extremo 3'LTR (HIV_U3). El clon 27 se trató con A36 durante 36 horas y con el ARN se hizo una RT-PCR a tiempo real de cada una de las regiones, utilizando el ADN genómico para normalizar. Los resultados mostraron un aumento en la cantidad de transcritos que se estaban produciendo en las células tratadas

con A36, pero el patrón de transcritos era el mismo en células tratadas y sin tratar (Figura 72).

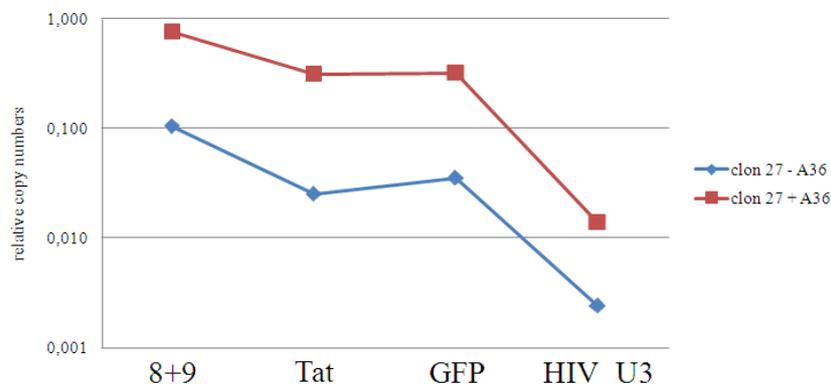


Figura 72. Tras el tratamiento con A36 del clon 27 se observa un aumento de la cantidad de transcritos virales, aunque su patrón es el mismo en células tratadas y sin tratar. El clon 27 fue tratado durante 36 horas con el compuesto A36 (80 μ M), periodo tras el cual se extrajo el ARN de las células y fue utilizado en una RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos cubriendo toda la región viral (8+9, Tat, GFP, HIV_U3). Los valores obtenidos con el ADNc de cada muestra se pusieron en relación a los valores obtenidos con igual oligonucleótidos utilizando el ADN genómico del clon 27 para normalizar las cantidades de transcritos y poder comparar entre oligonucleótidos.

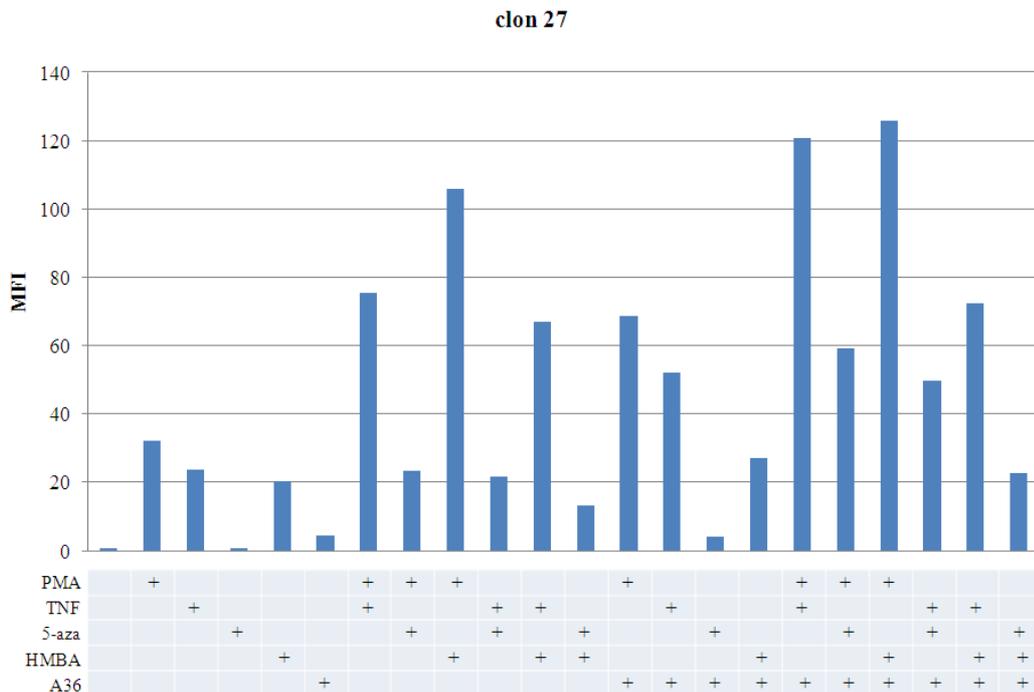
6.3.3. Combinación de A36 con otros compuestos activadores del HIV

El siguiente paso en la caracterización del compuesto A36 consistió en comparar su poder reactivador con el de otros compuestos activadores de la expresión del HIV conocidos con anterioridad: PMA, TNF α , TSA, HMBA y 5-aza-2'deoxicitidina (o 5-aza) y estudiar el efecto de combinar varias de estas drogas para ver si sinergizan, son sólo aditivas o con efectos solapados. El clon 27 y el clon 6.3 fueron tratados con los compuestos por separado y con varias combinaciones durante 36 horas, periodo tras el cual se analizó la expresión del promotor mediante la intensidad de fluorescencia o MFI.

En el clon 27, se analizó la intensidad de fluorescencia debido a que este clon es capaz de reactivarse hasta niveles de GFP mayores de 80-90%. En dichos porcentajes nos es imposible poder diferenciar los efectos entre compuestos ya que se ha llegado hasta valores de saturación en el porcentaje de células que se han convertido en GFP-positivas. En dicho clon, los resultados de MFI mostraron que el A36 reactivaba el HIV con una intensidad similar a TSA aunque de forma menor que PMA, TNF o HMBA. Al

combinarlo con estos compuestos, se pudo observar que el A36 sinergizaba con TSA, TNF y sobre todo con PMA, y al combinar con HMBA, ambos compuestos parecían tener efectos aditivos (Figuras 73A y 73B). Se obtuvo una mayor reactivación al combinar los compuestos PMA+TSA+A36 y PMA+TNF+A36 (Figuras 73A y 73B). No se observa ningún efecto con el compuesto 5-aza en ninguna de las combinaciones de los compuestos (Figuras 73A y 73B) debido a que el provirus integrado no sufre represión por metilación del ADN (Jordan et al. 2003, Pion et al. 2003).

A



B

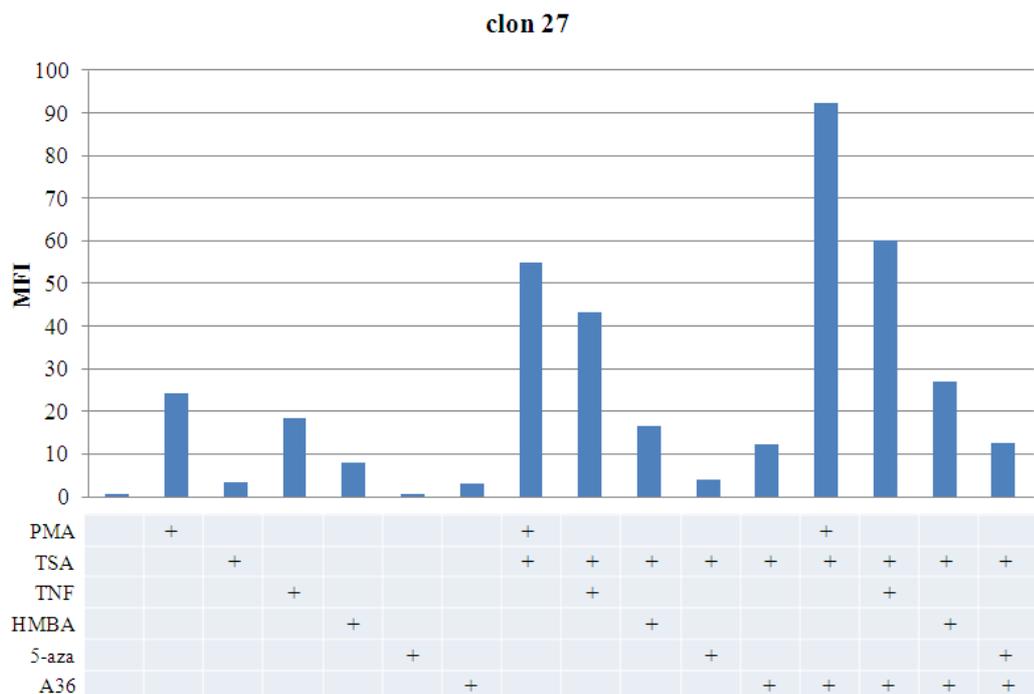
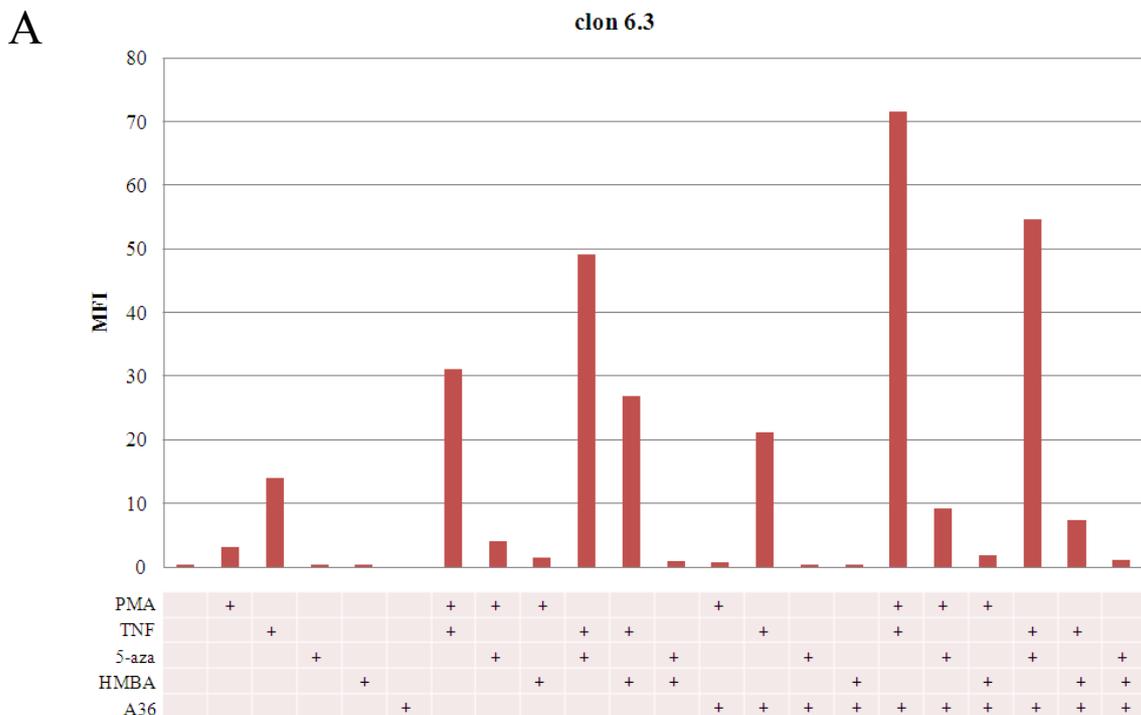


Figura 73. Sinergismos entre compuestos conocidos y el compuesto A36 en el clon 27. (A) y (B) Las células del clon 27 fueron tratadas durante 36 horas con PMA, TSA, TNF, HMBA, 5-aza y A36 (80µM) y varias combinaciones entre estos compuestos. Las células se analizaron en el citómetro de flujo y se representa los valores de intensidad de fluorescencia o MFI. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Al estudiar el clon 6.3 y el efecto que se producía tras las combinaciones de los compuestos, se observó que el A36 no tenía efecto sobre el promotor del HIV, así como tampoco los compuestos TSA, 5-aza, HMBA por sí solos. Se pudieron ver efectos aditivos al añadir tanto TNF como PMA y 5-aza al A36, pero los valores de sinergia mayores se consiguieron mediante el tratamiento con PMA, TNF y A36 (Figuras 74A y 74B).

Recientemente se ha descrito que los clones latentes obtenidos con el vector de 9Kb sufren inhibición por metilación del ADN y que para observar su reactivación hace falta el tratamiento con 5-aza (Kauder et al. 2009). Por ejemplo, la máxima activación se consigue al combinar TNF con 5-aza en el clon 6.3 ya que se debe desmetilar el ADN para que el TNF tenga su máximo efecto (Figuras 74A y 74B). Es muy destacable que en nuestros experimentos consigamos una mayor reactivación con el tratamiento PMA+TNF+A36 y en ausencia de 5-aza.



B

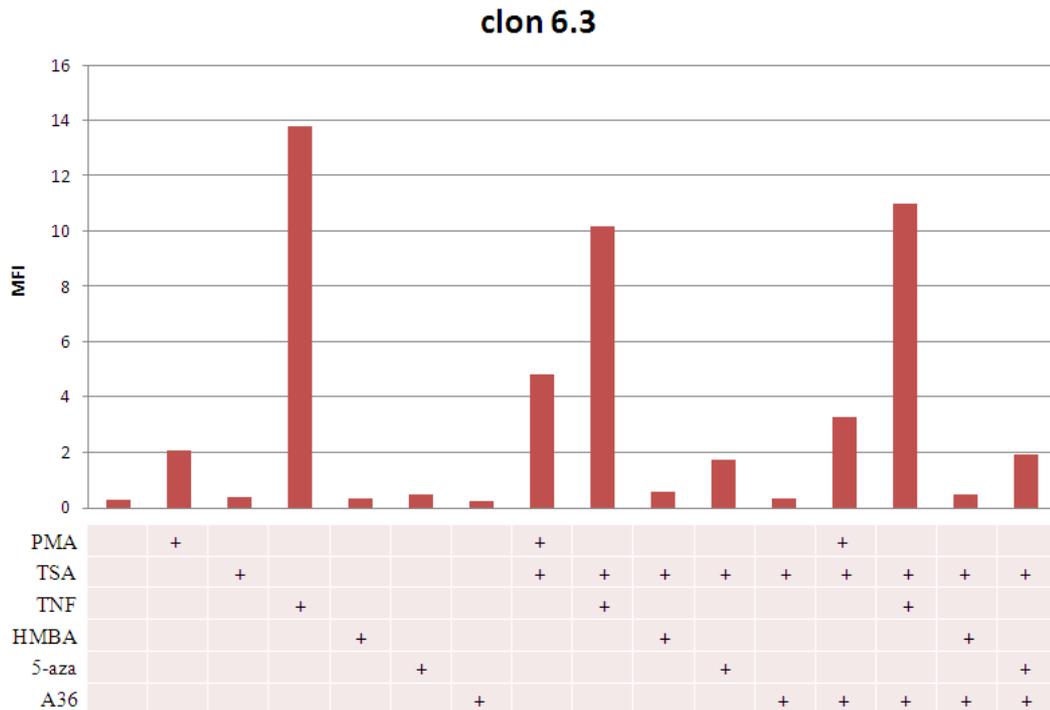


Figura 74. Sinergismos entre compuestos conocidos y el compuesto A36 en el clon 6.3. (A) y (B). Las células del clon 6.3 fueron tratadas durante 36 horas con PMA, TSA, TNF, HMBA, 5-aza y A36 (80 μ M) y varias combinaciones entre estos compuestos. Las células se analizaron en el citómetro de flujo y se representa los valores de intensidad de fluorescencia o MFI. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Nótese que la escala en las ordenadas (MFI) en la figura B son menores que en A.

El hecho de no haber visto apenas reactivación del promotor en un clon con un HIV de 9Kb de longitud (íntegro), a diferencia de lo que habíamos visto en el clon 27 (mini-genoma) nos hizo preguntarnos si este comportamiento se observaría también en otros clones con el HIV íntegro. Para ello, tratamos los clones 11.1, 15.4, 8.4 y 10.6 con A36, 5aza, TNF y combinaciones de los tres compuestos. Se pudo observar que el compuesto A36 no desreprimía el promotor del HIV en el clon 11.1, ni tan solo combinándolo con las otras drogas (Figura 75A). Al tratar el clon 10.6 con A36 se desreprimía el promotor de un 10 a un 24% de GFP, y tras combinarlo con otras drogas, se observaba un ligero aumento en la reactivación al combinar con TNF y TNF+5aza analizando los valores de MFI (Figura 75B). Los clones 8.4 y 15.4 tenían el mismo comportamiento tras el tratamiento con las drogas. A36 no reactiva el promotor latente por sí solo, pero sí que sinergiza de forma importante con TNF, cosa que no hace 5-aza en estos clones (Figura

75C, se muestra el clon 8.4). Este hecho indica la necesidad de combinar A36 y TNF para poder desreprimir eficientemente el promotor.

Todos estos datos mostraron que el tratamiento con A36 en los clones cuyo HIV tiene 9Kb de longitud afecta de manera distinta según el clon utilizado. De esta manera, se mostró una variabilidad entre clones cuya activación del promotor viral podría ser debida a la activación de diferentes vías de señalización.

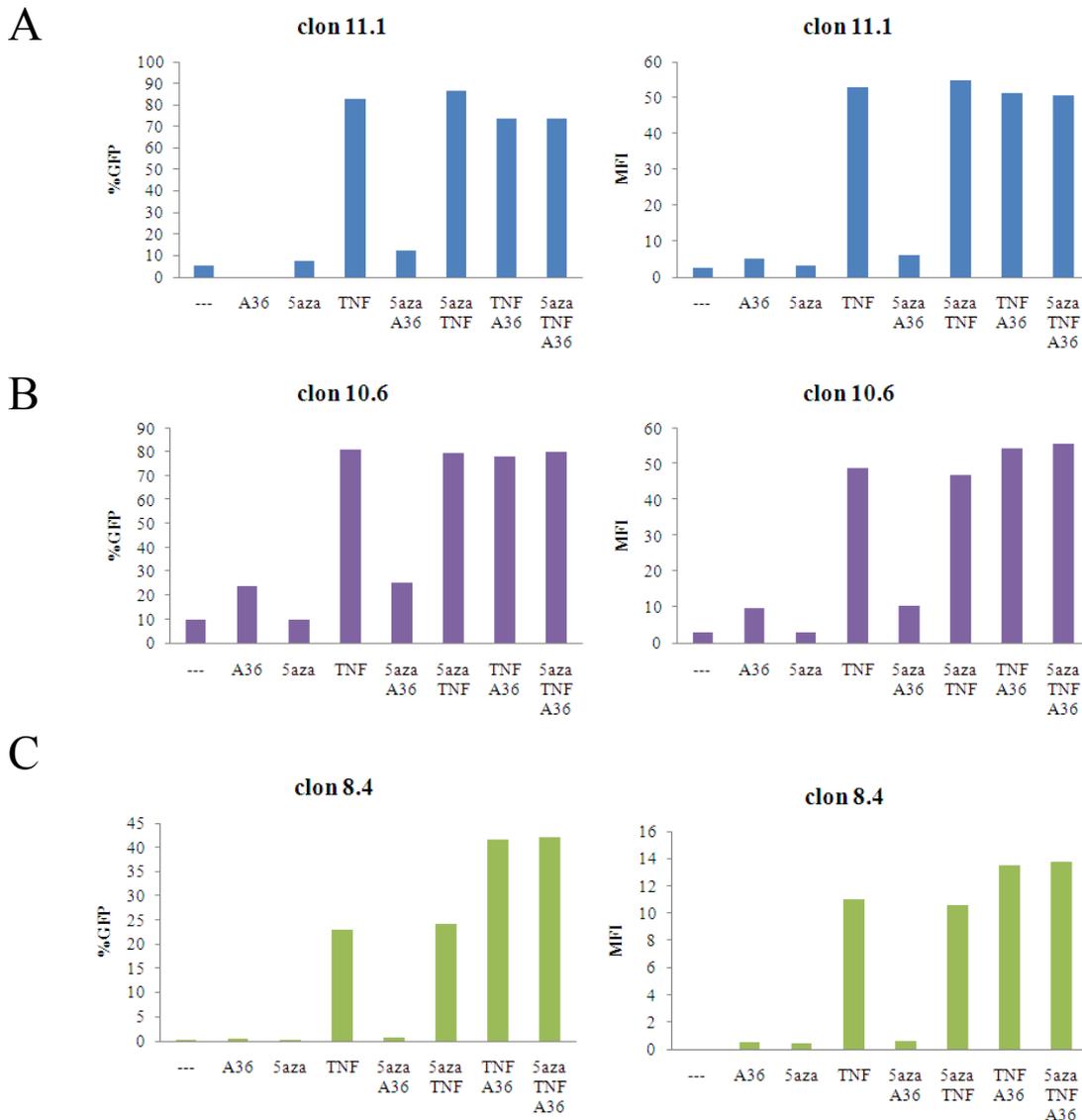


Figura 75. El tratamiento con A36 de clones con un HIV íntegro de 9Kb afecta de manera diferente según el clon tratado. Los clones 11.1, 10.6, 15.4 y 8.4 fueron tratados con A36 (80µM), 5aza, TNF o una combinación de las tres drogas durante 36 horas, tiempo tras el cual se analizaron los porcentajes de GFP y la intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo. Se muestran los datos de GFP y MFI para 11.1 (A), 10.6 (B) y 8.4 (C). Los datos obtenidos con los tratamientos en el clon 15.4 siguen el mismo patrón que los obtenidos en el clon 8.4 (datos no mostrados). Se muestran unos gráficos representativos de 3 experimentos independientes.

6.3.4. Búsqueda del mecanismo de acción mediante el cual está actuando A36

Con el objetivo de conocer qué mecanismo de acción está utilizando A36 para reactivar el promotor viral, se hicieron tratamientos con diferentes concentraciones de A36 y los compuestos TNF, PMA, TSA y HMBA. De esta manera, se pretendía llegar al estado de saturación de la vía de uno de los compuestos y gracias a ello seríamos capaces de ver si A36 podía aumentar la reactivación del promotor o si por el contrario no era capaz de incrementar más la desrepresión por estar actuando por la misma vía de señalización y haberse llegado al estado de saturación de la misma.

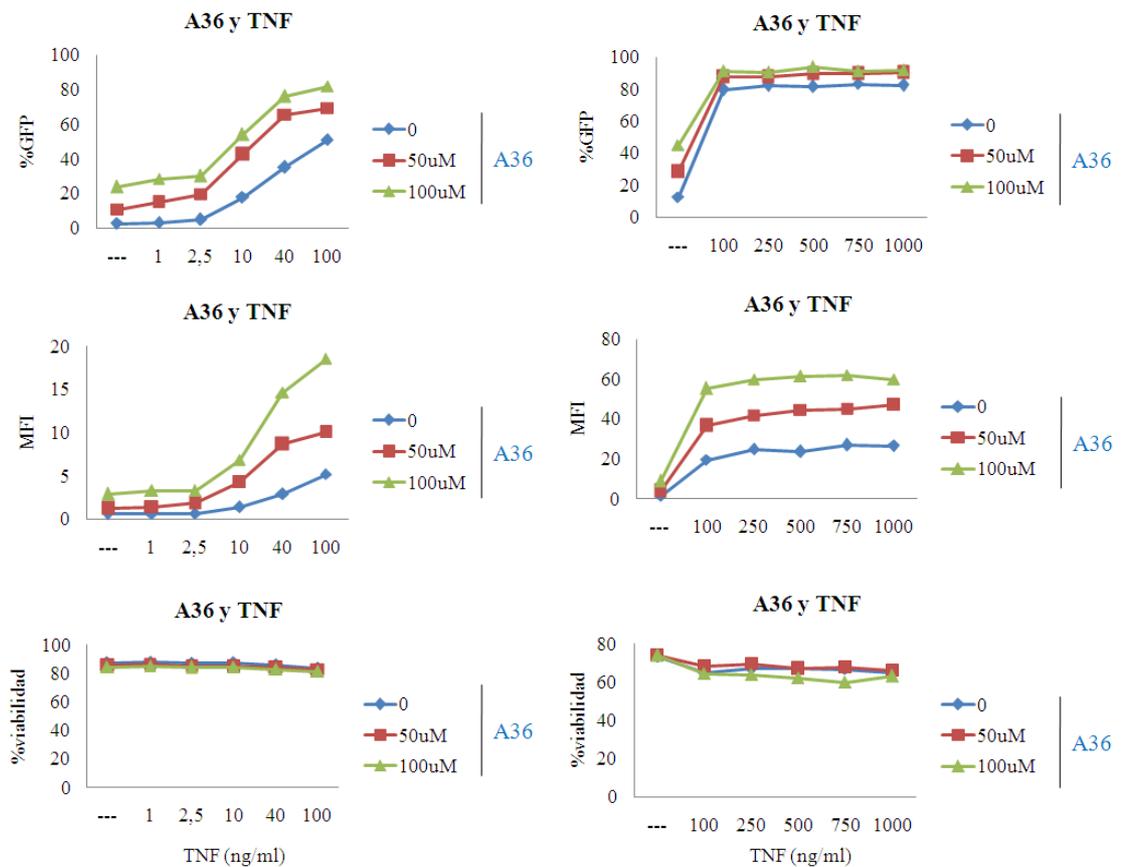
Las células del clon 27 fueron tratadas con dos concentraciones de A36 y 9 de TNF o 5 de PMA durante 36 horas, periodo tras el cual se analizaron las células en el FACS y se midió el porcentaje de GFP, la MFI y la viabilidad. Tras chequear la intensidad de fluorescencia se pudo observar un sinergismo tanto entre A36 y TNF como A36 y PMA, ya que al combinar altas concentraciones de TNF o PMA con A36, la desrepresión del promotor era mayor que con los tratamientos por separado (Figuras 76A y 76B). Al utilizar concentraciones de TNF o PMA con las que se observa la saturación de la vía por la cual se desreprime el promotor viral ($\geq 100\text{ng/ml}$ de TNF y $>160\text{nM}$ de PMA) se vio que A36 ejercía un efecto sinérgico en la activación del HIV. Este hecho mostró que la vía de señalización por la cual está activando A36 es diferente a la utilizada por TNF y PMA.

Al tratar las células con A36 y HMBA con dos concentraciones de A36 y cinco de HMBA se pudo observar una máxima desrepresión del promotor tratando con 20mM de HMBA. A mayores concentraciones se observa una disminución en la reactivación, posiblemente debido a los grandes efectos citotóxicos de HMBA que se observan al analizar los datos de viabilidad (Figura 76C, izquierda). Al combinar dos concentraciones de A36 y 5 de TSA se vio que los valores de reactivación de las células con TSA y A36 eran muy similares a los obtenidos con TSA solo. Este hecho se observaba incluso a concentraciones altas, pero en dichas concentraciones, la toxicidad celular era muy elevada (Figura 76D, izquierda). Así pues, el hecho que tanto el HMBA como el TSA produjesen una gran toxicidad a concentraciones elevadas dificultaba el hecho de analizar los efectos de la saturación de sus vías y el posible efecto de A36 en la desrepresión del promotor viral. Por esta razón, se utilizaron las concentraciones menos tóxicas de ambos compuestos (10mM y 20mM de HMBA y 0.4 μM y 1 μM de

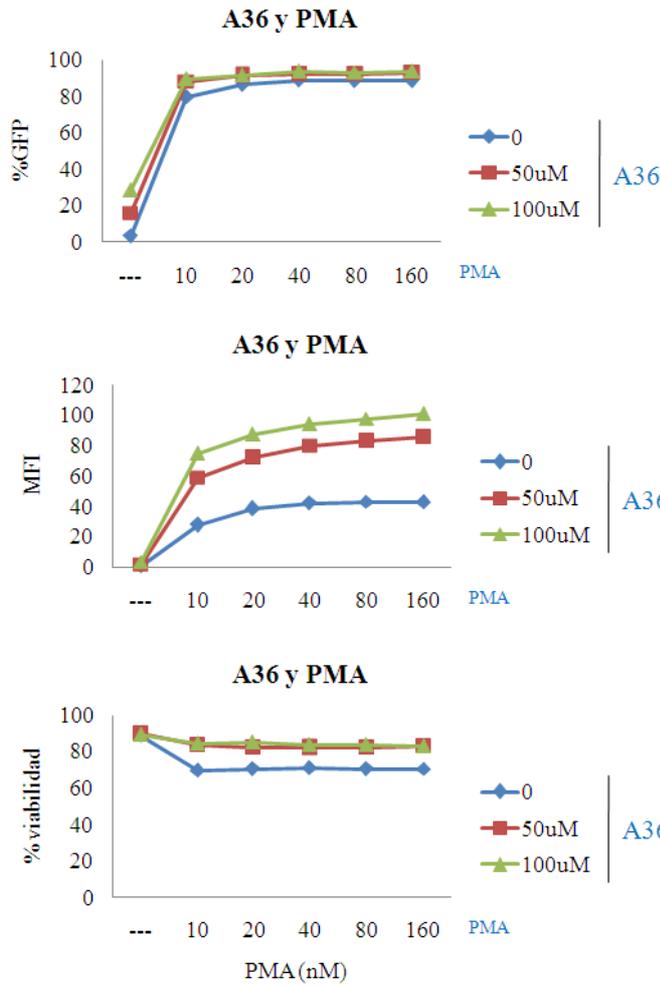
TSA) y diversas concentraciones de A36. En el caso del HMBA se observó una mayor desrepresión al combinar ambos compuestos que al tratar simplemente con A36 (Figura 76C, derecha) y por otra parte, al combinar dos concentraciones de TSA con cinco diferentes de A36 también se pudo comprobar un sinergismo entre ambos compuestos mayor que los compuestos por separado (Figura 76D, derecha). En ambos casos, utilizando las concentraciones de A36 en las que se llega a la saturación de las vías por las cuales reactiva el promotor viral, la adición de HMBA o TSA sinergiza la reactivación del HIV. Este hecho sugiere que las vías por las cuales están actuando los dos compuestos y el A36 son diferentes.

Todos estos datos no nos permiten afirmar que A36 tenga un efecto equivalente a PMA, TNF, HMBA o TSA, más bien indicaría que su acción impacta en una ruta diferente a las estimuladas por estos compuestos.

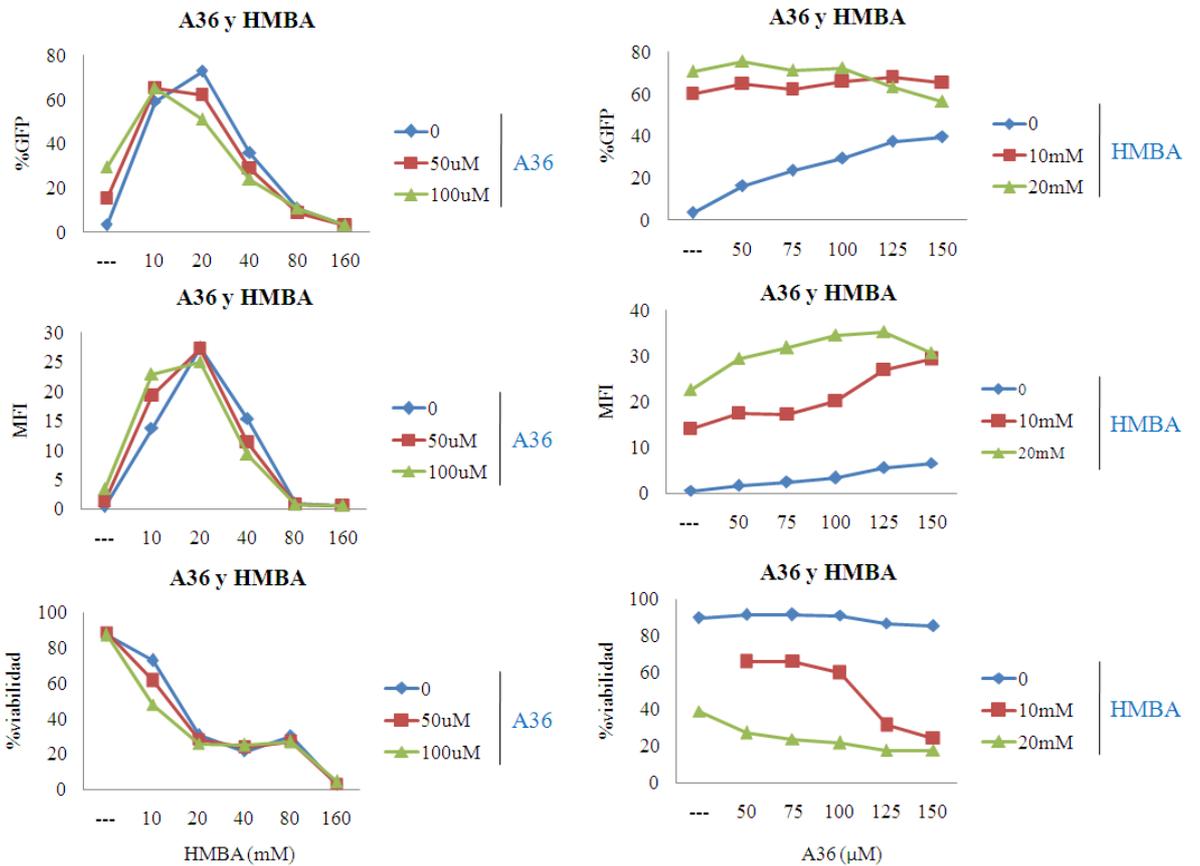
A



B



C



D

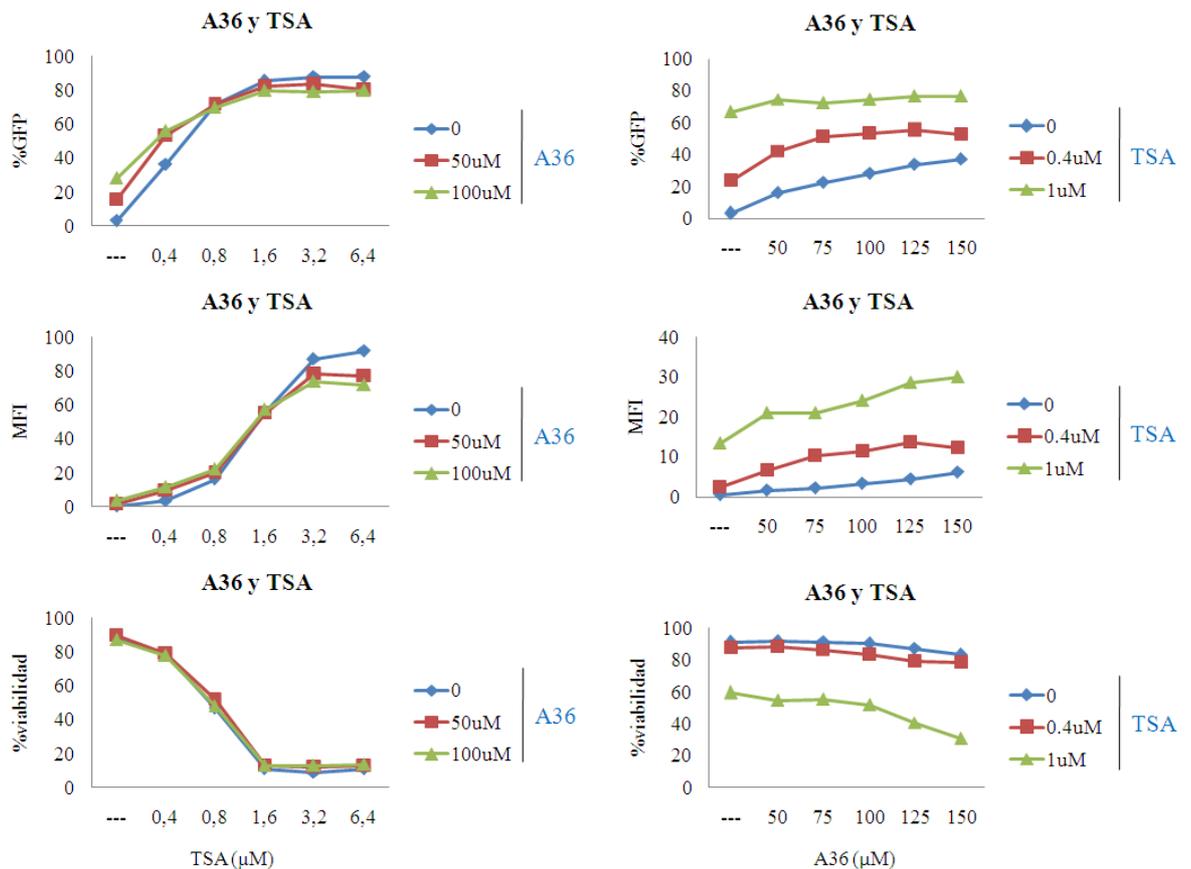


Figura 76. A36 no parece actuar por las mismas vías por las que PMA, TSA, HMBA y TSA reactivan el promotor viral latente. (A) Las células del clon 27 fueron tratadas con 5 concentraciones de TNF (1, 2.5, 10, 40 y 100ng/ml) y 2 de A36 (50 y 100μM) durante 36 horas. (B) El clon 27 fue tratado con 5 concentraciones de PMA (10, 20, 40, 80 y 160nM) y 2 de A36 (50 y 100μM) durante 36 horas. (C) Las células del clon 27 fueron tratadas durante 36 horas con HMBA (10, 20, 40, 80 y 160mM) y A36 (50 y 100μM) (**izquierda**) y posteriormente se utilizaron 5 concentraciones de A36 (50, 75, 100, 125 y 150 μM) y 2 de HMBA (10 y 20mM) (**derecha**). (D) El clon 27 fue tratado con TSA (0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4mM) y A36 (50 y 100μM) (**izquierda**). A continuación se utilizaron 5 concentraciones de A36 (50, 75, 100, 125 y 150 μM) y 2 de TSA (0.4 y 1μM) (**derecha**) En ambos casos, el tratamiento fue de 36 horas. En todos los casos, las células se analizaron en el citómetro de flujo tras las 36 horas de tratamiento, analizando los porcentajes de GFP, la MFI y la viabilidad celular.

6.3.5. Análisis del efecto de A36 sobre un modelo de HIV en células 293T

Otro modelo celular que se utilizó con la finalidad de probar el compuesto A36 sobre el promotor HIV consistió en transfectar las células 293T con un vector expresando el LTR viral, el cual está asociado a la luciferasa como reportero (LTR-luc). Tras la transfección, se trataron las células con A36, EGF, PMA, TSA y TNF y el ensayo de

luciferasa mostró que tanto el compuesto A36, como el resto de drogas eran capaces de activar el promotor del HIV, aumentando su expresión en relación al control sin tratamiento (Figura 77).

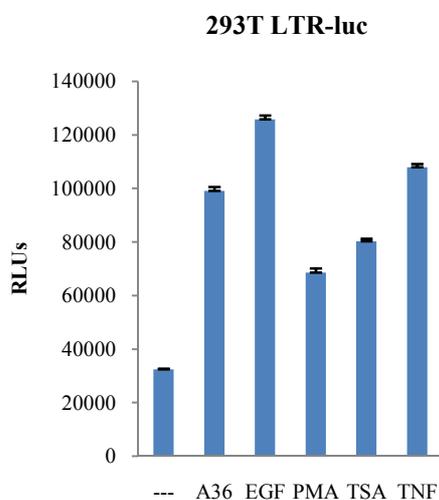


Figura 77. El A36 es capaz de activar el plásmido expresando el promotor viral asociado a un reportero luciferasa en 293T. Las células 293T fueron transfectadas con el plásmido LTR-luc y un día tras la transfección, las células fueron tratadas con los diferentes compuestos A36 (80 μ M), EGF (50ng/ml), PMA, TSA, y TNF. Tras 36 horas de tratamiento, 5 μ g de proteínas del extracto total de las células con los diferentes tratamientos fueron utilizadas en un ensayo de luciferasa. Se muestran los valores como unidades de luciferasa o *Relative Light Units* (RLUs).

6.3.6. Efecto de A36 sobre diversas vías de señalización celular

El LTR viral contiene lugares de unión para varios factores de transcripción, incluyendo NF κ B, NFAT, AP1 y SP1. Con el fin de explorar si el efecto de A36 es a través de la activación de alguna ruta de señalización que active algunos de estos factores de transcripción, se utilizaron una serie de plásmidos reporteros conteniendo los lugares de unión de NF κ B, NFAT, AP1 y SP1 asociados al gen luciferasa. Las células 293T fueron transfectadas con cada uno de los plásmidos y tratadas con diferentes compuestos. Se pudo observar que el compuesto A36 era capaz de activar por sí solo las vías de NFAT y sobre todo AP1. En el caso de NFAT, la activación del promotor viral mediante A36 sinergiza con el tratamiento con PMA+Ionomicina (Figura 78A), y en el caso de AP1, sinergiza con PMA+Iono+TSA (Figura 78B). El plásmido NF κ B respondía a TNF, activación que es mayor con la combinación TNF y A36 (Figura 78D). Por último, el plásmido SP1-luc no se ve alterado tras la adición de A36, ni

compuestos combinados con A36 (Figura 78C). Los resultados mostraron que A36 potencia la activación de la ruta de NFκB por TNF, pero no hay indicios directos de que A36 pueda activar esta ruta por sí solo. A36 también parece estar actuando sobre algún mecanismo que acabara activando las vías AP1 y NFAT.

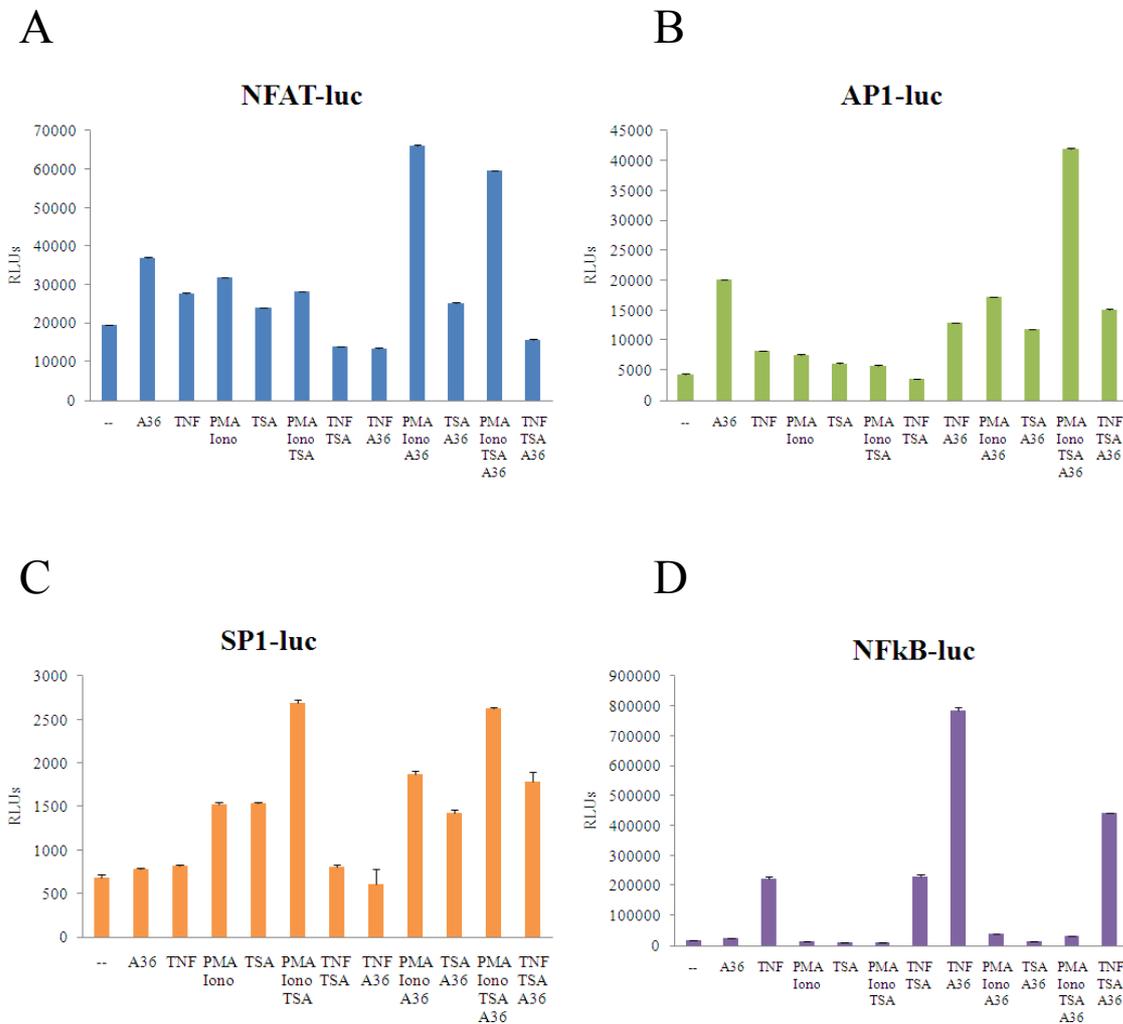


Figura 78. A36 podría estar actuando sobre las vías de NFAT y AP1 y potencia la activación de NFκB por TNF. Las células 293T fueron transfectadas con plásmidos expresando NFAT-luc, AP1-luc, SP1-luc y NFκB-luc. Un día tras la transfección las células fueron tratadas con los diferentes compuestos durante 36 horas, periodo tras el cual se lisaron y se utilizaron 5µg de proteínas en un ensayo de luciferasa. Se muestran los valores como unidades de luciferasa o *Relative Light Units* (RLUs).

6.3.7. Estudio de la implicación de A36 sobre las vías de la quinasa PKC, de la MAP quinasa ERK y de la PI3K

Con el fin de poder saber el mecanismo por el cual el compuesto A36 es capaz de reactivar el promotor latente también se utilizaron una serie de inhibidores de diferentes

vías de señalización. Una primera vía que se estudió fue la vía de la PKC (*Protein Kinase C*) puesto que es una ruta que puede activar NFκB por una ruta diferente a TNF y cuya activación mediante la adición de PMA ha sido altamente descrita (Verin et al. 2000, Petiti et al 2010). Aunque la activación de PKC puede activar NFκB, NFκB se puede activar mediante otras proteínas, tales como PI3K o TNFR.

Se trataron las células del clon 27 con diferentes concentraciones del compuesto GF109203X, un conocido inhibidor selectivo de la vía de la PKC, y combinándolo con PMA, TSA, TNF y A36. El resultado mostró una inhibición selectiva de la reactivación del promotor mediada por PMA tras el tratamiento con el inhibidor GF109203X, pero no se observó dicha inhibición tras el tratamiento con TSA, TNF o A36 (Figura 79). Estos datos indicaban que la desrepresión del promotor del HIV tras el tratamiento con A36 no está mediada por la activación de la proteína.

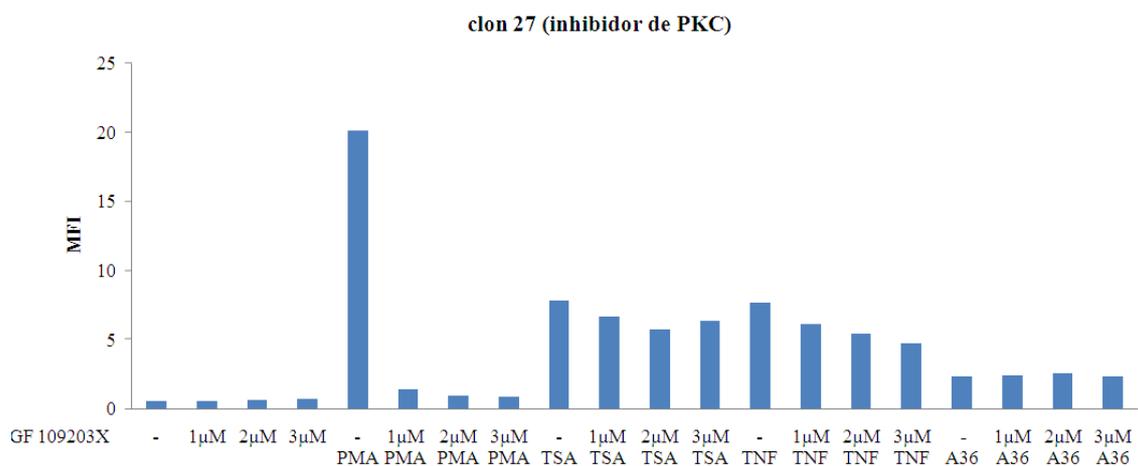


Figura 79. La reactivación del promotor viral mediada por A36 no se debe a una activación de la vía de la PKC. Las células del clon 27 fueron tratadas durante una hora con el inhibidor GF109203X a 3 concentraciones diferentes (1µM, 2µM y 3µM), periodo tras el cual se trataron las células con PMA, TSA, TNF y A36 (80µM) durante 24 horas. La expresión del virus se midió en el citómetro de flujo y se muestran los resultados de la intensidad de fluorescencia. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes.

A continuación estudiamos tanto la vía de señalización de la proteína quinasa activada mitogénicamente (MAP quinasa) ERK como la vía de PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) y Akt. Para ello, usamos los inhibidores PD98059, el cual es específico para la vía de ERK, y Wortmanina, la cual inhibe la PI3K. Las células del clon 27 fueron

tratadas con PD98059 y Wortmanina y, posteriormente, con PMA, TSA, TNF y A36. Tras analizar las células en el citómetro de flujo se pudo observar que la activación del promotor viral mediada por PMA dependía mayormente de PKC y la posterior activación de NFκB, aunque la ruta de ERK también parecía tener un papel importante debido a la activación de AP1 o bien a un posible efecto de ERK sobre PKC o NFκB (Figura 80). La activación del promotor viral por TNF no dependía ni de PKC ni de ERK ni de PI3K ya que el TNF es capaz de activar la vía de señalización del NFκB a través de la ruta TNFR-TRADD-TRAF2 (véase Figura 12, introducción), la cual es independiente de dichas vías. En el caso de A36, se observó que la adición de ambos inhibidores no afectaba la desrepresión del promotor del HIV mediada por el tratamiento con A36, la cual cosa sugería que el A36 no reactiva el HIV mediante la activación de la vía de la MAP quinasa ERK o la vía de PI3K (Figura 80) pero tampoco parece activar por sí solo la ruta de NFκB tal y como hemos visto en experimentos con el reportero NFκB-luc (Figura 80)

Todos estos resultados nos han permitido descartar varias posibles vías de activación de A36 lo cual apunta hacia una ruta inesperada y hasta la fecha no explorada habitualmente para la activación del HIV.

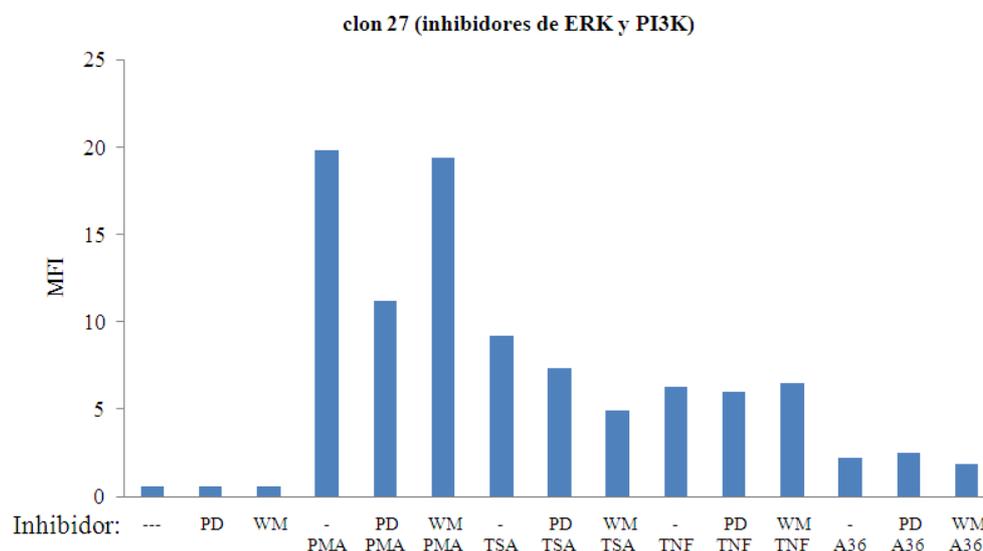
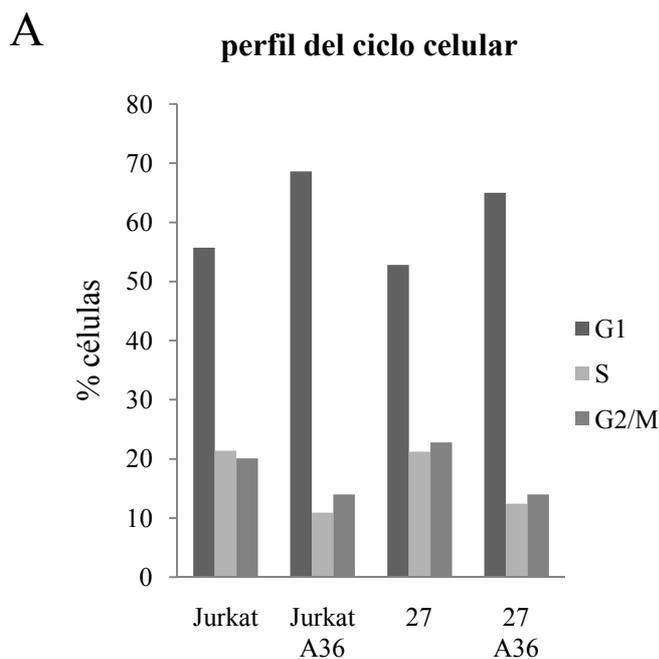


Figura 80. La desrepresión del promotor del HIV tras el tratamiento con el compuesto A36 no se debe a una activación de la vía de la MAP quinasa ERK o de la vía de PI3K. Las células del clon 27 fueron tratadas durante una hora con los inhibidores PD98059 (25μM) y Wortmanina (WM) (0.1μM). Tras este tiempo, las células fueron tratadas con PMA, TSA, TNF y A36 (80μM) durante 24 horas. La

expresión del promotor viral observada mediante la intensidad de fluorescencia. Se muestra un ejemplo representativo de 2 experimentos independientes.

6.3.8. Análisis del ciclo celular tras el tratamiento con el compuesto A36

Con el objetivo de conocer si el compuesto A36 influía de alguna manera sobre el perfil del ciclo celular se trataron las células Jurkat y el clon 27 con A36 durante 36 horas, periodo tras el cual se analizaron las diferentes fases del ciclo. Los resultados mostraron que en ambas células el compuesto A36 producía un claro arresto de las células en la fase G1 y una consecuente disminución del número de células presentes en las fases S y G2/M (Figura 81A). La siguiente pregunta que se quiso contestar fue si este comportamiento visto en el perfil del ciclo celular tras el tratamiento con A36 era específico de este compuesto o si por el contrario otros compuestos también eran capaces de alterar el ciclo de las células. Con este fin, se trataron las células Jurkat con PMA, TSA y A36 durante 36 horas y tras este tiempo se hizo una tinción con Ioduro de Propidio y se analizaron las diferentes fases del ciclo. Los tratamientos con PMA y A36 mostraron un perfil del ciclo celular muy parecido, con un gran arresto en G1, mientras que el TSA no producía un arresto tan considerable como PMA y A36 (Figura 81B). Al analizar la viabilidad de las células se pudo observar que el tratamiento con PMA era el que producía una mortalidad más elevada de los 3 compuestos tras las 36 horas, pero A36 no tenía ningún efecto sobre la mortalidad celular (Figura 81C).



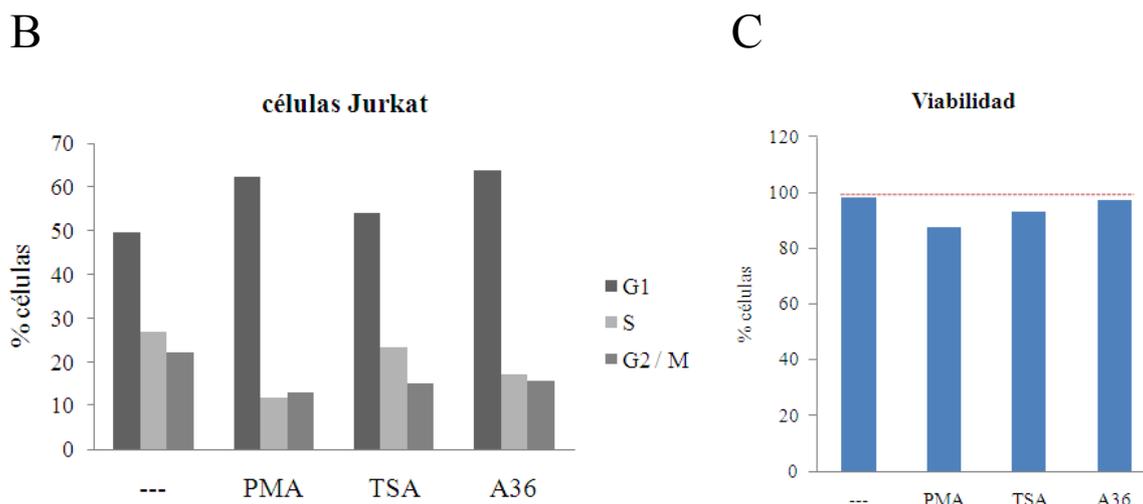


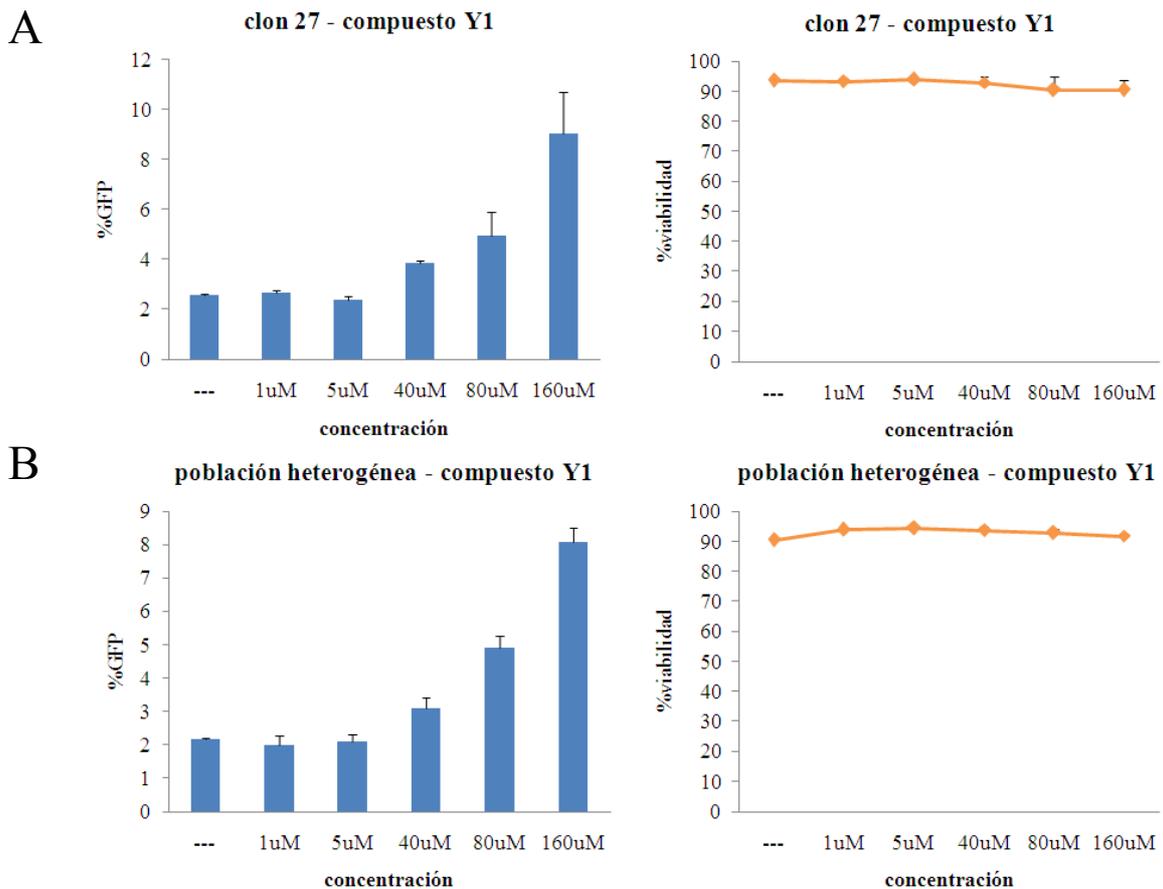
Figura 81. El tratamiento con A36 provoca un claro arresto de las células en G1, comparable al observado tras el tratamiento con PMA. (A) Las células Jurkat y el clon 27 fueron tratados con A36 (80 μ M) durante 36 horas, periodo tras el cual se hizo una tinción con Ioduro de Propidio **(B)** Las células Jurkat se trataron con PMA (10nM), TSA (400nM) y A36 (80 μ M) durante 36 horas y se tiñieron las células con Ioduro de Propidio para poder observar las fases del ciclo celular **(C)** Se analizó la viabilidad de las células Jurkat tras los diferentes tratamientos.

En resumen, se pudo observar como el compuesto A36 era capaz de alterar el patrón de ciclo celular de las células en estado basal, aumentando las células presentes en G1 y disminuyendo las que están presentes en las fases S y G2/M. Este patrón era comparable al observado tras la adición de PMA a las células.

6.3.9. Estudio del efecto de otros compuestos derivados de las moléculas originales de clase I

A continuación testamos dos nuevos compuestos que obtuvimos de una colaboradora en el Parc Científic de Barcelona. Uno de ellos (Y1) era parecido a A36 pero con algún sustituyente (no se muestra la estructura química por estar en proceso de patente). El otro (Y2) tenía la estructura de los compuestos de clase I pero sin ningún sustituyente ni en R2 ni en R5. Nuestro objetivo consistía en saber si alguno de estos compuestos era capaz de desreprimir el promotor viral de manera eficiente y poder estudiar los detalles de la estructura química para poder conocer qué parte de la molécula es importante para la reactivación.

Para ello, los compuestos Y1 y Y2 fueron probados a diferentes concentraciones en el clon 27 y la población heterogénea latente durante 36 horas, periodo tras el cual se analizó la expresión de GFP y la viabilidad de las células. Con el compuesto Y1 se consiguió desrepresión del promotor del HIV a concentración elevadas, aunque los valores no son tan elevados como con el compuesto A36. Al igual que éste, la viabilidad de las células tras el tratamiento era muy elevada (Figuras 82A y 82B). Al observar los resultados con el compuesto Y2 en el clon 27 se observó un aumento en la expresión de GFP desde un 2,5% a un 4%, y en la población heterogénea latente, se observaba un aumento del 2 al 6% (Figuras 82C y 82D). Estos valores eran muy bajos comparados con los valores de desrepresión con los compuestos de clase 1 (véase Figura 65B). Otro punto a destacar era la mortalidad que causaba este compuesto sobre todo en el clon 27, mortalidad que también se vio al tratar las células con los compuestos de clase 1.



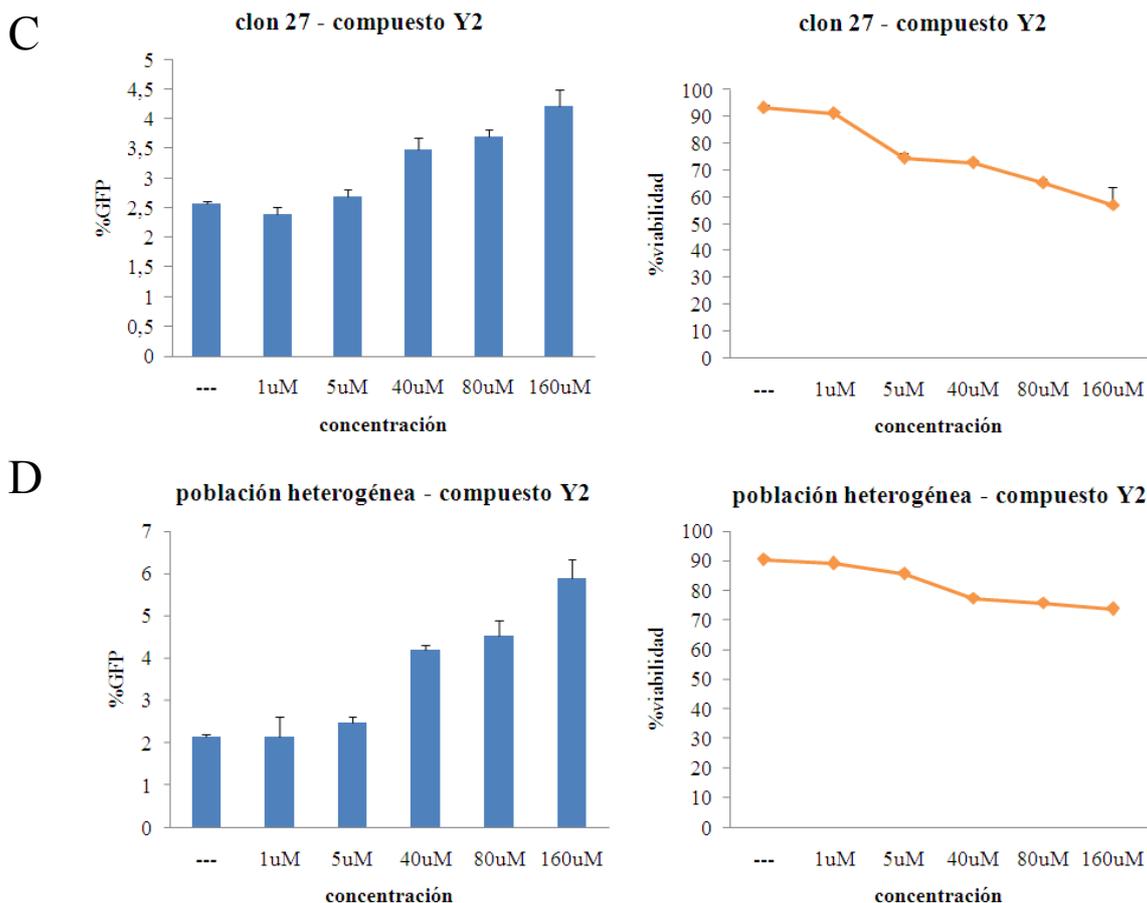


Figura 82. Reactivación del promotor del HIV tras el tratamiento con los compuestos Y1 y Y2. Las células del clon 27 (A y C) y la población heterogénea latente (B y D) se trataron con diferentes concentraciones (1 μ M, 5 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 160 μ M) de los compuestos Y1 (A, B) y Y2 (C, D) durante 36 horas, periodo tras el cual se analizó la desrepresión del promotor medida mediante porcentaje de GFP (gráficos de la izquierda) y la viabilidad de las células (gráficos de la derecha).

A continuación nos propusimos volver a hacer el cribado virtual de moléculas partiendo de los compuestos originales, teniendo en cuenta la estructura química del compuesto A36, el cual había dado positivo en el análisis. El cribado virtual volvió a dar como resultado compuestos parecidos a los compuestos originales, de los cuales se eligió un total de 15 moléculas cuya estructura química se basaba en el anillo quinoleína presente en los compuestos de clase 1. Los 15 compuestos, nombrados del Z1 al Z15 se trataron en el clon 27 y tras 36 horas se analizaron las células en el citómetro de flujo. Los resultados mostraron que el compuesto Z10 desreprimía el promotor de manera tan eficiente como A36 pero causando una gran mortalidad entre las células (Figura 83). Este hecho hace que se deba descartar dicho compuesto para seguir optimizando un

posible tratamiento para desreprimir el promotor latente, y deja el compuesto A36 como el mejor entre todos los compuestos probados.

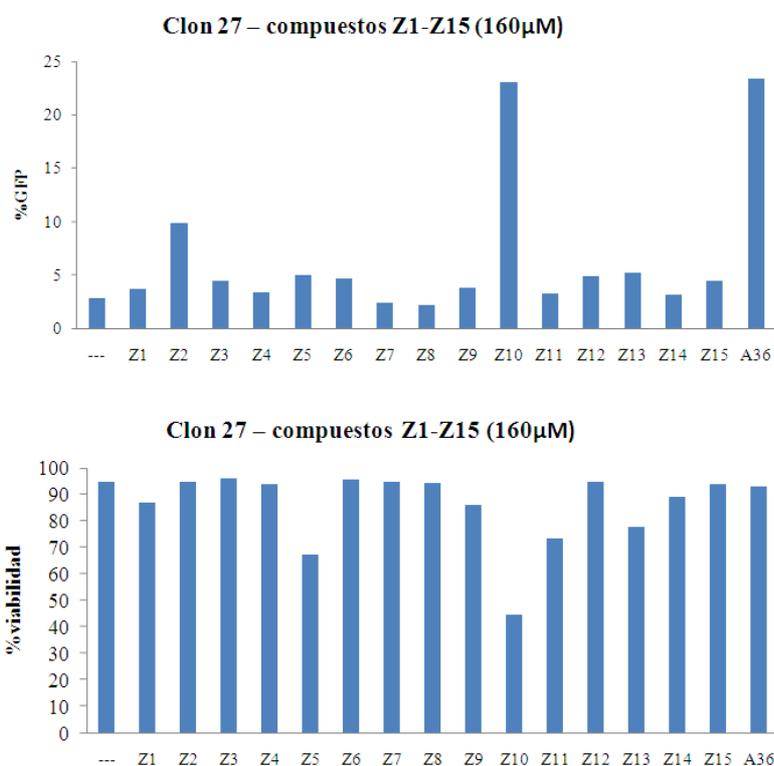


Figura 83. El compuesto Z10 es capaz de desreprimir el promotor hasta valores parecidos al A36, pero causando una gran mortalidad. Las células del clon 27 fueron tratadas a una concentración de 160µM con los 15 compuestos obtenidos del cribado virtual (Z1-Z15) durante 36 horas, periodo tras el cual se analizaron las células en el citómetro de flujo. Se muestran los valores de desrepresión del promotor medidos como porcentaje de GFP y la viabilidad de las células tras el tratamiento.

Por último se probaron otra serie de 42 compuestos, los cuales se habían obtenido computacionalmente a partir de los compuestos originales de clase I (Eric Verdin, comunicación personal). Se trató el clon 27 con cada uno de los compuestos durante 36 horas y tras este tiempo se midió la expresión de GFP y la viabilidad. Se observó la presencia de un compuesto, llamado B37, el cual era capaz de desreprimir el promotor del HIV aunque no hasta valores muy elevados (Figura 84). También se vio que dicho compuesto producía una elevada mortalidad, la cual cosa hacía pensar que no sería un buen candidato para seguir optimizando un posible compuesto como terapia contra los virus latentes integrados.

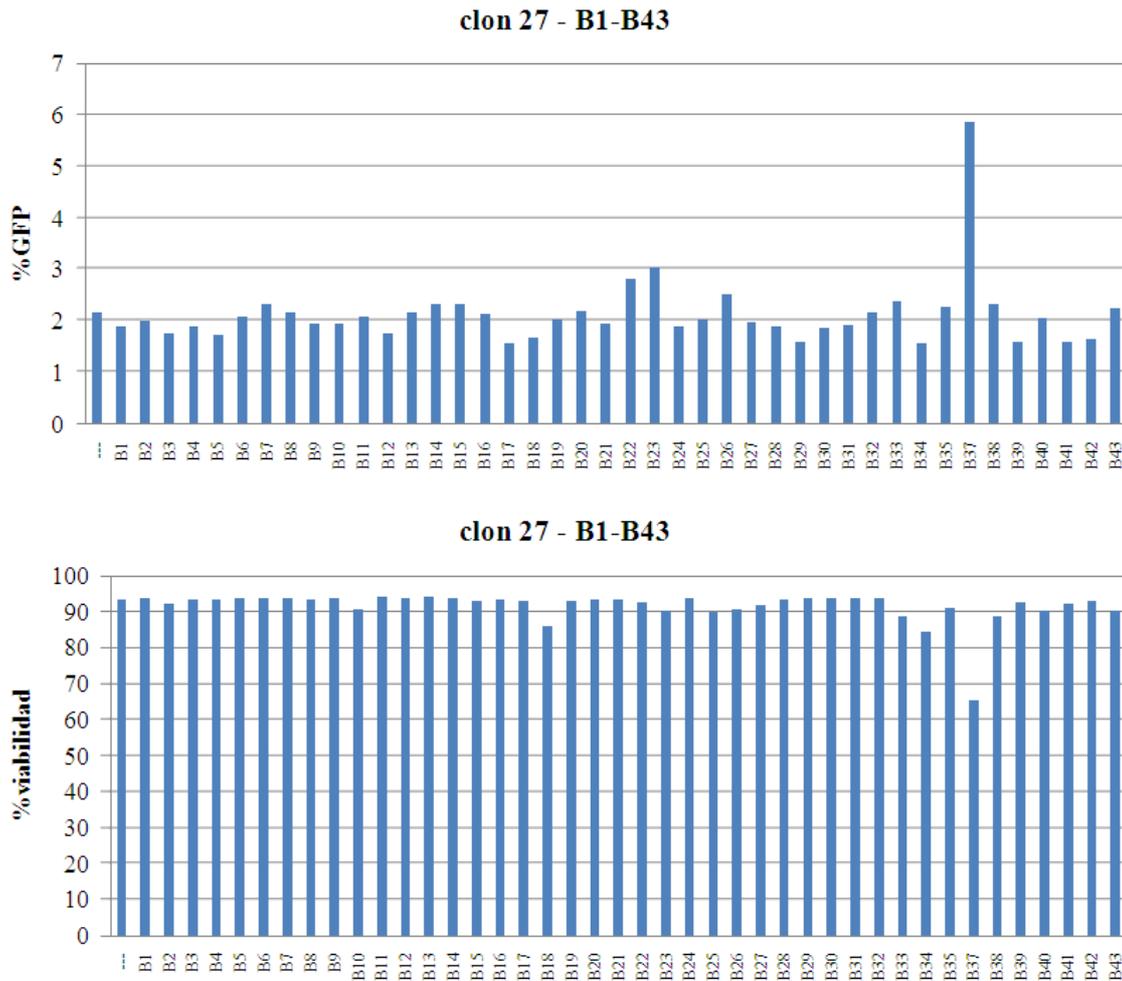


Figura 84. El compuesto B37 es capaz de desreprimir el promotor latente en células del clon 27. (A) Las células del clon 27 fueron tratadas con los 42 compuestos a una concentración de 40µM durante 36 horas. Tras este periodo de tiempo, la expresión de GFP y la viabilidad celular fueron chequeadas mediante el citómetro de flujo.

DISCUSIÓN

1. Generación de un modelo celular de latencia e influencia del lugar de integración en el estado latente del HIV

En el presente estudio nos propusimos entender los procesos que llevan al establecimiento de la latencia del virus del HIV, estudiando los factores que podrían estar involucrados y tratando de saber cuál es el papel del lugar de integración del promotor en la latencia viral.

Para ello, nos vimos en la necesidad de tener un modelo celular que nos sirvieran para estudiar la latencia del HIV en el laboratorio. El sistema elegido había sido descrito anteriormente (Jordan et al. 2003) y consistía en linfocitos T CD4+ los cuales se infectaban con un vector con Tat y GFP bajo el control del promotor del HIV. Las células latentes obtenidas tras el proceso eran aquellas células que en condiciones basales no expresaban el promotor viral pero tras estimulación, éstas se volvían GFP-positivas, indicando una activación del promotor del HIV. Se generaron tanto células con una expresión del promotor viral constitutivamente activa, como células latentemente infectadas, las cuales aparte de mantenerse como una población latente heterogénea también sirvieron para generar clones a partir de células individuales. La actividad transcripcional de los clones latentes fue analizada, observándose grandes diferencias en los porcentajes de células GFP-positivas. Este hecho es debido a que los clones vuelven al estado de latencia a diferentes velocidades tras la eliminación del compuesto activador utilizado para la generación de las células latentes. Tras la estimulación de los clones latentes con varios compuestos que son activadores conocidos del promotor del HIV se observó que algunos clones eran más sensibles a unos tratamientos que a otros. De este modo, el clon 7 responde mejor a un tratamiento con TSA que con PMA o TNF, en cambio, el clon 15 responde mejor a PMA que a TSA o a TNF. Estos hechos nos hicieron concluir que hay diferentes mecanismos o componentes represores que están relacionados con el establecimiento del estado de latencia y esto puede explicar las diferencias en el comportamiento de las células tras añadir un factor activador.

El estudio de los lugares de integración del HIV en los diferentes clones nos llevó a utilizar un protocolo que consiste en dos PCRs secuenciales que permiten detectar si las integraciones se han dado en regiones alfoideas, que son regiones altamente repetitivas localizadas en la heterocromatina centromérica. En nuestros experimentos pudimos

observar que la integración del HIV en 6 de los 21 clones analizados se localizaba en estas regiones alfoideas o en sus alrededores. En estudios previos ya se había observado esta relación entre integraciones en regiones heterocromáticas y el estado de latencia (Jordan et al. 2003, Lewinski et al. 2005). Los porcentajes obtenidos de integraciones en regiones alfoideas de un total de 971 integraciones estudiadas era de un 4,3% del total (Lewinski et al. 2005). En estos estudios se concluyó que las integraciones en regiones altamente compactadas llevan a un estado de latencia debido a que el ADN está poco accesible. Esta falta de accesibilidad impide que se puedan unir factores de transcripción y la maquinaria de la ARN polimerasa para poder llevar a cabo un proceso de transcripción activo.

Nos propusimos estudiar los lugares de integración de aquellos clones que no estaban localizados en regiones alfoideas y para ello utilizamos un sistema que consistía en digerir el ADN genómico del clon a estudiar y a continuación hacer una ligación de unas secuencias conocidas, llamadas adaptadores. Tras ello, dos PCRs secuenciales nos permitían obtener unos productos de PCR que contenían un fragmento del lugar de integración del HIV los cuales se podían clonar y secuenciar para conocer la integración. Utilizando este mecanismo, pudimos observar que uno de los clones latentes que estábamos utilizando tenía la integración del HIV en un intrón de un gen activo, el gen UBXD8. Este clon no era el único con este tipo de integración, sino que se conocían varios clones cuya integración también se había producido en intrones (Jordan et al. 2003, Lenasi et al. 2008). Lewinski et al. (2005) demostraron que el HIV inducible (o latente) se integraba más frecuentemente en genes transcripcionalmente muy activos en comparación con el HIV constitutivo (24% vs. 14%). Otros estudios hechos con células en reposo de pacientes largamente tratados con antirretrovirales (hecho que disminuye la cantidad de virus activos y aumenta la proporción de células infectadas latentemente) mostraron que un 93% de las integraciones residían en unidades transcripcionales y un 91% de estas integraciones se encontraron en genes transcripcionalmente activos del genoma huésped (Han et al. 2004). Todos estos estudios en los que se ha descrito que integraciones en intrones de genes activos llevan a un estado de latencia del promotor viral pueden parecer una paradoja ya que si el gen huésped se está transcribiendo esto haría pensar que el virus también debería estar transcribiéndose. El hecho que estas integraciones sean latentes se puede explicar por el fenómeno llamado interferencia transcripcional, en el cual, un promotor

transcripcionalmente activo es capaz de silenciar un promotor situado corriente abajo respecto al primero. Esta interferencia transcripcional ha sido descrita en varios modelos celulares en referencia al HIV (Lenasi et al. 2008, Han et al. 2008, De Marco et al. 2008).

Lewinski et al. (2005) describieron otro lugar cuya integración del HIV puede llevar a un estado de latencia, a parte de las integraciones en heterocromatina y en intrones de genes activos. Este lugar son los desiertos génicos, que son regiones del genoma pobres en genes y se caracterizan por una densidad muy baja de islas CpG y una compactación elevada, aunque no llegando a formarse una heterocromatina muy constitutiva como en las regiones de los centrómeros (Figura 1). El silenciamiento del promotor viral se debería a unos niveles de compactación de la cromatina que impedirían la correcta transcripción del promotor viral. Así pues, un estado silente del promotor depende del lugar donde se ha integrado el HIV y del ambiente que rodea a la integración a nivel cromatínico y de accesibilidad de factores de transcripción.

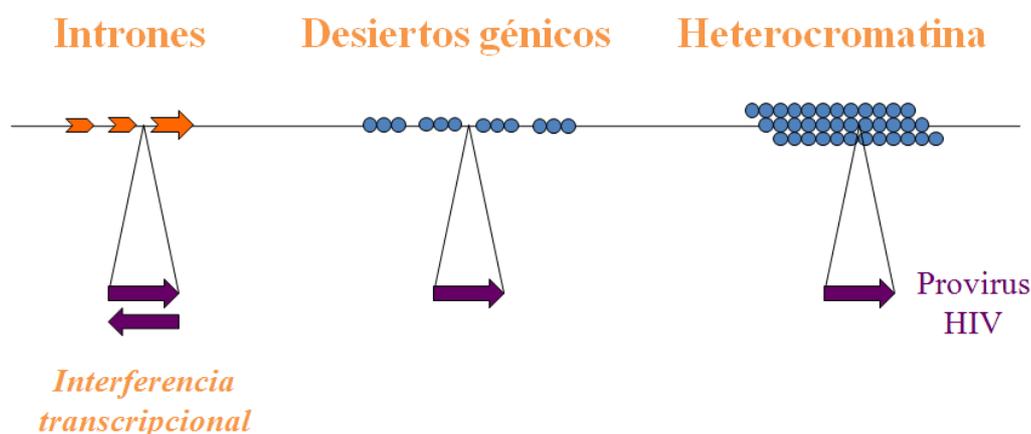


Figura 1. Representación de los 3 lugares de integración descritos los cuales pueden llevar a un silenciamiento del promotor del HIV y a un estado de latencia viral: intrones de genes activos, desiertos génicos y heterocromatina.

La integración del promotor viral en la secuencia genómica del huésped no es al azar. Se ha descrito que el HIV ve favorecida su integración en la secuencia palindrómica 5'-GT(A/T)AC-3'. Aunque esta preferencia es débil, puede predecir el lugar de integración del HIV en comparación con secuencias elegidas aleatoriamente. Se ha descrito que las

células activadas constitutivamente sustentan más integraciones en regiones densas en genes, densas en islas CpG y también en CG, en comparación con las células latentes (Brady et al. 2009). Esta observación también fue descrita por Lewinski et al. (2005), los cuales observaron que las células con un HIV activo se encontraban en regiones intergénicas cortas, indicativas de dominios cromosómicos ricos en genes, en comparación de las regiones intergénicas largas de las células con un HIV latente.

2. Caracterización de los transcritos producidos en clones cuya integración del HIV se localiza en intrones de genes activos

La transcripción del HIV empieza en el +1 localizado en la región R del 5'LTR y termina en el poli-A que se encuentra en la región R del 3'LTR. Tradicionalmente se han descrito un conjunto de *splicings* en la secuencia del genoma viral que dan lugar a la formación de varios ARNm (Figura 2).

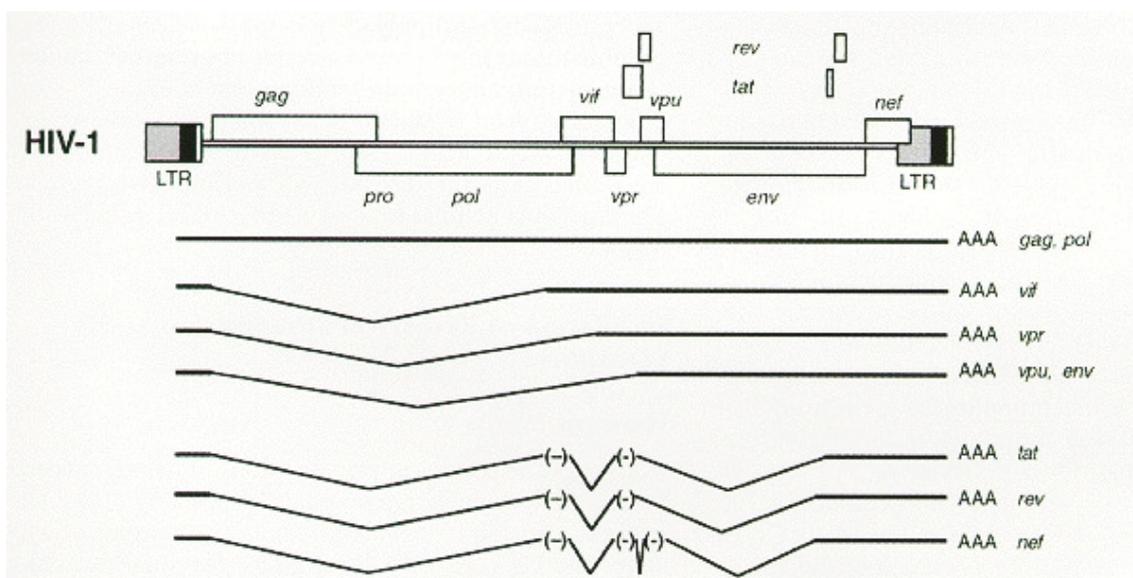


Figura 2. Representación de los diferentes splicing alternativos que dan lugar a la formación de varios transcritos a partir del genoma viral.

Uno de los mecanismos que pueden llevar a la latencia es la integración del genoma viral en un gen transcripcionalmente activo. Así pues, en la presente tesis decidimos estudiar más en profundidad dos clones latentes cuya integración del HIV se había producido en intrones de genes activos. El clon 27 se localizaba en un intrón del gen UBXD8, entre los exones número 8 y 9 del gen y la integración del HIV se había producido en el mismo sentido del gen huésped. El HIV en el clon A2 en cambio se había integrado en sentido contrario de la transcripción del gen UTX, en el cromosoma X. Nuestra primera pregunta fue dirigida a estudiar si estos dos genes eran activos en linfocitos, la cual cosa nos acercaría a la hipótesis de los genes activos como mecanismo para silenciar promotores crípticos dentro de su secuencia. Para ello utilizamos el ARN de las células de ambos clones a nivel basal (sin tratamiento) para hacer una RT-DqPCR

a tiempo real con oligonucleótidos de ambos genes, y genes controles. Para poder comparar las cantidades de transcrito utilizando diferentes oligonucleótidos, los cuales pueden tener eficiencias distintas, se hizo una PCR con cada par de oligonucleótidos utilizando ADN genómico y los valores obtenidos se utilizaron para normalizar los valores con las muestras de ADNc (Lenasi et al. 2008). El hecho de utilizar el mismo ADN genómico en todos los casos, nos permitía no tener en cuenta las diferencias que podía haber por las distintas eficiencias de los oligonucleótidos. Como controles utilizamos genes cuya activación o represión fuera conocida en linfocitos T, tales como CXCR4 (activado), CHES1 (activado) o PCAF (reprimido). Tanto en el caso de UBXD8 como en el de UTX vimos que eran genes activos transcripcionalmente en linfocitos. Este tipo de análisis de la expresión de los genes donde el HIV se había integrado de forma latente ya fue utilizado por Han et al. (2004), en el cual analizaron un total de 56 genes de los cuales, 51 de ellos eran transcripcionalmente activos.

El hecho que la transcripción de los genes UBXD8 y UTX fuera activa sugería que existe transcripción proveniente del gen que está pasando a través del genoma viral la cual cosa podría estar afectando negativamente la transcripción del HIV en un proceso de interferencia transcripcional.

Se ha descrito que durante el estado de latencia se producen transcritos virales aberrantes de longitud corta, observados tanto en los modelos celulares de latencia U1 y ACH2 (Pomerantz et al. 1990) como en linfocitos T CD4+ de pacientes largamente tratados con antirretrovirales (Lassen et al. 2004). En un estudio reciente se ha descrito como la transcripción de un gen podía estar inhibiendo la transcripción del HIV integrado dentro de su secuencia (Lenasi et al. 2008). En este mismo estudio observaban que además de producirse los transcritos salvajes del gen, también había terminación en la región poli-A del 5'LTR del HIV, dando lugar a transcritos aberrantes más cortos.

Primeramente estudiamos los transcritos que se estaban generando en el clon 27 con el fin de saber si se estaban formando transcritos quimera entre el gen UBXD8 y el HIV que pudieran estar terminando aberrantemente y pudiera ser la causa de la falta de expresión del transcrito viral y del estado de latencia. Estos transcritos quimera también demostrarían la existencia de transcripción empezando en el gen y continuando en el genoma vírico. El PMA se había descrito como un activador del gen UBXD8 (Imai et al. 2002) así que se decidió utilizar este compuesto para comprobar el efecto de la

activación del gen endógeno sobre la expresión de los transcritos del HIV. Al tratar con PMA las células del clon 27 y las células Jurkat control se observó que en ambos casos el gen UBXD8 se activaba, aunque la activación en las células Jurkat era visiblemente mayor que en el clon 27, sugiriendo que el hecho de estar activando también el promotor del HIV en el clon 27 con PMA puede estar influenciando negativamente a la expresión del gen endógeno. Estos datos también mostraron la dificultad de poder utilizar el compuesto PMA ya que no podíamos diferenciar completamente el efecto del gen endógeno sobre el promotor del HIV ya que el HIV también es capaz de activarse mediante la adición de PMA a las células.

Observamos la presencia de un tipo de transcritos quimera que empezaban en el gen UBXD8 y continuaba en la secuencia del 5'LTR, pero no se paraba en la secuencia poli-A de este LTR sino que continuaba hacia regiones corriente abajo. Este resultado no coincidía con el obtenido por Lenasi et al. (2008), en el cual parte de la transcripción del gen endógeno finalizaba en el 5'LTR viral.

Algunos de los transcritos que provenían del gen UBXD8, continuaban hacia las regiones corriente abajo del genoma viral sin hacer el *splicing* anterior a la secuencia de Tat, y otros transcritos producían *splicings* incorrectos, dando lugar a secuencias de Tat truncadas.

La proporción de transcritos que provenían del gen y que pasaban por la secuencia del 5'LTR hacia regiones corriente abajo fue cuantificada en referencia a los transcritos virales que empezaban la transcripción en el +1 del 5'LTR mediante RT-DqPCR, tanto en estado basal como tras la estimulación con PMA. Los experimentos mostraron que la cantidad de transcritos provenientes del gen endógeno era muy inferior a los transcritos virales cuya transcripción empezaba en el +1 del LTR, sobre todo tras la estimulación de las células con PMA. Este resultado también es contrario a lo observado por Lenasi et al. (2008) ya que el transcrito que empieza en el gen endógeno y acaba en el poli-A del 5'LTR es uno de los mayoritarios, observado mediante Northern Blot.

Se observó que los transcritos virales que empiezan en el +1 del 5'LTR podían o bien hacer el *splicing* correcto descrito tradicionalmente situado entre el 5'LTR y la secuencia de Tat, o bien podían saltarse las señales donadoras yceptoras de *splicing* y producir un transcrito más largo. A parte, los transcritos podían empezar en el lugar de

inicio de la transcripción viral y reconocer el donador de *splicing* tras el LTR y reconocer como aceptor de *splicing* el del exón posterior del gen UBXD8 tras la integración del HIV. Análisis sobre la posibilidad de estar generando una proteína truncada del gen UBXD8 que pudiera estar funcionando como un dominante negativo mostraron que la posible proteína truncada no entraba en la misma fase que la proteína salvaje, así que se descartó el posible efecto de un dominante negativo.

Al estudiar en más detalle los transcritos del 3'LTR se observó la formación de un transcrito empezando en el promotor del 3'LTR a parte de transcritos que provenían del 5'LTR y los cuales no se terminaban en el poli-A sino que continuaban hacia la secuencia corriente abajo del gen UBXD8. La cuantificación de los dos tipos de transcritos nos mostró que a nivel basal ambos tipos eran muy poco abundantes pero tras el tratamiento de las células con PMA se inducían, produciéndose una mayor cantidad de transcritos. Los valores de inducción mostraron una actividad promotora del 3'LTR que a pesar de que los valores de activación eran menores que los obtenidos tras inducir el 5'LTR confirmaban que no solo podía haber transcripción en de 5'LTR sino también en el 3'LTR. Tradicionalmente se ha descrito solo la transcripción en el +1 del 5'LTR aunque en artículos recientes también se ha mostrado que el 3'LTR también puede tener función promotora (Lenasi et al. 2008). Las secuencias 5' y 3'LTR son idénticas, así que nada impediría a 3'LTR actuar como promotor, excepto la interferencia transcripcional ejercida por el 5'LTR.

Durante el estado de latencia no solo se producen transcritos HIV de longitud corta, sino también se ha observado en estado basal la producción de transcritos de longitud larga. La producción de estos transcritos salvajes se ve inducida por la presencia del activador PMA. La presencia de transcritos salvajes en estado basal ha sido previamente descrita por Lassen et al. (2004) en linfocitos de pacientes largamente tratados con la terapia antirretroviral. En este estudio se describió que la mayoría de transcritos que eran capaces de detectar eran unos transcritos de corta longitud aunque también podían detectar transcritos salvajes en menor medida. Este hecho sugería que no existe un bloqueo completo a nivel de elongación de la transcripción ya que transcritos salvajes se podían detectar también en cantidades pequeñas en células de memoria infectadas con el HIV.

El hecho de que en nuestros experimentos detectásemos transcritos salvajes del HIV en células latentemente infectadas puede parecer paradójico ya que tradicionalmente se ha descrito el estado de latencia como un estado donde se producen transcritos cortos de pocos pares de bases (Adams et al. 1994). Posiblemente, la baja cantidad de transcritos salvajes que se producen debido a bloqueos de la transcripción tanto a nivel de iniciación como de elongación, juntamente con la posible falta de factores de transcripción característicos de la activación de los linfocitos son responsables de que no haya activación del HIV, aunque se pueda estar transcribiendo la secuencia que corresponde a la proteína Tat. Otra posibilidad sería que la secuencia TAR no se estuviera formando correctamente, hecho que impediría la correcta unión de Tat. Aun así, el hecho de que no haya los factores de transcripción tales como NFκB o NFAT que están presentes durante la activación de las células T es un gran impedimento para la activación.

Hemos observado la formación de diferentes transcritos mediante *splicings* alternativos. En estudios previos se había descrito la presencia de un patrón aberrante de transcritos producidos en estado basal de las células latentemente infectadas (Pomerantz et al. 1990) o en linfocitos de pacientes largamente tratados con HAART (Lassen et al. 2004). En nuestros experimentos, pudimos observar que aunque en las células latentes no hay una correcta elongación a nivel basal, se producen transcritos con diferentes patrones de *splicing* los cuales generan una variedad de ARNm diferentes.

A continuación cuantificamos diferentes zonas del transcrito viral mediante RT-DqPCR. Pudimos observar que a nivel basal, la cantidad de transcrito al inicio de la transcripción era muy alto pero esta cantidad iba disminuyendo a medida que iba avanzando en la secuencia del genoma viral. Cabe mencionar que solo los transcritos de longitud completa que hayan añadido correctamente la cola poli-A en su extremo 3' y la caperuza (o *cap* en inglés) en su extremo 5' son los determinantes para la expresión de las proteínas codificadas (Tat y GFP en este caso). Todos aquellos transcritos cortos, deficientes y que no hayan añadido la cola poli-A al no haber llegado al final de la secuencia del transcrito serán rápidamente degradados en el núcleo mediante el exosoma. Tras estimular las células con TNF (inductor de la iniciación) o TNF+HMBA (inductores de la iniciación y elongación, respectivamente), se produjo un aumento en la transcripción del promotor viral, medido tanto a nivel de ARN como de expresión de

GFP. La inducción con TNF+HMBA es mayor que simplemente con TNF, ya que con ambos compuestos estamos promoviendo la inducción de la transcripción tanto a nivel de iniciación reclutando el complejo NF κ B al promotor viral como a nivel de elongación reclutando pTEFb a la estructura de ARN TAR. Se pudo observar un patrón de mayor expresión de la zona de iniciación seguida por una disminución de la cantidad de transcritos en regiones corriente abajo sobre todo al final de la secuencia viral (HIV_U3). Aun así, se producen aproximadamente 10 veces más transcritos en esta región tras el tratamiento con TNF en comparación con el estado basal y unas 100 veces más tras la adición de TNF+HMBA.

Al calcular la cantidad de transcritos en la población heterogénea latentemente infectada, el patrón de de transcritos era parecido al clon 27, observándose una mayor cantidad al inicio de la transcripción, y disminuyendo la proporción a medida que nos encontramos en regiones corriente abajo en la secuencia del HIV. Tras la estimulación con TNF y TNF+HMBA el patrón se conserva, pero la cantidad de transcritos aumenta debido a la estimulación del promotor viral. Por lo tanto, observamos que el tratamiento con HMBA no era capaz de aplanar el patrón de transcritos en las regiones de Tat, GFP y HIV_U3, como se esperaría si este compuesto estimulara completamente la elongación del transcrito HIV.

Una parte a remarcar de los resultados obtenidos es la baja proporción de transcritos híbridos entre el intrón del gen UBXD8 anterior a la integración del HIV y el LTR viral en relación a los transcritos que se producen desde el promotor génico (calculándose mediante la cantidad de transcritos que contiene un exón determinado al inicio de la secuencia del gen UBXD8). Este hecho sugiere que la transcripción del gen endógeno está pasando por encima de la secuencia del promotor viral, pero la secuencia del HIV se está eliminando en parte con el intrón durante el *splicing*. Una pequeña parte de los transcritos provenientes del promotor del gen UBXD8 se está viendo influenciada por la presencia del HIV integrado en la secuencia del gen endógeno y no se produce el *splicing* correcto entre los exones anterior y posterior a la integración sino que está leyendo lugares de aceptores y donadores dentro de la secuencia viral.

Al estudiar el efecto que tiene la integración del HIV sobre la expresión de los genes endógenos donde se ha producido la misma pudimos ver que la integración tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen. Comprobamos los niveles de transcrito

salvaje del gen UBXD8 que se estaba produciendo en el clon 27 comparado con el clon A2 y se vio que en el clon 27 la cantidad de transcrito era menor que el clon A2, la cual cosa nos sugería un efecto negativo sobre la expresión del gen.

Si se comparaba la expresión de UBXD8 en un exón anterior a la integración del HIV a nivel basal en los clones 27 y A2 no se observaban diferencias pero tras la estimulación con TNF, la expresión del gen en el clon 27 disminuía en referencia al clon A2, cuya expresión era la misma que a nivel basal. Se estaba mostrando que la activación del promotor latente dentro del gen estaba disminuyendo la expresión del gen huésped endógeno, afectando negativamente la transcripción de dicho gen. Este hecho recordaba el observado anteriormente en el cual al activar las células del clon 27 con PMA, el gen endógeno aumentaba su expresión pero no de una manera tan elevada como se producía en células Jurkat salvajes. Nos explicábamos este fenómeno sugiriendo que al activarse el promotor viral en el clon 27 se afectaba negativamente la expresión del gen endógeno, que en este caso con PMA también debería inducirse pero no lo hace hasta los niveles óptimos del gen. Este hecho nos sugería un efecto de interferencia transcripcional del gen endógeno sobre la expresión del HIV en estado basal de las células y un segundo proceso de interferencia transcripcional del HIV activado sobre la expresión del gen endógeno.

Mirando la expresión del gen UBXD8 tras la integración del HIV (el exón justamente posterior a la integración) se observó que tras la activación con TNF, la expresión en el clon 27 aumentaba respecto al clon A2, aumento que era mayor tras el tratamiento con TNF+HMBA. Este aumento de la cantidad de transcritos tras la activación debe ser debido a la función promotora situada en el 3'LTR del genoma viral, y posiblemente también debido a posibles transcritos provenientes del 5'LTR y que no se detienen completamente en el poli-A de la región R del 3'LTR.

Este mismo tipo de estudio llevado a cabo en el clon 27 se hizo en el clon A2, cuyo HIV estaba integrado en el gen UTX pero en sentido contrario de la transcripción de este gen. El gen UTX se localiza en el cromosoma X, así que teniendo en cuenta que las células Jurkat provienen de un sujeto masculino, solo hay una copia de este gen la cual cosa facilita el hecho de comparar entre clones al no tener el problema de tener dos alelos del mismo gen. El primer tipo de transcrito que se observó fue la producción del transcrito salvaje, aunque éste era menor tras la inducción del HIV con PMA. Un

segundo tipo de transcrito que se producía era el transcrito viral que empieza en el +1 del LTR viral, el cual se inducía tras el tratamiento con PMA. Por último se observó transcripción a través de la secuencia del genoma viral, generándose un transcrito que no produce el *splicing* entre el exón anterior a la integración del HIV y el 3'LTR viral. Dicho transcrito, obtenido con los oligonucleótidos A+13, suponemos que proviene del gen por el hecho que UTX es transcripcionalmente activo, tal y como ocurría en el caso de UBXD8 en el clon 27, aunque el hecho que el promotor viral en el clon A2 esté integrado en sentido contrario al gen UTX dificulta saber de dónde procede exactamente. Otra posibilidad sería que provenga del mismo promotor viral y que no se detenga en la región poli-A del 3'LTR, o bien ser una mezcla de ambos. Con la finalidad de conocer el sentido de este transcrito se deberían hacer RT-PCR con oligonucleótidos específicos, tales como por ejemplo, utilizar un oligonucleótido en la región posterior a la integración del HIV para obtener un ADNc que sólo provenga del gen UTX.

Al cuantificar mediante RT-DqPCR los transcritos producidos en las diferentes regiones del genoma viral vimos que en estado basal solo disminuía la cantidad de transcritos al final de la secuencia (región HIV_U3), pero tras activación esta disminución se había menos visible. Al comparar la expresión del gen endógeno en el clon A2 y H2 (cuya integración del HIV se localiza en las regiones alfoideas) se pudo ver que tras la inducción del HIV con PMA, la expresión del gen endógeno disminuía de manera notable en el clon A2, posiblemente debido a un efecto negativo de la expresión del HIV en la expresión del gen endógeno donde está integrado el promotor viral. Este efecto negativo, en cambio, no se observaba en el clon H2.

Hemos sugerido el proceso de interferencia transcripcional del gen endógeno sobre la expresión del HIV como posible mecanismo de establecimiento de latencia en células cuya integración del HIV se haya producido en genes transcripcionalmente activos. Nuestros siguientes pasos se centraran en intentar controlar la expresión del gen huésped y ver la influencia de ello sobre el HIV. El hecho de disminuir la transcripción del gen endógeno debería afectar negativamente la interferencia transcripcional que parece estar sufriendo el promotor viral latente, la cual cosa permitiría la desrepresión del HIV.

También será interesante complementar nuestros estudios mirando cual es la relación entre el gen huésped y el HIV en los clones constitutivamente activos. Se ha descrito que tras la infección de un vector conteniendo el genoma viral en linfocitos, las células (expresando mayoritariamente el HIV de forma constitutiva) contenían una mayor cantidad de integraciones en zonas ricas en genes y en regiones ricas en islas CpG, las cuales son características de este tipo de zonas génicas (Schröder et al. 2002). Nuestros experimentos se centrarán en conocer la expresión de los genes donde se ha integrado el HIV de manera estable, los cuales crean ambientes favorables para la expresión del virus.

3. La estructura de la cromatina como factor represor del virus latentemente infectado

3.1. COMPLEJOS REMODELADORES DE LA CROMATINA

Utilizando un modelo de levadura del HIV se observó que SPT6 y CHD1 estaban relacionados con el estado reprimido de la cromatina (Vanti y Gallastegui et al. 2009). En levadura, el promotor del HIV no es funcional y necesita ser fusionado a un promotor que pueda aportar un pequeño pero detectable nivel de transcripción basal, como es el caso del promotor Ty1 (Ty1-HIV). Para estudiar los factores de transcripción relacionados con la actividad del HIV se utilizó el vector Ty1-HIV y el vector Ty1-HIVTARless, el cual no contenía la secuencia TAR (Figura 3).

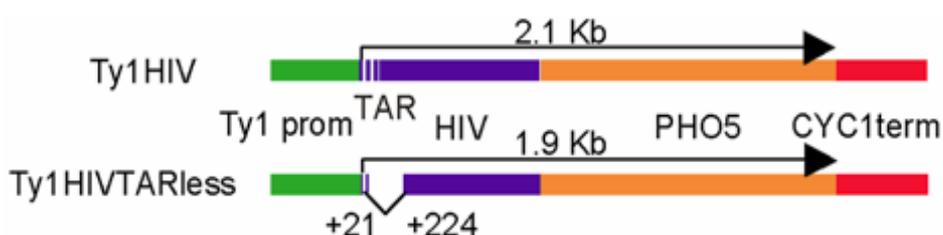


Figura 3. Esquema de los dos tipos de transcritos utilizados en los experimentos con mutantes de SPT6 y CHD1 en levadura. La región PHO5 era necesaria para alargar la secuencia del ARNm y así ser capaces de detectar correctamente el transcrito mediante Northern Blot. Figura extraída de Vanti y Gallastegui et al. 2009.

La expresión de Ty1-HIVTARless en estado basal era superior a la de la cepa Ty1-HIV debido al efecto represor que ejerce la estructura TAR sobre la expresión del HIV (Figura 4, líneas 1 vs. 2 y 5 vs. 6). Respecto a la maquinaria de reensamblaje de los nucleosomas, se observó que al producir mutantes de SPT6 y CHD1 en levadura había activación del promotor Ty1-HIV pero no se producían cambios en los niveles de expresión de Ty1-HIVTARless (Figura 4, líneas 3 vs. 4 y 7 vs. 8) (Vanti y Gallastegui et al. 2009).

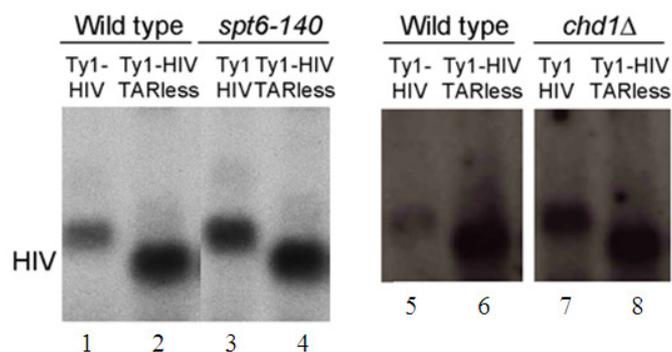


Figura 4. Análisis de la expresión de Ty1-HIV y Ty1-HIVTARless mediante Northern blot, comparando los niveles de ARNm en mutantes de SPT6 y CHD1, y sus respectivas cepas salvajes. Figura extraída de Vanti y Gallastegui et al. 2009.

En la presente tesis, con el fin de conocer si los factores responsables del reensamblaje co-transcripcional de la cromatina durante la transcripción estaban relacionados con el estado latente del virus del HIV en nuestro modelo de latencia en linfocitos humanos, se utilizaron una serie de shRNAs para ver el efecto de su depleción sobre el promotor viral.

Primeramente focalizamos nuestro esfuerzo en estudiar el papel de las proteínas SPT6 y CHD1 en la latencia viral, por ser factores relacionados con el reensamblaje de los nucleosomas. La proteína SPT6 había sido descrita como un factor que se asociaba con el ensamblaje de los nucleosomas *in vitro* mediante su interacción con la histona H3 y funcionando como una chaperona de histonas (Bortvin et al. 1996). CHD1 por su parte era una ATPasa remodeladora de nucleosomas *in vitro* la cual se ha relacionado con el reclutamiento de FACT a los lugares de ensamblaje (Tran et al. 2000, Simic et al 2003).

Infectamos la población heterogénea de células latentemente infectadas con vectores que expresaban los shRNAs de SPT6 y CHD1 y vimos que una pequeña proporción de los promotores latentes se activaban. Este hecho nos indicaba que una pequeña parte de las integraciones estaban reguladas negativamente por estos factores o bien la depleción de uno de estos factores no era suficiente para reactivar el promotor latente sino que sería necesaria la depleción de otros factores represores. Los dos factores SPT6 y CHD1 han sido descritos con funciones en el ensamblaje de la cromatina, y por tanto, tienen su acción en regiones que se están transcribiendo. Este hecho nos hizo pensar que su implicación en la latencia del HIV debía ser en lugares donde el promotor latente

estuviera integrado en genes activos. Por esta razón, se hipotetizó que SPT6 y CHD1 no estarían implicados en la latencia del promotor del HIV en regiones de heterocromatina. El hecho que la población heterogénea latente esté formada por un conjunto de células cuya integración se haya dado en diversos lugares podría explicar en parte la baja desrepresión del promotor viral tras la infección con los shRNAs y se predijo que integraciones únicas en determinados entornos genómicos tendrían una mayor respuesta a la depleción de factores de ensamblaje de la cromatina.

Para probar la implicación de SPT6 y CHD1 en clones cuya integración del HIV se encontrara en regiones transcripcionalmente activas, se utilizaron los clones 27 y A2 cuyo HIV se localizaba en intrones de genes activos. Se infectaron los shRNAs de ambos factores en los clones 27 y A2 y se observó una clara desrepresión del promotor viral tras la selección de las células que estaban expresando los shRNAs. Los valores de desrepresión del HIV en el clon 27 tras la infección con el shRNA de SPT6 llegaban hasta valores cercanos a los obtenidos tras tratar estas células con TSA. Este hecho sugería que SPT6 y CHD1 estaban relacionados con el establecimiento de la cromatina, probablemente debido a que al deplecionar estos factores se produciría un estado más relajado de la cromatina que permitiría la reactivación del promotor viral.

En estos experimentos se detectó que la viabilidad de las células tras la depleción de estos dos factores se veía afectada, sugiriendo que estos dos factores son importantes dentro del funcionamiento de la célula. También se observó que la inhibición de los factores no se producía de manera estable a largo plazo sino que se perdía tras un tiempo, la cual cosa impedía crear una célula latente con una depleción indefinida de alguno de los dos factores.

Al infectar los shRNAs de estos dos factores en clones cuya integración no se localiza en genes activos no se observó ningún tipo de desrepresión del promotor. Son los casos de los clones H2, A1 y C9+. El promotor viral en el clon H2 se localiza en las regiones alfoideas centroméricas, y por tanto está en un ambiente donde la cromatina está muy compacta. Tal y como se había hipotetizado anteriormente, no se observó reactivación del promotor del HIV debido justamente a la localización del promotor en una región transcripcionalmente reprimida y que por tanto ninguno de los dos factores tendría un papel importante. En el caso del clon A1, la integración del HIV se localiza en una zona intergénica en un entorno pobre en genes y por tanto hay poca transcripción, la cual

cosa explicaría que no se desreprimiera el promotor con los shRNAs de los dos factores de ensamblaje de la cromatina. Por último, en las células del clon C9+ donde el HIV está constitutivamente activo, la depleción de SPT6 y CHD1 no parece tener ningún efecto. Posiblemente el hecho de que el HIV está activo es una marca de que la cromatina ya está suficientemente abierta como para que el HIV se exprese constitutivamente a nivel basal. De este modo al deplecionar SPT6 o CHD1 no se observaría ningún efecto ya que la cromatina ya estaría abierta a la maquinaria basal de la transcripción para expresar el genoma viral.

El hecho que ninguno de estos tres clones, H2, A1 y C9+, se vean afectados por la depleción de SPT6 o CHD1 puede ayudar a explicar el hecho que la desrepresión de la población heterogénea latentemente infectada tras la expresión de los shRNAs de ambos factores sea baja. El efecto represivo de SPT6 o CHD1 sobre el HIV se produciría en clones cuya integración del HIV se hubiera producido en genes activos y probablemente los porcentajes de desrepresión del promotor viral latente en la población heterogénea se debe a aquellas células cuya integración se ha producido en regiones transcripcionalmente activas.

Todos estos clones que habíamos probado hasta el momento eran clones con un minigenoma viral de 4Kb de longitud el cual solo contiene los 5' y 3'LTR y las secuencias de Tat y GFP. Otros clones en cambio contienen un vector que expresa el genoma viral salvaje con longitud de 9Kb con la secuencia de GFP en vez de *Nef* y una mutación puntual en el gen *Env* (Bieniasz and Cullen et al. 2000, Jordan et al. 2003). Infectamos los clones latentes 8.4 y 10.6, ambos con el genoma viral de 9Kb y con el HIV integrado en un intrón de un gen, con los shRNAs de SPT6 y CHD1. Tras la infección se observó que en el caso del clon 8.4 (HIV integrado en un intrón del gen DNA helicase V, en sentido contrario) la desrepresión del promotor viral era mucho más clara que en el clon 10.6 (HIV integrado en un intrón del gen SEC1GA, en sentido contrario). Aún así, la desrepresión se veía de manera más clara tras el tratamiento de este clon con TNF+5-aza que en estado basal. Se ha descrito que la metilación del ADN en algunos de estos clones con un genoma viral de 9Kb de longitud (pero no con el minigenoma de 4Kb) es un mecanismo represivo importante que promueve el estado de latencia en estas células (Kauder et al. 2009).

Se generaron unas células Hela latentemente infectadas con el mismo sistema utilizado en Jurkat. La población heterogénea de células Hela latentemente infectadas se infectó con el shRNA de SPT6 y se observó desrepresión del promotor tras la depleción de la proteína. Tras dejar 10 días más las células en cultivo se vio una pérdida de la inhibición de la proteína que se correlacionaba con un restablecimiento del silenciamiento del promotor viral. Este hecho nos sugería que la desrepresión del HIV es un efecto directamente relacionado con la inhibición de SPT6 en las células Hela latentemente infectados con HIV.

Todos estos datos mostraban un efecto de reactivación del promotor viral tras la depleción de los dos factores. Estos resultados recordaban los obtenidos en levadura con promotores crípticos. Los promotores crípticos son promotores que se localizan dentro de un gen activo y en condiciones basales se encuentran silenciados por la actividad transcripcional del gen donde están integrados. Kaplan et al. (2003) observaron que utilizando un mutante de SPT6 se aumentaba la transcripción de varios genes en un *microarray*. También vieron que este mutante de SPT6 producía iniciación en promotores crípticos, tales como FLO8, que en condiciones basales estaban siendo silenciados por una unidad transcripcional fuerte situada corriente arriba de dichos promotores. Al utilizar este mutante se observó que no solo se transcribían los transcritos crípticos, sino también se traducían y se producían proteínas que normalmente no se expresaban (Cheung et al. 2008). Estos trabajos en levadura demostraron que factores que habían sido relacionados con la elongación y el reensamblaje de la cromatina como es el caso de SPT6 eran capaces de silenciar la iniciación de promotores crípticos. Estos factores cerrarían la cromatina tras el paso de la ARN polimerasa II durante el ciclo de transcripción. Así pues, en nuestro modelo actual, la interferencia transcripcional del promotor del HIV en integraciones dentro de genes activos sería causada por el reensamblaje de la cromatina tras el tránsito de la maquinaria de transcripción. La cromatina se iría abriendo para dejar paso a la ARN polimerasa II y sus coactivadores durante la transcripción y tras su paso, los factores de reensamblaje, tales como SPT6 y CHD1 serían los responsables de ayudar al cierre de la cromatina, reensamblando los nucleosomas tras su paso. Esto sería un mecanismo activo de cierre de la cromatina que en el caso que nos concierne mantendría el promotor HIV ocluido para la unión de factores de transcripción celulares al ADN.

En el caso concreto de SPT6 se ha descrito que viaja juntamente con la polimerasa gracias a la unión de su dominio SH2 con la polimerasa elongante, fosforilada en la serina 2 (Yoh et al. 2007). CHD1 ha sido descrito como un factor presente en cromatina transcripcionalmente activa que está siendo transcrita (Sims et al. 2005). El reensamblaje de la cromatina tras la ola de la maquinaria de transcripción mantendría la estructura de la cromatina durante el proceso de la transcripción. La alteración de este proceso, mediante la depleción de estas proteínas con shRNAs supondría una alteración en la estructura cromatínica. La maquinaria de la transcripción abriría la cromatina para facilitar el paso a la polimerasa pero la falta de los factores de reensamblaje no cerraría la cromatina tras de sí, evitando así la formación de nuevo de la barrera cromatínica tras la transcripción que impedía la transcripción viral y favoreciéndose así la expresión del HIV latente (Figura 5).

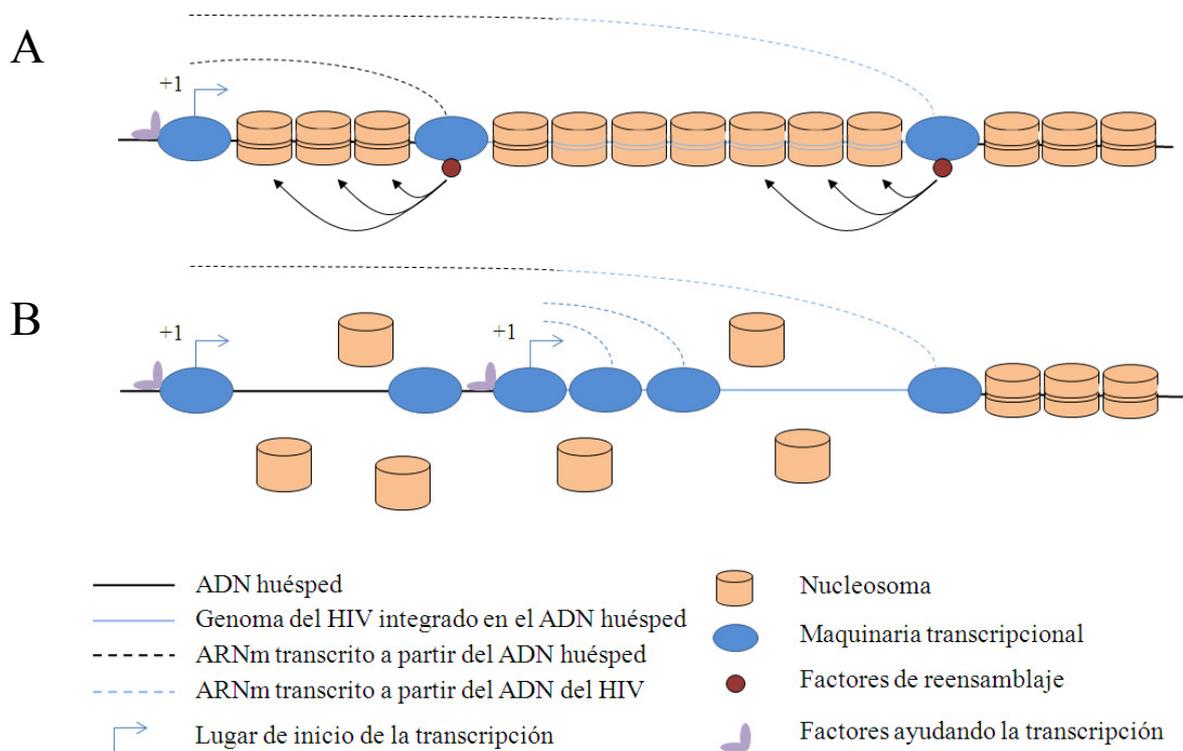


Figura 5. Modelo de interferencia transcripcional que estaría causada por el reensamblaje de la cromatina tras el transcrito de la maquinaria transcripcional. (A). Los factores de reensamblaje de la cromatina que se reclutan en la polimerasa elongante estabilizan los nucleosomas manteniendo la transcripción del HIV a bajos niveles. (B). La falta de los factores de reensamblaje debido a la depleción con shRNAs

Nos propusimos estudiar si el efecto que habíamos observado en la latencia viral tras la depleción de estos dos factores de reensamblaje era único en ellos o si bien la

depleción de otros factores relacionados también nos llevaba al mismo resultado. Para ello, se decidieron estudiar tres factores cuyos mutantes en levadura promovían una iniciación en la transcripción de promotores crípticos (Cheung et al. 2008). En este estudio habían utilizado una construcción que permitía detectar activación del promotor críptico FLO8. En dicha construcción, la región 3' de la transcripción críptica de FLO8 se había reemplazado con la secuencia HIS3 (un marcador de selección en levadura) pero fuera de fase respecto a la secuencia codificante de FLO8. De esta manera, el ARNm funcional de HIS3 solo se podía producir mediante la iniciación de la transcripción críptica de FLO8. Se obtuvieron un total de 50 genes que se clasificaron según su fenotipo (Tabla 1). Se eligieron tres de las proteínas cuya mutación activaba la iniciación de la transcripción del promotor críptico FLO8 y las tres habían estado relacionadas en la literatura con el ensamblaje y el remodelado de la cromatina. Estas proteínas eran ASF1 (ASF1A en humanos), SPT16 (SUPT16H en humanos) y HIR1 (HIRA en humanos).

Table 1. Genes Required for Repression of Cryptic Promoters

Category	Gene	Mutant Phenotype
Histones	<i>HHT1</i>	+++
	<i>HHT2</i>	+++
	<i>HTA1-HTB1</i>	+++
Histone gene regulation	<i>SPT10</i>	+++
	<i>SPT21</i>	+++
	<i>HIR1</i>	+++ ←
	<i>HIR2</i>	+++
	<i>HIR3</i>	+++
Chromatin assembly and remodeling	<i>HPC2</i>	+++
	<i>SPT6</i>	+++ ←
	<i>SPT16</i>	+++ ←
	<i>RTT106</i>	+++
	<i>ASF1</i>	+++ ←
	<i>CHD1</i>	+ ←
	<i>ISW1</i>	++
Rpd35-mediated histone deacetylation	<i>CTK1</i>	+++
	<i>CTK2</i>	+++
	<i>CTK3</i>	++
	<i>SET2</i>	++
	<i>RPD3*</i>	
	<i>SIN3</i>	++
	<i>RCO1</i>	++
	<i>EAF3</i>	+
Histone deacetylation	<i>UME1</i>	+
	<i>HST4</i>	+
Transcription elongation factors	<i>HDA2</i>	+
	<i>BUR1</i>	++
	<i>BUR2</i>	++
	<i>SPT4</i>	++
	<i>SPT5</i>	+++
	<i>CDC73</i>	+
Mediator components	<i>RTF1</i>	+
	<i>SPT2</i>	+
	<i>SIN4</i>	+
	<i>SRB8</i>	+
	<i>SRB9</i>	+
Proteasome function	<i>SRB10</i>	+
	<i>PRE9</i>	+
	<i>UMP1</i>	+
DNA replication and repair factors	<i>HUR1</i>	+
	<i>PMS1</i>	+
	<i>RNR4</i>	+
	<i>ATG11</i>	++
Other categories	<i>DIG1</i>	+
	<i>KEX2</i>	+
	<i>MAP1</i>	+
	<i>PIR1</i>	+
	<i>PMR1</i>	+
	<i>SSD1</i>	+
	<i>YBR246W</i>	+

Tabla 1. Mutantes que activan el promotor crítico FLO8 en levadura. +++ indica que el fenotipo se observa a los 2 días de crecimiento, ++ se observa a los 4 días y +, a los 5 días o más. Con flechas rojas se marcan las proteínas elegidas.

Al infectar los clones 27 y A2 con los shRNAs de estos tres factores pudimos ver que el promotor del HIV se desreprimía, la cual cosa sugería un papel represivo de estas 3 proteínas que ayudaba al establecimiento de un estado de latencia. Este hecho hizo pensar en que, tal y como pasaba con la proteína SPT6, estas proteínas asociadas al ensamblaje de la cromatina podrían estar promoviendo un estado de interferencia transcripcional sobre el promotor viral.

Las proteínas ASF1 y HIR1 en levadura han sido descritas como reguladoras importantes durante la transcripción y se ha mostrado su papel de chaperonas de histonas H3/H4 (Kim et al. 2007). ASF1 media la deposición de nuevas histonas a los nucleosomas durante la transcripción, mientras que HIR1 promueve la deposición de histonas viejas. El balance entre ambas actividades debe ser importante para el mantenimiento y la renovación de la cromatina durante la transcripción (Kim et al. 2007). Se ha visto la interacción de las proteínas ASF1 y HIR1 con la lisina 36 dimetilada en la histona H3 (H3K36me2), modificación mediada por la histona metiltransferasa SET2 (Kim et al. 2009). SET2 ha sido relacionada con el reensamblaje de la cromatina tras el paso de la polimerasa, proceso que es capaz de silenciar los promotores críticos, debido a que es una proteína crucial para quitar modificaciones activadoras de histonas. La H3K36me2 es un lugar de unión del complejo de histona deacetilasa Rpd3S, el cual deacetila las histonas tras el paso de la ARN polimerasa II elongante (Figura 6).

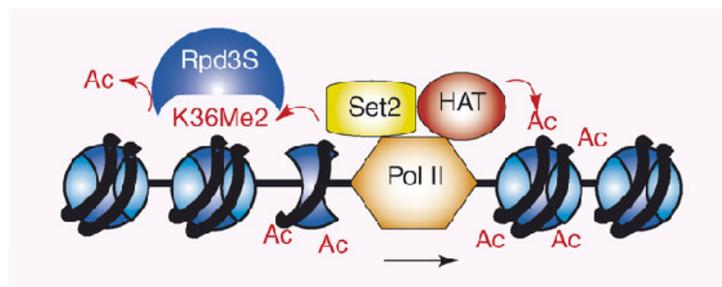


Figura 6. Reclutamiento de proteínas y complejos mediadores de la represión tras el paso de la ARN polimerasa elongante.

Todos estos datos juntamente con nuestros experimentos nos hicieron pensar en un papel represor de las proteínas ASF1A y HIRA, no solo por su efecto directo sobre el cierre de la cromatina mediante el reensamblaje de los nucleosomas tras el paso de la polimerasa, sino también por su relación directa con otras proteínas que promueven un estado represivo tras la elongación de la polimerasa. De este modo, ambas proteínas estarían promoviendo una interferencia sobre la transcripción del promotor del HIV ayudando a cerrar la cromatina tras el paso de la polimerasa.

La proteína SPT16, miembro del complejo FACT juntamente con SSRP1, es una chaperona de histonas H2A/H2B, cuya implicación en el reensamblaje de la cromatina ha sido altamente descrito (Kaplan et al. 2003, Orphanides et al. 1999, Cheung et al. 2008). Es capaz de abrir los nucleosomas facilitando el paso de la ARN polimerasa II y cerrarlos tras de sí, gracias a su función chaperona. Es por esta razón que en nuestro modelo, SPT16 estaría actuando de la misma manera que SPT6, viajando con la ARN polimerasa II mientras ésta está elongando y cerrando los nucleosomas tras su paso, favoreciendo un estado reprimido del promotor del HIV mediante interferencia transcripcional. Al inhibir la expresión de esta proteína mediante shRNAs vemos una desrepresión del promotor viral debido a que no puede cerrarse correctamente la cromatina tras el paso de la polimerasa. Este efecto ya había sido descrito en levadura anteriormente en promotores crípticos (Kaplan et al. 2003, Cheung et al. 2008).

Tal y como habíamos visto en el caso de SPT6 y CHD1, las depleciones de ASF1A, HIRA y SPT16 también producen una elevada mortalidad celular, sugiriendo un papel importante de dichos factores dentro de la célula.

En relación a la proteína SPT6 y para comprender mejor su papel en el estado latente del HIV, decidimos estudiar en más detalle el efecto de la depleción de SPT6 en el promotor viral latente debido a que el efecto de la inhibición de este factor era muy claro en nuestras células y su mutante en levadura estaba siendo ampliamente estudiado. Primero se cuantificaron los transcritos virales en sus diferentes regiones del genoma (inmediatamente tras el +1, en las secuencias de Tat, GFP y al final de la transcripción). La cantidad de transcrito al principio de la transcripción aumentaba tras la deleción de SPT6 tanto en los clones 27 como A2 y disminuía en regiones corriente abajo, pero siempre era mayor que en el shRNA Control. Parece ser que tras inhibir SPT6 se mejora

la iniciación de la transcripción, aunque sigue habiendo un gran bloqueo en el proceso de elongación.

SPT6 había sido descrito como un factor encargado del reensamblaje de la cromatina tras el paso de la polimerasa gracias a su función chaperona, interaccionando preferencialmente con la histona H3. Así pues nos planteamos si era una proteína cuya depleción afectaba a nivel global en la transcripción o si por el contrario afectaba solo a un pequeño grupo de genes. Como control de carga de los experimentos con el shRNA de SPT6 se utilizó la Proteína Ribosomal 31 o RPL31, la cual se transcribe mediante la ARN polimerasa III, así como otros ARNs ribosomales y por tanto no se debería ver influenciada por la disminución de SPT6, proteína asociada a la ARN polimerasa II. Al comparar la expresión de varios genes tras la depleción de SPT6 en el clon 27 se observó que solo los genes que eran transcripcionalmente activos, tales como UBXD8 o CXCR4, disminuían su expresión en comparación con el shRNA Control. En cambio, los genes cuya expresión en células Jurkat era muy baja no sufrían ningún cambio tras la inhibición de SPT6. Este hecho hizo pensar que el efecto de la depleción de SPT6 afecta durante el proceso de transcripción, debido a su unión con la polimerasa, así que en los genes que no se están transcribiendo este factor de reensamblaje no tendría ningún efecto. La transcripción del HIV también depende de la ARN polimerasa II con lo que su transcripción también se debe ver afectada tras la depleción de SPT6, pero posiblemente el efecto desrepressor es más potente que la necesidad de SPT6 por la polimerasa II en la transcripción viral y por este motivo se observa reactivación del promotor viral latente tras la depleción de este factor.

En el caso de SPT16, HIRA y ASF1A, la inhibición de estas proteínas también disminuía la expresión del gen UBXD8, sugiriendo que estos factores tienen su efecto durante la transcripción y que su depleción afecta la correcta finalización del transcrito salvaje del gen.

El hecho de que el gen UBXD8 se pudiera activar con PMA y con el fin de disminuir las trazas de agentes mitogénicos presentes en el medio de cultivo que pudieran estar activando ligeramente el gen se arrestaron las células del clon 27 en un medio de cultivo sin suero. Se observó que se desreprimía de manera considerable el promotor viral en este clon pero también en otros clones latentes. La activación se producía en el promotor localizado en el 5'LTR pero no en el 3'LTR. Al mirar la expresión del gen

UBXD8 se observó que disminuía en las células del clon 27 arrestadas en comparación con las que estaban creciendo en medio con suero, pero en otros clones la expresión del gen no variaba. Todos estos datos nos mostraban que al arrestar los clones latentes se desreprimía el promotor viral por un mecanismo que no conocemos, pero el hecho de activar el promotor del HIV en el clon 27 afectaba negativamente la expresión del gen endógeno UBXD8. Anteriormente se había observado que la expresión del promotor viral mediante un agente reactivador del HIV como es el caso del TNF era capaz de disminuir la expresión del gen endógeno en el clon 27, pero no en otro clon latente. Este hecho hacía pensar en un efecto de interferencia de la expresión del HIV sobre la expresión del gen huésped. Aun así, nos faltaría demostrar si un aumento de la expresión de UBXD8 sería capaz de promover una mayor represión del promotor viral o bien si la disminución de la expresión de este gen endógeno promovería un aumento de la reactivación viral debida a una reducción de la interferencia transcripcional sobre el HIV.

La disminución de la expresión del gen UBXD8, observada o bien mediante el arresto de las células y la consecuente desrepresión del promotor HIV, o tras la reactivación viral mediante el tratamiento con TNF, era similar a la disminución que habíamos visto tras la expresión del shRNA de SPT6 en el clon 27. En dicho clon, la depleción de este factor aumentaba la expresión del promotor viral y disminuía la expresión del gen UBXD8. En experimentos realizados con levaduras se había descrito previamente este mismo efecto sobre los transcritos crípticos, los cuales se activaban en mutantes de SPT6 (entre otros factores de ensamblaje), disminuyendo la expresión del transcrito salvaje (Kaplan et al. 2003).

El hecho de haber visto una disminución de la expresión del gen endógeno UBXD8 tras la depleción de SPT6 nos hizo pensar en que quizá la reactivación del promotor viral latente era el efecto de una menor interferencia transcripcional del gen huésped sobre el promotor viral integrado, en vez de el efecto de SPT6 en el cierre de la cromatina como proteína relacionada con el reensamblaje de los nucleosomas. Para discernir entre ambas hipótesis, se siguió la expresión del virus del HIV y la expresión del gen UBXD8 varios días tras la infección con el shRNA de SPT6. Los resultados mostraron que tras la depleción de SPT6 se empezaba a expresar primero el promotor viral y después se veía una disminución del gen UBXD8, la cual cosa indicaba que el inicio de la expresión viral (al menos, inicialmente) es independiente de la reducción de

la expresión del gen huésped. Una posible interpretación de este resultado podría ser que el shRNA de SPT6 estaba afectando la integridad de la cromatina debido a que no se podían repositionar correctamente los nucleosomas tras el paso de la polimerasa, la cual cosa permitía la expresión del promotor hasta entonces latente. Posiblemente, la disminución de la expresión del gen endógeno es debida al efecto global de la depleción de SPT6 sobre los genes activos sumada al efecto de la expresión del HIV interfiriendo la expresión del gen huésped, tal y como habíamos visto en los experimentos de tratamiento del clon 27 con TNF.

A continuación nos propusimos analizar la organización de la cromatina en el promotor viral y ver cuál era el efecto tras la depleción de SPT6. Para ello se hicieron experimentos con la enzima nucleasa micrococcal o MNasa, la cual es capaz de cortar en las regiones espaciadoras entre nucleosomas, pero no dentro de los mismos. Los mononucleosomas obtenidos tras la digestión con esta enzima se utilizan en una PCR a tiempo real utilizando pares de oligonucleótidos que dan como resultado un amplicón pequeño y que cubren toda la región de los Nuc-0, Nuc-1, Nuc-2 y las regiones espaciadoras entre ellos. Utilizando este método pudimos observar primeramente que los nucleosomas 0, 1 y 2 se encontraban desplazados en regiones localizadas corriente abajo de lo que históricamente se los había descrito por Verdin et al. (1993) en el HIV integrado en el clon 27. Otro hecho remarcable es que en la zona donde se encontraría el nucleosoma 1 se vio una amplia región de protección a la digestión de la MNasa, la cual sugería que o bien el nucleosoma 1 no está del todo bien posicionado sino que se va deslizando ligeramente alrededor de los nucleótidos 570-950, o bien hay dos nucleosomas muy cercanos el uno al otro. Ambas opciones no se corresponden con la localización de los nucleosomas descrita históricamente, en la cual los nucleosomas 0, 1 y 2 estaban bien posicionados en los nucleótidos 40-200, 452-596 y 720-860 respectivamente (Verdin et al. 1993) (Figura 7).

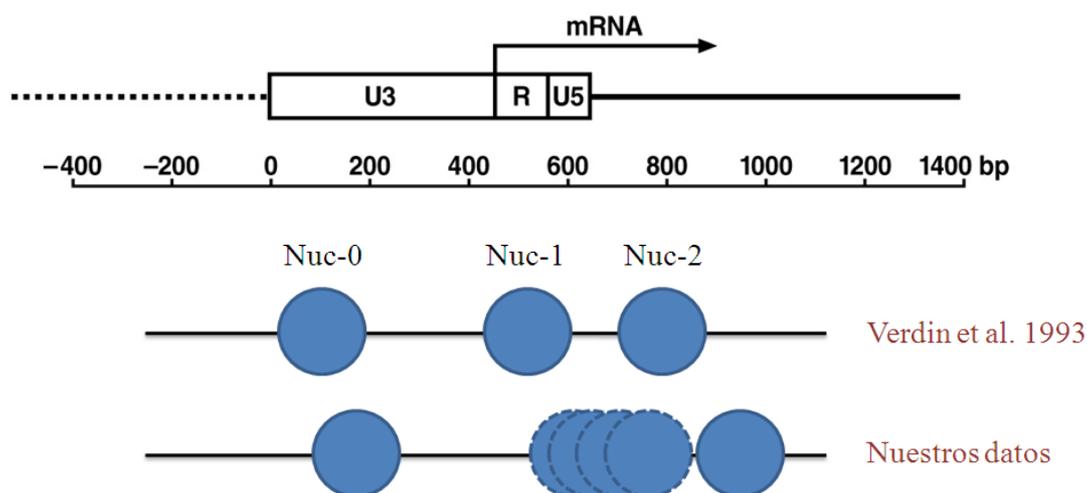


Figura 7. Representación esquemática del posicionamiento de los nucleosomas del HIV según los datos identificados por Verdin et al. (1993) o los datos de nuestros experimentos.

Otro hecho a comentar es que tras el tratamiento con PMA+TSA+TNF se vio que no solo la región cubierta por el nucleosoma 1 se volvía más sensible a MNasa sino también el nucleosoma 2, de manera contraria a lo que sucedía en trabajos anteriores en los cuales tras el tratamiento de las células con agentes capaces de reactivar el promotor viral, el único nucleosoma que se desestructuraba era el nucleosoma 1 (Verdin et al. 1993). Todas estas observaciones serán estudiadas en próximos experimentos para saber si esta diferente localización se observa en clones con un genoma viral de 9Kb o si por el contrario solo es característico de los clones con un mini-genoma de 4Kb.

Tras la depleción de SPT6 pudimos observar que disminuía el espaciamiento entre los nucleosomas y la cromatina, a nivel global, era más sensible al corte con la MNasa posiblemente por estar más abierta y accesible. Esta sensibilidad a la MNasa podría estar causada por una pérdida de los nucleosomas o bien por una alteración en la estructura de la cromatina, pero en ambos casos, esta sensibilidad es a nivel global en todo el genoma. Esta hipersensibilidad a la MNasa fue observada también por Kaplan et al. (2003) en ensayos con mutantes de SPT6 en levadura, en los cuales se concluyó que los niveles de la histona H4 se veían significativamente reducidos en un mutante de SPT6, y que este hecho podría estar influenciando la compactación de la cromatina.

Al cuantificar los niveles de sensibilidad a la MNasa mediante PCR a tiempo real en células expresando el shRNA de SPT6 se vio que en las regiones de los nucleosomas 1 y 2 la sensibilidad era mayor debido a que la estructura de la cromatina había sido

alterada. Esta sensibilidad a MNasa tras la depleción de SPT6 no era tan alta como la que se observaba en las células tratadas con PMA+TSA+TNF, la cual cosa explicaría los diferentes niveles de desrepresión del promotor del HIV en ambos casos. Al analizar la sensibilidad a la digestión con MNasa de las regiones del gen UBXD8 localizadas alrededor de la integración del promotor del HIV se vio un mayor grado de digestión en las células expresando el shRNA de SPT6 comparando con el control. Este dato mostraba que tras la depleción de SPT6 el gen UBXD8 alrededor del HIV sufría una apertura de la cromatina. Al faltar un factor clave para el reensamblaje de los nucleosomas, tras la transcripción la cromatina estaría más abierta y accesible debido a una pérdida de los nucleosomas presentes.

En resumen, en las células salvajes se están transcribiendo el gen UBXD8 y el mini-genoma del HIV integrado dentro de este gen pero en la mayoría de los casos, mediante el proceso de *splicing* el intrón donde está integrado el promotor viral se pierde. En el momento en que se depleciona la proteína SPT6, hay una alteración en el reensamblaje de los nucleosomas tras el tránsito de la ARN polimerasa II por el gen, la cual cosa produce una activación del promotor viral. Esta desrepresión se debe a la reducción de la interferencia que la transcripción del gen producía sobre el HIV. Este promotor se encontraba integrado latentemente y silenciado debido al efecto de los factores de reensamblaje encargados del cierre la cromatina, de igual manera que están reprimidos los promotores crípticos tales como PHO8 en levadura. Se observó una reducción en la expresión del gen endógeno UBXD8 tras la depleción de SPT6 posiblemente debida al efecto global de disminución de la expresión génica y a la interferencia transcripcional del HIV activado sobre el gen. Este hecho también estaría favoreciendo la transcripción del HIV, al disminuir la interferencia transcripcional que se producía desde el gen. De esta manera, la desrepresión del promotor viral se debería a un doble efecto, primero por la disminución del reensamblaje de la cromatina y después por la disminución de la interferencia transcripcional al disminuir la expresión del gen endógeno.

3.2. BRG1

Esta proteína es uno de los dos centros catalíticos con actividad ATPasa que pueden estar presentes en el complejo SWI/SNF, cuya función es la apertura y relajación de la cromatina. Su función en relación al HIV ha sido descrita como activadora del promotor

viral latente tras su reclutamiento al promotor mediado por la proteína Tat, reclutamiento que se produce juntamente con INI1 (Mahmoudi et al. 2006).

Nuestros datos mostraron una clara desrepresión del promotor tras la depleción de la proteína BRG1 en diferentes clones latentes. Este hecho mostraba un papel como represor en el promotor viral, quizá mediado por el reclutamiento de corepresores que silencien el HIV, tales como histonas deacetilasas. Más estudios son necesarios para conocer cuál es el mecanismo de BRG1 en el silenciamiento del HIV.

Aunque la función de BRG1 ha sido altamente asociada con la activación transcripcional, varios estudios relacionan esta proteína con el silenciamiento génico debido a su interacción con corepresores celulares. Se ha caracterizado su unión con el complejo mSin3A/HDAC, que está implicado en la represión transcripcional de varios genes (Sif et al. 2001). También se describió la asociación de Brg1 con el complejo corepresor NCoR, el cual contiene actividad deacetilasa e incluye la proteína TIF1, que interacciona con HP1 (Underhill et al. 2000). Estudios llevados a cabo en células latentes expresando shRNAs contra algunos componentes de SWI/SNF mostraron desrepresión del promotor viral. Análisis en detalle mostraron la existencia de dos complejos SWI/SNF diferentes, uno presente en el promotor latente y el otro tras la activación del promotor viral (Eric Verdin, comunicación personal).

3.3. TFIIS

TFIIS es un factor clave en la salida de la polimerasa del proceso llamado arresto. Durante el arresto de la polimerasa, se produce una pausa en la transcripción de un gen debido a que la polimerasa no está bien posicionada. En este momento, TFIIS se une a la polimerasa y promueve el realineamiento de la molécula de ARNm que se estaba formando con el centro catalítico de la polimerasa, mediante el corte del transcrito (Fish et al. 2002, Conaway et al. 2003). En nuestros experimentos se observa una clara desrepresión del promotor viral latente tras la depleción de este factor. Probablemente, el hecho que este factor esté relacionado con la salida del arresto de la polimerasa y la consecuente correcta transcripción del transcrito favorece la interferencia transcripcional del gen endógeno sobre el HIV. En el momento en que se depleciona este factor, si la polimerasa que está transcribiendo el gen endógeno sufre un fenómeno

de arresto no es capaz de salir de este arresto por falta de la proteína TFIIS. Este hecho promueve una disminución de la interferencia transcripcional del gen sobre el HIV y facilita la activación del promotor viral latente.

3.4. YY1

Tras la depleción de la proteína Ying Yang 1 o YY1 en la población heterogénea de células latentes se observó desrepresión del promotor HIV, la cual cosa indicaba que YY1 tenía un papel represor en el promotor viral. El mecanismo que puede relacionar la proteína YY1 con la represión del promotor es su función reclutadora de deacetilasas de histonas. YY1 se reclutaría al promotor viral mediante dos proteínas LSF (Coull et al. 2000) e interaccionaría con HDAC1. Esta histona deacetilasa promovería un ambiente represivo en el promotor viral tras la deacetilación de las histonas y favorecería el establecimiento de la latencia viral.

Aun así, los resultados de desrepresión del promotor viral latente tras la expresión del shRNA de YY1 en la población heterogénea latente no era muy elevados, mostrándose un porcentaje de células GFP-positivas de entre el 4 y 5%. Este dato puede indicar que YY1 está implicado sólo en una minoría de integraciones latentes o bien que la depleción de YY1 tras la infección del shRNA no fue suficiente para obtener unos valores altos de reactivación viral.

3.5. HP1 β

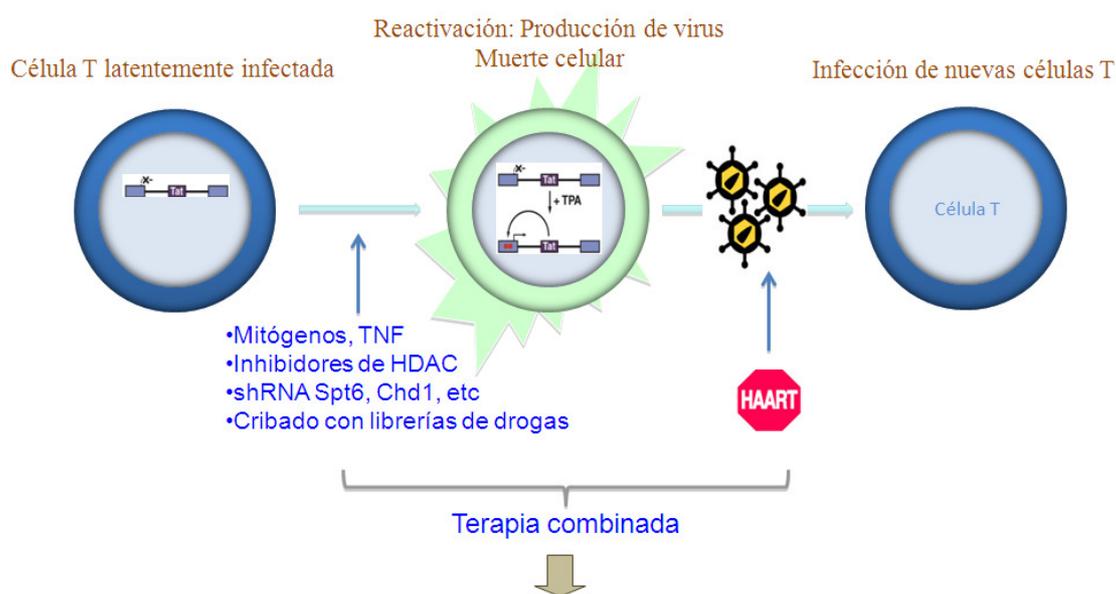
Ha sido descrito que en células de la microglia, el co-represor CTIP2 (*COUP-TF interacting proteína 2*) se asocia con la histona metiltransferasa Suv39H1, la cual aumenta localmente la metilación de la lisina 9 de la histona H3. Este hecho permite el reclutamiento de la proteína HP1 al promotor viral, promoviendo la formación local de heterocromatina y llevando al silenciamiento del HIV (Marban et al. 2007).

Se ha visto que las variantes de HP1 afectan de manera diferente la represión del promotor viral. En algunos estudios se ha mostrado que la variante relacionada con el silenciamiento del HIV mediante la formación de una estructura de la cromatina compacta es la HP1 γ (du Chene et al. 2007). En otros trabajos se vio que la variante que

se recluta al promotor latente es HP1 β en ausencia de estímulo y HP1 γ tras la activación mediante el tratamiento con PMA (Mateescu et. al 2008). En nuestros experimentos, hemos observado que la variante HP1 β , a diferencia de los trabajos anteriores, no está relacionada con la represión del promotor viral latente ya que utilizando un shRNA de esta proteína en varios clones latentes no se observa ningún tipo de reactivación.

4. Análisis de compuestos químicos que reactivan el virus HIV

El objetivo final terapéutico de nuestro trabajo es la identificación de dianas implicadas en el establecimiento o mantenimiento del estado latente del HIV que puedan ser utilizadas para conseguir nuevos fármacos reactivadores del HIV. Estos fármacos capaces de desreprimir el promotor viral latente se utilizarían en combinación con la terapia antiretroviral utilizada hasta el momento con el fin de conseguir erradicar el virus de pacientes infectados y así poder reducir los años de tratamiento de la enfermedad (Figura 8). Se debe mantener en mente que teóricamente una única célula latentemente infectada puede reavivar la infección. No obstante, el hecho de disminuir el reservorio de células latentes puede favorecer la interrupción de la terapia durante un tiempo, representando un progreso importante en el tratamiento del HIV.



Aplicación: acelerar la limpieza de virus en pacientes infectados

Figura 8. Reactivación del HIV latente para su erradicación.

Muchos han sido los esfuerzos para encontrar una posible terapia para eliminar los virus infectados latentemente y poder combinarla con la terapia HAART actual. Algunos estudios se han centrado en poder activar el promotor latente mediante la adición de IL-2, IL-7 o anticuerpos para activar las células T. Otros trabajos han sugerido la adición exógenamente de Tat como posible acción para poder activar el promotor latente (Lin et al. 2003). Otros en cambio han utilizado inhibidores de histonas

deacetilasas, o activadores de la vía PKC (véase apartado 2.4 de la Introducción para más detalles).

En nuestros estudios hasta el momento se ha conseguido entender mejor cuales son los determinantes mecanísticos del establecimiento de la latencia. Se ha propuesto un modelo de represión de HIV integrado en unidades transcripcionales del genoma huésped donde intervienen factores de reensamblaje de la cromatina, que pueden ser inhibidos mediante la tecnología del RNA interferente. En nuestro siguiente paso colaboramos con el Dr. Eric Verdin (Gladstone Institute of Virology and Immunology-UCSF, San Francisco, EEUU) en un proyecto que consistía en analizar 8 compuestos que reactivan el promotor viral latente obtenidos en un cribado de 10.000 moléculas químicas. Según su estructura, se pudieron clasificar seis de las ocho estructuras en dos clases diferentes: clase 1 y clase 2. Un compuesto de cada clase se eligió para su estudio en más detalle: el compuesto número 4 de clase 1 y el compuesto número 1 de clase 2. Al probar los dos compuestos en varios clones latentes y en la población heterogénea latente se observó que ambos eran capaces de reactivar el promotor viral latente, aunque dicha reactivación se daba en concentraciones elevadas del orden de μM . El hecho que pudieran reactivar el HIV en clones cuya integración se había producido en diferentes lugares dentro del genoma huésped (regiones alfoideas, intrones de genes y regiones intergénicas) mostró que tenían un amplio espectro, no siendo selectivos de un ambiente cromatínico determinado.

Otra observación tras el tratamiento de las células fue la elevada toxicidad que tenían ambos compuestos en elevadas concentraciones, concentraciones a las cuales se veían los mayores efectos de desrepresión del promotor latente. Este hecho nos llevó a pensar si la toxicidad de los compuestos y la mortalidad celular estaban relacionadas con la reactivación del HIV. Para esclarecer este punto se trató un clon latente con varios compuestos que podían producir mayor o menor toxicidad celular. La camptotecina es un compuesto descrito como activador de la apoptosis celular, el cual utilizamos como control positivo de activación de la muerte celular programada y que por tanto era altamente tóxico para las células. Es capaz de unirse a la topoisomerasa I, previniendo el religado del ADN y causando daño en las hebras durante el ciclo de replicación (Hsiang et al. 1985). Los resultados mostraron que la camptotecina tenía una muy elevada toxicidad y desreprimía el promotor viral pero otros compuestos que eran capaces de causar tanta toxicidad como la camptotecina, no desreprimían el HIV. Se pudo observar

también que los compuestos 1 y 4 reactivaban el promotor latente mediante su diana de acción, pero no debido a la mortalidad celular ya que promovían una alta desrepresión del HIV, mayor que con otros compuestos testados pero con una mortalidad menor.

El resultado de desrepresión del promotor viral latente observado tras el tratamiento con camptotecina no dejó de ser sorprendente. En la literatura se había sido descrito que los inhibidores de la topoisomerasa I, tales como la camptotecina, promueven la activación de NFκB (Huang et al. 2000). Se había observado que la activación de la vía de NFκB mediante camptotecina disminuía drásticamente en células que expresaban un mutante de la topoisomerasa I (Huang et al. 2000). Entrando en detalle sobre el mecanismo de acción, tras la ruptura de la doble hebra de ADN producida por el tratamiento con camptotecina, se activaba la proteína ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) la cual era capaz de activar la quinasa IKK y degradar el represor IκB, promoviéndose así la activación de NFκB y la atenuación de la respuesta apoptótica (Wu et al. 2006). Así pues, el hecho de haber observado desrepresión del promotor del HIV tras la adición de camptotecina se podría estar debiendo a la activación de NFκB mediante la vía de ATM.

Una colaboración con el Dr. Jordi Mestres nos abrió las puertas para poder estudiar cuáles eran los mecanismos de acción por los cuales los compuestos 1 y 4 desreprimían el promotor viral latente, así como para buscar nuevos compuestos parecidos a los originales pero con menor toxicidad y con igual o mayor actividad a menores concentraciones.

Mediante el procedimiento de *target fishing* se comparó la estructura química de los compuestos originales con una base de datos de moléculas cuya diana de acción es conocida. El resultado mostró que los compuestos de clase 1 tenían similitudes estructurales con inhibidores y activadores de varias proteínas, pero tras probar drogas comerciales con iguales dianas se pudo observar que ninguna de los compuestos probados podía desreprimir el promotor viral. Este hecho mostraba que el análisis mediante *target fishing* no proporcionó las dianas de acción correctas de los compuestos originales, posiblemente debido al bajo número de dianas presentes en la base de datos utilizada, la cual cosa obligó a utilizar unos parámetros poco restrictivos, aumentando los falsos positivos.

A continuación se utilizó un cribado virtual en el cual se comparó la estructura de los ocho compuestos originales con una base de datos de 7.000.000 de estructuras químicas. Al final del proceso se obtuvieron un total de 43 compuestos que eran estructuralmente parecidos a los originales, los cuales fueron testados en las células latentes. Como resultado se obtuvo un compuesto, el cual se llamó A36, que era capaz de desreprimir eficientemente el promotor del HIV latente. Al testar el compuesto A36 en diferentes clones latentes, los cuales tenían el HIV (LTR-Tat-GFP) integrado en diversos lugares del genoma, se vio que en todos los casos era capaz de desreprimir el promotor latente, la cual cosa mostraba que no era específico de un ambiente cromatínico determinado sino que su efecto era a nivel global. Una característica muy interesante era que, a diferencia de la clase de compuestos de los cuales derivaba (clase 1), el A36 no producía toxicidad en las células. Este hecho introducía una ventaja a este compuesto frente a los compuestos originales y lo hacía un buen candidato a analizar. La concentración a la que se empezaba a ver efecto del A36 seguía siendo elevado, del orden de μM .

Al estudiar en más detalle el compuesto A36 vimos que su IC_{50} , es decir, la concentración a la que se observaba la mitad de la desrepresión máxima del promotor latente, era de $80\mu\text{M}$. Tras el tratamiento con A36 se mostró un aumento de la cantidad de transcritos producidos a partir del promotor presente en el 5'LTR. A nivel de ciclo celular, el compuesto A36 promovía un arresto de las células en G1, observándose una disminución de las células en las fases S y G2/M. Este patrón de arresto del ciclo celular era muy similar al observado tras el tratamiento de las células con PMA, el cual había sido ampliamente descrito anteriormente y relacionado con procesos de apoptosis (Feuerstein et al. 1984, Zhao et al. 2000), aunque A36 no produce la mortalidad celular observada con PMA. Este hecho proporciona a A36 una ventaja frente al agente mitogénico y le hace un buen compuesto para seguir estudiando y derivando a otras moléculas químicas con las que se pudiera disminuir el valor de IC_{50} , manteniendo unos porcentajes de mortalidad bajos o nulos.

Uno de los mecanismos por los que se produce una parada del ciclo celular en G1 es por daño en el ADN. La activación de la ruta ATM/ATR tras el daño lleva a la activación de p53, que a su vez activa p21. Esta proteína es la mediadora del arresto en G1, debido a su función inhibitoria del complejo CiclinaE/Cdk2, responsables de la transición de la fase G1 a la fase S. La activación de CiclinaE/Cdk2 también puede

producirse de manera independiente de p53 tras el daño del ADN, mediante la degradación de la fosfatasa Cdc25, la cual es la responsable en un estado basal de mantener en forma inactiva el complejo ciclina/cdk. El daño del ADN se puede producir de varias maneras, entre las que se encuentra el daño mediado por la exposición a ultravioleta (UV), a la radiación ionizante (rayos X, rayos gamma,...), a radicales libres o a ciertos compuestos químicos.

La exposición a la luz ultravioleta había sido descrita como un inductor de la transcripción y la expresión del HIV latente (Stanley et al. 1989, Vicenzi et al. 1994). Se había visto que la activación de la vía de reparación del daño en el ADN tras la irradiación con UV promovía la activación del factor de transcripción NFκB (Vicenzi et al. 1994). La producción de citoquinas mediada por la exposición a la luz ultravioleta también ha sido descrita como un activador del HIV (Kumar et al. 1996). Así pues, una posible hipótesis para explicar el porqué A36 es capaz de desreprimir el promotor viral causando una parada de ciclo en G1 podría ser que dicha parada fuera promovida por algún tipo de daño en el ADN, que fuera capaz de activar o bien la ruta de reparación mediada por ATM/ATR o bien la producción de citoquinas que pudieran estar reactivando el HIV latente. Más experimentos son necesarios para ver si estas vías están implicadas en la desrepresión del promotor viral latente tras el tratamiento con el compuesto A36.

Posteriormente se analizaron combinaciones del compuesto A36 con otros activadores conocidos del promotor del HIV, tales como PMA, TSA, TNF, HMBA y 5-aza con el fin de buscar posibles sinergias entre ellos. Los resultados entre un clon con el minigenoma de 4Kb integrado y un clon con el genoma de 9Kb resultaron ser un poco diferentes, sobre todo a nivel del compuesto 5-aza, capaz de promover la desmetilación del ADN. Anteriormente se había descrito que varios clones latentes con el genoma de 9Kb integrado estaban metilados en las dos islas CpG presentes una de ellas en el 5'LTR y la otra inmediatamente después del 5'LTR. La utilización del compuesto 5-aza en combinación con TNF era necesario para poder reactivar el promotor latente de estos clones (Kauder et al. 2009). Concretamente, se había descrito para los clones 6.3, 8.4, 9.2 y 15.4 (todos ellos con un genoma viral de 9Kb de longitud) pero no ocurría para el clon A2, en el cual el tratamiento con 5-aza no tenía ninguna repercusión sobre el HIV. En nuestros estudios, al tratar el clon 27 con 5-aza o con combinaciones de este producto con otros reactivadores no veíamos ningún efecto de 5-

aza sobre el promotor viral, hecho que reafirmaba otros trabajos que afirmaban que el HIV en clones con este minigenoma no se veía reprimido por metilación (Jordan et al. 2003, Pion et al. 2003). En cambio, el HIV del clon 6.3 necesita ser desmetilado para poder obtener altos niveles de desrepresión. Una posibilidad que podría explicar este hecho sería que la eliminación de los genes del virus y el reposicionamiento de Tat fuera de su contexto genómico normal haya alterado el control de la transcripción, haciendo que el HIV de los clones con el minigenoma no resulte metilado para ser silenciados. Otra posibilidad es que la metilación del HIV que lleva a un estado reprimido del promotor sea específica de cada clon, no del genoma integrado. Esta posibilidad se vería apoyada por el hecho que el HIV del clon 11.1, el cual contiene integrado un genoma viral de 9Kb de longitud, no está metilado y por lo tanto la represión en dicho clon se debe a otro mecanismo represivo diferente a la metilación (Eric Verdin, comunicación personal).

En los experimentos combinando compuestos con A36 pudimos ver que en el clon 27, el compuesto con mayor sinergismo con A36 era el PMA y los valores mayores de sinergia se obtenían combinando estos dos compuestos con TSA o TNF. En cambio, el A36 no era capaz de desreprimir por sí solo el clon 6.3 (a diferencia del clon 27, en el cual sí que se obtenían altos porcentajes de desrepresión sólo con A36), sino que era necesario combinarlo con TNF+5-aza, PMA+5-aza o PMA, TNF y A36 para ver efectos sinérgicos.

Al utilizar otros clones latentes con el genoma del HIV de 9Kb se vieron diferentes efectos entre clones. En uno de los clones, A36 era capaz de reactivar el promotor viral por sí solo. Otro de ellos no sufría ningún efecto tras tratar con A36 ni con ninguna combinación de compuestos. En otros dos clones latentes no se veía ningún efecto simplemente con A36 pero sinergizaban de manera importante tras su combinación con TNF. Estudios más en detalle serían necesarios para comprender estas diferencias entre clones.

Con el fin de conocer si A36 estaba actuando sobre la misma vía de señalización que los compuestos TNF, PMA, HMBA o TSA se utilizaron diferentes concentraciones de estos compuestos. De esta manera podíamos ver los efectos de A36 al llegar a la saturación de la vía de señalización que utilizan estas drogas para activar el promotor viral latente. Se observó que cuando el efecto de TNF y de PMA llegaba a la saturación,

A36 era capaz de estimular la reactivación del promotor viral latente de manera sinérgica, la cual cosa sugería que el A36 no actúa en la misma vía de señalización que ninguno de los dos compuestos. En el caso de HMBA o TSA y utilizando concentraciones con baja toxicidad de ambos compuestos, A36 era capaz de estimular la desrepresión del promotor latente de manera sinérgica, sugiriendo de nuevo que A36 no actúa por las mismas rutas de activación que desreprimen el HIV tras el tratamiento con HMBA o TSA. En estos casos, no se podían hacer experimentos de saturación con elevadas concentraciones de HMBA o TSA debido a su alta toxicidad celular. En resumen, parece que A36 no actúa por las mismas vías que TNF, PMA, HMBA o TSA, así que debemos buscar otras rutas de activación no conocidas hasta el momento.

Al utilizar un modelo de células 293T transfectadas transientemente con un vector expresando el reportero luciferasa bajo el control del promotor del HIV (HIV-luc) se observó que el compuesto A36 era capaz de activar el promotor hasta unos niveles comparables a TNF, y más que con el tratamiento con PMA o TSA. Este hecho mostraba que A36 no solo es capaz de reactivar el promotor latente sino también de activar un vector expresando el promotor viral.

Se utilizaron una serie de plásmidos con un reportero conteniendo los lugares de unión de NFκB, AP1, SP1 y NFAT en células 293T. De esta manera podríamos conocer si A36 era capaz de activar la vía de alguno de estos factores de transcripción. En un estudio previo con estos vectores reporteros Jurkat se vio que el promotor reportero se podía reactivar mediante la inducción de NFκB tras el tratamiento con TNF, PMA o PMA+Ionomicina, la inducción de AP1 mediante PMA o PMA+Ionomicina y la inducción de NFAT tras el tratamiento con PMA+Ionomicina (Williams et al. 2004). En nuestros experimentos llevados a cabo en 293T transfectadas con los plásmidos reporteros, vimos que A36 podría activar por sí solo los plásmidos reporteros NFAT y AP1, sugiriendo que se deben activar sus vías de señalización para activar el promotor del HIV. Por otro lado, A36 no puede activar la vía de NFκB por sí solo pero sí que potencia la activación de NFκB por TNF. Parece que A36 necesitaría de la activación de la ruta de TRAF2 mediante TNF como paso previo a su sinergismo con TNF para reclutar NFκB. Los resultados obtenidos por Williams et al. (2004) con el resto de compuestos no coincidían exactamente con nuestros experimentos. En las 293T transfectadas, el tratamiento con PMA+Ionomicina no era capaz de activar los plásmidos reporteros NFκB y AP1, pero en cambio, sí que activaba el reportero SP1.

Estos datos sugerían diferencias en las respuestas a los diferentes compuestos dependiendo de las células. Así pues, los siguientes experimentos a diseñar serían con clones latentes Jurkat transfectados con los plásmidos reporteros.

Con el fin de conocer la vía de señalización por la cual el compuesto A36 está desreprimiendo el promotor del HIV se utilizaron 3 inhibidores para las vías de la quinasa PKC, la MAP quinasa ERK y la quinasa PI3K. Ninguno de los 3 inhibidores fue capaz de afectar la desrepresión del promotor viral latente mediada por el tratamiento con A36 de las células, sugiriendo que la vía de señalización activada por A36 es diferente a estas tres. El inhibidor de la vía de PKC es capaz de inhibir la reactivación del promotor mediada por PMA ya que este agente mitogénico ha sido descrito como un activador de la quinasa PKC (Verin et al. 2000). En cambio el TNF activa el promotor viral por la vía de TRADD-TRAF2, que acaba activando NFκB (Hsu et al. 1996, Takeuchi et al. 1996), así que la desrepresión mediada por TNF no sufría ningún cambio tras añadir el inhibidor de PKC. Tras el tratamiento con el inhibidor de la quinasa ERK pudimos ver una disminución en la reactivación del HIV tras el tratamiento con PMA, hecho que ya había sido descrito previamente y que es debido a la activación de la ruta de la MAP quinasa ERK por PMA (Yang et al. 1999).

En un artículo reciente se describió un nuevo compuesto llamado 5-hidroxinaptalen-1,4-diona (5HN) el cual era capaz de reactivar el promotor del HIV latente en un modelo de linfocitos T CD4+ humanos latentes provenientes de sangre (Yang et al. 2009). Este compuesto es capaz de producir radicales libres (ROS), los cuales han sido descritos como activadores indirectos de la vía de NFκB, y por tanto, reactivadores del promotor viral (Gloire et al. 2006). Yang et al. (2009) demostraron que la reactivación del promotor latente no se debía a la activación de PKC ni NFAT, la cual cosa mostraba que 5HN no era capaz de promover la activación de las células T. Este compuesto 5HN tiene similitudes con el A36 debido a que ambos poseen un anillo quinoleína con varios radicales pero 5HN puede sufrir procesos de reducción en los que se producen aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que inducen estrés oxidativo. La estructura química de A36 no puede sufrir procesos de reducción, con lo que no se producen radicales libres y producción de ROS. Este hecho nos permitió descartar la formación de ROS como la vía utilizada por A36 para desreprimir el promotor viral latente.

Por último se utilizaron compuestos derivados de las estructuras químicas de clase 1, los cuales eran parecidos al A36 pero con radicales diferentes o sin ningún radical (Y1 y Y2 respectivamente) y compuestos obtenidos de dos cribados virtuales diferentes (Z1-Z15 y B1-B43). En todos los casos se buscaba un compuesto con desrepresión igual o mayor al A36 pero que actuara a menor concentración para conseguir dicho efecto. Por otra parte, debía continuar no mostrando toxicidad celular ya que disminuiría las posibilidades de éxito como terapia contra la latencia del virus del HIV. El estudio de estos compuestos también nos debía servir para conocer qué partes de la estructura o qué radicales son importantes para conseguir un efecto desrepressor del promotor viral. Tras el tratamiento de varios clones con los compuestos Y1 y Y2 se observó que en el caso del compuesto Y1 se obtenía desrepresión del promotor pero no se llegaba hasta los niveles obtenidos con A36. Aun así, este compuesto no era tóxico para las células. En cambio, la desrepresión con Y2 era muy pequeña y el compuesto producía toxicidad. Así pues, ninguno de los dos compuestos parecía mejorar la estructura del A36.

Por otro lado, el análisis de los compuestos Z1-Z15 y B1-B43 mostró dos estructuras que podían desreprimir el promotor viral (Z10 y B37) aunque ambos presentaban ciertos niveles de toxicidad. La desrepresión se volvía a observar a concentraciones elevadas, del orden de μM , y por lo tanto no se había encontrado ningún compuesto cuya IC_{50} fuera menor a la observada para A36. De nuevo, estas moléculas mostraron complicaciones a la hora de ser buenos candidatos para seguir optimizando una molécula que pudiera ser utilizada como terapia.

La búsqueda de moléculas capaces de desreprimir el promotor viral latente como terapia combinada a los actuales antirretrovirales es un ejemplo práctico de lo útil que puede resultar la utilización del modelo de latencia viral en células Jurkat utilizado en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. La producción de un modelo de latencia del virus del HIV en la línea celular Jurkat de linfocitos CD4⁺ ha resultado útil para estudiar los mecanismos que llevan a un estado latente del promotor viral. Tras la infección de dichas células con un minigenoma HIV-GFP, la latencia se establece con una frecuencia muy baja.
2. El lugar de integración del provirus HIV determina el estado transcripcional del promotor viral. La latencia está causada por la integración del promotor del HIV en heterocromatina o en desiertos génicos pero también en intrones de genes transcripcionalmente activos.
3. Hemos observado una amplia variedad de transcritos producto de eventos de *splicing* inesperados cuando el HIV se integra en intrones. Se producen transcritos quimera que empiezan en el gen huésped y cubren el 5'LTR o transcritos empezando en el 5'LTR y continuando en los exones corriente abajo del gen, entre otros.
4. Sugerimos que la integración del HIV en intrones de genes activos puede llevar a un estado de latencia debido a la existencia de interferencia transcripcional desde el gen activo sobre el promotor viral.
5. La interferencia transcripcional es bidireccional. Cuando se desreprime el promotor viral, por ausencia de suero o por adición de TNF, disminuye la expresión del gen donde el provirus se halla integrado.
6. SPT6 y CHD1 son dos proteínas relacionadas con el reensamblaje co-transcripcional de la cromatina que están involucradas en la represión del HIV ya que su depleción produce reactivación del promotor del HIV latentemente infectado. Estos dos factores viajarían a través de un gen con la ARN polimerasa II y al cerrar la cromatina tras la transcripción reprimirían promotores crípticos, tales como el HIV integrado en genes activos, causando la interferencia transcripcional.
7. La inhibición de SPT6 promueve un ambiente cromatínico más relajado sensible a mononucleasa en el promotor del HIV y en el gen endógeno huésped, permitiendo probablemente la entrada de factores de transcripción.

8. Tras la depleción de SPT6 se observa también una disminución de la expresión de genes que son transcripcionalmente activos, mientras que los genes poco expresados en células Jurkat no sufren ningún efecto.
9. La desrepresión del promotor HIV mediada por la depleción de SPT6 posiblemente se debe a un doble efecto, primero por la disminución del reensamblaje de la cromatina y segundo por la disminución de la interferencia transcripcional al disminuir la expresión del gen endógeno.
10. Las proteínas ASF1A, HIRA, SUPT16H, BRG1, TFIIS y YY1, factores todos ellos relacionados con cromatina, también están implicadas en la represión del promotor viral en el proceso de la latencia. En cambio, HP1 β no parece tener ningún papel fundamental en la represión.
11. Se obtuvieron 8 compuestos capaces de reactivar el promotor viral latente de una librería de 10.000 compuestos, los cuales se podían dividir en dos familias químicas. Tras hacer un *target fishing* con los compuestos se propusieron varias dianas de acción hipotéticas de los 8 compuestos, pero tras probar inhibidores o activadores de dichas dianas no se consiguió desreprimir el promotor del HIV.
12. Tras hacer un cribado virtual de los 8 compuestos originales, se obtuvo una nueva molécula (A36) que era capaz de desreprimir el promotor del HIV sin la toxicidad de los compuestos originales. Este compuesto sinergiza con TNF, PMA, TSA y HMBA en la activación del promotor HIV latente. El mecanismo de acción de A36 no parece implicar las vías PKC, ERK ni PI3K. En experimentos de transfección, A36 activa promotores reportero NFAT y AP1 y sinergiza con TNF en la activación de NF κ B.

MATERIAL y MÉTODOS

Material

1. Reactivos

Reactivo	Concentración de uso	Casa comercial
PMA	10nM	Sigma
TSA	400nM	Sigma
TNF α	10ng/ml	Sigma
HMBA	10mM	Sigma
5-aza-2'deoxicitidina	5 μ M	Sigma
Ionicina	1 μ g/ml	Sigma
Puomicina	2mg/ml	Sigma
Camptotecina	10 μ M, 100 μ M	Acros Organics
Metil metano sulfato (MMS)	1mM	Sigma
Hidroxiurea (HU)	1mM	Sigma
Colcemida	20ng/ml	Roche
Higromicina B	1.6mg/ml	BD Biosciences
MNasa	0.4U	Sigma
PD 98059	25 μ M	Calbiochem
Wortmanina	0.1 μ M	Sigma
GF109203X	1 μ M, 2 μ M, 3 μ M	Sigma
PJ34	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma
Benzamida	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma
Minociclina	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma
BRL50481	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma
Acetazolamida	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma
Damnacantal	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Calbiochem
DFB	10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M	Sigma

2. Plásmidos

- **pEV731** Plásmido lentiviral que expresa la construcción LTR-Tat-Ires-GFP, amablemente cedido por el Dr. Eric Verdin (Gladstone Institutes, San Francisco, EEUU).
- **HIV-R7/E-/GFP** Plásmido que expresa el genoma entero del virus de 9Kb de longitud pero tiene la secuencia de GFP en lugar de *Nef* y se ha introducido una mutación en *env*. Este plásmido fue construido por el Dr. Albert Jordan.

- **LTR-luc** Plásmido que expresa el reportero luciferasa bajo la expresión del promotor del HIV, cedido por el Dr. Eric Verdin
- **NFκB-luc, AP1-luc, SP1-luc, NFAT-luc** Los plásmidos expresando los lugares de unión de NFκB, NFAT, AP1 y SP1 asociados al reportero luciferasa fueron cedidos por el Dr. Warner Greene (Gladstone Institute of Virology and Immunology, San Francisco, EEUU).
- **pVSVG** Plásmido que codifica para proteínas de la envuelta viral, obtenido de Clontech.
- **pCMVΔR8.91** Plásmido que codifica los genes virales *gag* y *pol*, ambos necesarios para la producción de partículas víricas en el caso de utilizar vectores lentivirales. Fue amablemente cedido por el Dr. Didier Trono.

3. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos para secuenciar los lugares de integración del HIV

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
α1	AGACAGAAGCATTCTSAGAA
α2	ATCACAAAGNAGTTTCTSAGAAT
α3	TTTSATWGAGCAGNTTKGAAAC
α4	AAAGAGTGTTTCMAANCTGCTCW
pEV1731 (A)	AGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGC
pEV1732 (B)	CACACACAAGGCTACTTCCCT
pEV1733 (C)	GCCACTCCCCIGTCCCGCCC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
GSP1	AAACCTCCACTCTAACACTTCTCTCTC
GSP2	CTCTTCTACCTTATCTGGCTCAACTGG
UBXD8_P1	CGAGACCCCATCTCTACAAA
UBXD8_P2	AGTCCTGCTCTGTCATCCAG
UTX_P1	TTTCATGGCTCCTTCACTTT
UTX_P2	GTTTGCTGCACCTATCAACC
P3	CGAGCTTGCTACAAGGGACT
P4	GAGCCCTCAGATCCTGCATA

Oligonucleótidos para determinar el tipo de transcritos producidos en la secuencia del HIV y alrededores

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
1	CTTCGTTTTATACGGCCTGA
2	TTGCGACAAAACATCAGA
3	AACAGCAAAAGTTGGCAGAG
4	GAAACTTTTCTGGGCTTTCC
5	AAATTAGCTAGGCATGGTGGTA
6	GTACTCCGGATGCAGCTCTC
7	CGAGCTTGCTACAAGGGACT
8	AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT
9	TCGCTTTCAGGTCCCTGTTTCG
10	TTCAGCTATTCTAAATGCCACA
11	TTGGCGTACTCACCAGTCGC
12	GTACTCCGGATGCAGCTCTC
13	GAGCCCTCAGATCCTGCATA
14	CCTTCTTCTTCGATTCTTCG
15	CCACCTTCTTCTTCGATTCTCCT
16	TCTGAAGGGATGGTTGTAGC
18	CACACAAGGCTACTTCCCTGA
19	AGCACCATCCAAAGGTCAGT
A	CACTTTGTCCAATGCTGAAA
D	GGAAGGCGCCAGAATTAGGAT
G	GTGGGGCTTAAAACCTAGATG
H	ACCACTGCCTAAAATGAACG

Oligonucleótidos para determinar la cantidad de transcritos producida en el HIV

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
Tat_f	CAAAAGCCTTAGGCATCTCCT
Tat_r	CCACCTTCTTCTTCGATTCTCCT
GFP_f	GAAGCAGCACGACTTCTTCAA
GFP_r	GCTTGTCGGCCATGATATAGA
HIV_U3_f	ATCCACTGACCTTTGGATGG
HIV_U3_r	GTACTCCGGATGCAGCTCTC

Oligonucleótidos de genes específicos

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
CHES1_f	GGCTTATGGCTTTTGGAAACA
CHES1_r	ATCTGATGGTGCCAGGAAAG
CXCR4_f	TGGAGTGTGACAGCTTGGAG
CXCR4_r	GGTGGTCTATGTTGGCGTCT
PCAF_f	ACATCTGCCATTCCCAACTC
PCAF_r	TAGCCATTTGCAGGGTTCTT
11beta_HSD2_f	ACGCAGGCCACAATGAAGTAG
11beta_HSD2_r	GCAGCCAGGCTGGATGATG
Dicer_f	AATCTCAACCAGCCACTGCT
Dicer_r	TCTCCACAGTGATGCTGGAA
UBXD8_exón3_f	GCAAGAGGGCGTACCTAGTG
UBXD8_exón3_r	CTTGGTTGAGGTCTTGAGACAA
UBXD8_exón8_f	GCTGAAGGATCGAAGGATGA
UBXD8_exón8_r	TTCTAGGCGTTCTGACACCA
UBXD8_exón9_f	CAGACCCAAGTGCTGAGACA
UBXD8_exón9_r	TCTGCCAACTTTTGCTGTTG
UTX_exón1_f	GGCGATAAAGTTGGTGTGCT
UTX_exón1_r	GACACTCCGCAGGATTCAT
UTX_exón6_f	GGCAATTAAAGCATTTCAGGAG
UTX_exón6_r	TTTGAACATAAGCCCAAGTCG
GAPDH_f	GAGTCAACGGATTTTGGTCGT
GAPDH_r	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
RPL31_f	CGGCTGTCCAGAAAACGTA
RPL31_r	ACGTGTGTCACCCCTAGCTT

Oligonucleótidos para determinar la inhibición mediante shRNAs

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
SPT6_f	CTGATTGAATTTGCCAGGT
SPT6_r	GATCAAGGCCTGGCTGTAAG
CHD1_f	GATGAAGATTGGCAAATGTCTG
CHD1_r	ATTTTGAGGTTTCTGCTTTTG
ASF1A_f	ATGTGGGCTCTGCAGAAAGT
ASF1A_r	TTAGGTGCATCAGCCTGAAA
HIRA_f	CACAGCTACTGCCACTGGAC
HIRA_r	ACGGGGTTCGTTAACACAGAA
SUPT16H_f	GGCAAATGCCACTGTCTT
SUPT16H_r	GATATGGCCTCCCTTCTCT

TFIIS_f	CCACAAGAATCGGAATGTCA
TFIIS_r	GGGCTGTTCTGCGATGTAAT
HP1 β _f	GTGGTAAAGGGCAAAGTGGA
HP1 β _r	GCTTGCCTCCCTCTGATTA

Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de protección de MnasA

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
M1	AAGGGCTAATTCCTCCCAA
M2	GGCCCTGGTGTGTAGTTCTG
M3	CACACAAGGCTACTTCCCTGA
M4	AGCACCATCCAAAGGTCAGT
M5	ATCCACTGACCTTTGGATGG
M6	TGGCCTCTTCTACCTTATCTGG
M7	GAGGCCAATAAAGGAGAGAACA
M8	ACACTTCTCTCTCCGGGTCA
M9	ATGGATGACCCGGAGAGAG
M10	CACGTGATGAAATGCTAGGC
M11	TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA
M12	GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGA
M13	AAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTG
M14	AGTCACACAACAGACGGGCAC
M15	AGTGTGTGCCCGTCTGTTGTG
M16	TGACTAAAAGGGTCTGAGGGATCTCTA
M17	GAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCA
M18	TTCAAGTCCCTGTTCCGGGC
M19	GTGGCGCCCGAACAGG
M20	TTGCCGTGCGCGCTT
M21	CAGGACTCGGCTTGCTGAAG
M22	CACCAGTCGCCGCC
M23	CGACTGGTGAGTACGCCAAA
M24	ATCTCTCTCCTTCTAGCCTCCGC
M25	GCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGAT
M26	TAATACCGACGCTCTCGCACC
M27	GCGAGAGCGTCGGTATTAAGC
M28	TTCCCCCTGGCCTTAACC
M29	AAAATTCGGTTAAGGCCAGGG
M30	GGATTAAGTGCATCGTTCTAGCT
M31	GGGAGCTAGAACGATTCGCAG
M32	CTGATGTCTCTAAAAGGCCAGGATTA
M33	GATTTCGAGTTAATCCTGGCCT

M34	CCAGTATTTGTCTACAGCCTTCTGATGT
M35	CATCAGAAGGCTGTAGACAAAT
M36	GGATGGTTGTAGCTGTCCCAG
L1	TGACCCGGAGAGAGAAGTGT
L2	GTACTCCGGATGCAGCTCTC
UBXD8_Mnase_1f	ACCTCTGGGGCTCTACCAAT
UBXD8_Mnase_1r	CTAAAAGCTAATAGCGGCCTGA
UBXD8_Mnase_2f	GAGTTCCCTTCTGGAACAGAGA
UBXD8_Mnase_2r	ATTGGTAGAGCCCCAGAGGT
UBXD8_Mnase_3f	AGCGAGACCCCATCTCTACA
UBXD8_Mnase_3r	CAAGGACCTGGGACTACAGG

4. Anticuerpos para Western Blot

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
BRG1	1:500	Santa Cruz
CHD1	1:1000	Abnova Corporation
SPT6	1:500	Abcam
Tubulina	1:2000	Sigma
YY1	1:1000	Santa Cruz

5. Secuencias de los shRNAs

Los shRNAs MISSION (Sigma Aldrich) están clonados en el plásmido lentiviral pLKO.1-puro.

shRNA	Código de Sigma	Secuencia	# Exón
SPT6	TRCN0000019732	CGCCTTGTACTGTGAATTTAT	23
SPT6#2	TRCN0000019729	CCCTTGAAGAAATCTTGGAAA	25
SPT6#3	TRCN0000019730	GCCACCTTCATCCCTTATTT	32
CHD1	TRCN0000021312	GCAGTTGTGATGAAACAGAAT	5
CHD1#1	TRCN0000021309	GCGGTTTATCAAGAGCTATAA	24
CHD1#2	TRCN0000021310	CCACTCTTACTTCCTGGCAAA	11
CHD1#3	TRCN0000021312	GCAGTTGTGATGAAACAGAAT	5
CHD1#4	TRCN0000021313	CCATCGTGATTGGGATCACTA	34
ASF1A	TRCN0000074269	CCAAATCTACAGTCACTTCTT	4
HIRA	TRCN0000145800	GCAGGCGATTCTGTCAATAAA	14
SUPT16H	TRCN0000001258	CGCAAGTCTAATGTGTCCTAT	14
BRG1	TRCN0000015552	CGGCAGACACTGTGATCATT	25
TFIIS	TRCN0000001254	AGAAGAAAGAACCTGCAATTA	4
YY1	TRCN0000019894	GCCTCTCCTTTGTATATTATT	5
HP1 β	TRCN0000062223	CCCGACCTCATTGCTGAGTTT	3

Métodos

1. Cultivo celular

Las células Jurkat, derivadas de linfocitos CD4+, son rutinariamente crecidas en medio RPMI 1640, suplementado con un 10% de suero fetal bovino FBS, 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂.

Las células 293T derivan de células embriónicas de riñón y crecen en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino FBS, 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomicina.

2. Western Blot

Los extractos de las células infectadas establemente con los shRNAs se preparan en un Tampón de Lisis (25mM Tris ph 7.4, 1%SDS, 1mM EDTA ph 8, 1mM EGTA pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas (2mM PMSF, 20mM β-Glicerol fosfato, 2mM NaVO₄ y un cóctel de inhibidores de proteínas o PIC (Roche)). Determinando las concentraciones de proteínas por microensayos de BCA (Pierce), se carga la misma cantidad de proteínas en geles SDS al 10% de bisacrilamida, se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosa, las cuales son incubadas con los anticuerpos correspondientes. A continuación se incuban las membranas con anticuerpos contra IgGs de ratón o conejo conjugados con marcadores fluorescentes (dilución 1:4000). Finalmente se detecta la fluorescencia en un aparato Odyssey® Infrared Imaging System.

3. Secuenciación de lugares de integración del HIV en el genoma humano

Se utilizó el kit GenomeWalker de BD Biosciences para secuenciar los lugares de integración, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ADN genómico se digiere con enzimas de restricción (PvuII, EcorRV, DraI o SspI) las cuales cortan dejando extremos romos y unas secuencias llamadas adaptadores, las cuales tienen una secuencia conocida, se ligan al ADN genómico digerido. Se hace una PCR utilizando un oligonucleótido en la secuencia del adaptador y otro en la secuencia del LTR-HIV. Una segunda PCR se lleva a cabo utilizando el producto de la primera PCR y utilizando un

oligonucleótido en el adaptador y otro en la secuencia del HIV. Los productos de la segunda PCR se corren en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y las bandas que se obtienen son purificadas, clonadas y secuenciadas.

4. Detección de la integración del HIV en repeticiones alfoideas

Se realizan dos PCRs consecutivas con el fin de cuantificar la presencia de la integración del HIV cerca o en regiones alfoideas. Los oligonucleótidos utilizados son:

$\alpha 1$ (5'-AGACAGAAGCATTCTSAGAA-3')

$\alpha 2$ (5'-ATCACAAAGNAGTTTCTSAGAAT-3')

$\alpha 3$ (5'-TTTSATWGAGCAGNTTKGAAAC-3')

$\alpha 4$ (5'-AAAGAGTGTTTCMAANCTGCTCW-3')

A(5'-AGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGC-3') - *reverse*

B(5'-CACACA CAAGGCTACTTCCCT-3') - *forward*

C(5'-GCCACTCCCCIGTCCC GCCC-3') - *reverse*

Los oligonucleótidos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se localizan en las regiones alfoideas. Los oligonucleótidos A, B y C se encuentran en la región LTR del genoma del HIV.

La primera PCR fue realizada usando el oligonucleótido A en el LTR del HIV y cada uno de los oligonucleótidos específicos de las regiones alfoideas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$). Como control negativo, la PCR fue realizada sin ADN o solo utilizando el oligonucleótido A. Se utilizó el siguiente programa: 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 4 minutos a 72°C, y 10 minutos a 72°C.

La segunda PCR se realizó tanto con una PCR clásica como por PCR a tiempo real. La PCR clásica se llegó a cabo con 1µl de la primera PCR y con los oligonucleótidos B y C en el LTR del HIV, utilizando las mismas condiciones que en la primera pero la extensión se hizo un minuto y la amplificación se llevó a cabo durante 25 ciclos. Los productos de la PCR se corrieron en un gel al 1% de agarosa con bromuro de etidio. Las PCRs a tiempo real se hicieron de forma análoga utilizando el kit SYBR-Green PCR (Roche), utilizando el LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche).

5. Transformación de plásmidos en bacterias

La transformación en bacterias se llevó a cabo mediante choque térmico utilizando 40µl de bacterias DH5α competentes y 100ng de plásmido. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo, periodo tras el cual se incubó 90 segundos a 42°C seguido de 2 minutos en hielo y se añadió 1ml de un medio rico en glucosa llamado SOC. Las bacterias se incubaron durante 1 hora en agitación y 50µl del total se crece en una placa de LB con el antibiótico correspondiente.

6. Generación de líneas estables por infección retroviral/lentiviral

Se utilizaron las células 293T (Clontech) para producir partículas víricas conteniendo el minigenoma del HIV LTR-Tat-Ires-GFP o el vector pLKO.1 que contiene los diversos shRNAs (Sigma).

Se plaquearon 2.5×10^6 células en placas p100 un día antes de la transfección. El vector de interés se cotransfectó con los vectores pVSVG (necesario para la formación de la envuelta viral) y pCMVΔR8.91 (expresa las proteínas gag y pol del HIV). La transfección se llevó a cabo utilizando Fosfato Cálcico (BD Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas tras la transfección, se recogió el medio de las células y se reemplazó con nuevo medio. 24 horas después, se volvió a recoger el medio y se centrifugaron ambos medios 1 hora 30 minutos a 26.000rpm a 4°C. El pellet conteniendo las partículas virales se resuspendió en 1ml de medio y se usó para la infección. Se infectaron las células utilizando el método de *spinoculation*, el cual consiste en centrifugar la mezcla de células y virus en placas de 6 pocillos a 1200rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las placas durante 24 horas, periodo tras el cual se reemplaza el medio conteniendo los virus por medio fresco.

7. Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y PCR a tiempo real

La extracción de ARN fue llevada a cabo usando el kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc fue generado a partir de 100ng de ARN total con el kit *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis* (Invitrogen). Partiendo de una dilución 1:10 del volumen del ADNc resultante de 100ng de ARN, se

utiliza 1µl como muestra para la PCR. Cuando se indica, la cuantificación del producto génico fue hecha por PCR a tiempo real usando el sistema SYBR Green (Roche) para el LightCycler 480 (Roche) en placas de 96 pocillos por duplicado.

8. Mapeo de nucleosomas por sensibilidad a MNasa

Se parte de cuatro millones de células que son lisadas en el tampón A (10mM Tris HCl ph 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.3M sacarosa) durante 10 minutos en hielo, periodo tras el cual se añade NP40 (concentración final del 0.2%). Se centrifugan las muestras 10 minutos a 4° y el pellet se resuspende en el tampón A + CaCl₂ (concentración final de 10mM) añadiendo 0.4U de MNasa durante 25 minutos. El ADN genómico se acaba de extraer utilizando el kit *DNeasy blood and tissue* de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se corre en un gel de agarosa al 1.5% y tras teñir el gel 15 minutos con Bromuro de Etidio se corta la banda del gel correspondiente al mononucleosoma. El ADN se purifica del gel utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se utiliza en una PCR a tiempo real utilizando oligonucleótidos para la región a interrogar (ADN nucleosomal o las regiones espaciadoras).

Como control se utilizó 1µg de ADN genómico previamente purificado mediante el kit *DNeasy blood and tissue*. El ADN genómico se digirió con MNasa utilizando el tampón A + CaCl₂ y añadiendo 0.04U de MNasa durante 5 minutos. Tras este periodo de tiempo se fenolizó y precipitó el ADN y posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. Se purificó el ADN que se había cortado hasta un tamaño similar al del mononucleosoma (aproximadamente entre los 120 y 200 pares de bases).

9. Ensayos de actividad luciferasa

Para transfecciones transitorias se plaquean 300.000 células en placas de 6 pocillos y se usa el sistema de transfección por fosfato cálcico. Para cada pocillo se utilizan 10µg del plásmido reportero. 24 horas después de la transfección se plaquean las células y al día siguiente se añaden los tratamientos correspondientes. 36 horas tras el tratamiento, las células son recogidas en *Reporter Buffer Lysis* (Promega) y lisadas a -80°C. La cantidad de proteína es medida con el kit MicroBCA (Pierce) y se ajustan las concentraciones para que sean equivalentes. A continuación se mide la actividad

luciferasa usando el kit *Luciferase Assay* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante del luminómetro.

10. Citometría de flujo

Los experimentos de citometría de flujo se llevaron a cabo usando un citómetro Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA).

La excitación de la muestra se produjo utilizando un láser de argón a 15mW de potencia. El instrumento fue puesto a punto con la configuración estándar: *Forward scatter* (FS), *side scatter* (SS) y GFP (525nm de longitud de onda). La fluorescencia se representó en escala logarítmica. El alineamiento óptico fue puesto a punto utilizando bolas fluorescentes de 10nm (Flow-Check fluorospheres, Beckman Coulter).

11. Separación celular

La separación de las células GFP-positivas se llevó a cabo utilizando un citómetro MoFlo (Dako Cytomatin, Fort Collins, Colorado, USA), el cual utiliza un sistema de formación de gotas conteniendo las células, las cuales son excitadas con un láser de argón Coherent Enterprise II. Las regiones de células a separar fueron definidas de acuerdo con los valores de GFP, FS y SS. Las células separadas fueron reanalizadas para determinar la eficiencia de la separación.

12. Análisis del ciclo celular

Las células a analizar fueron recogidas y se lavaron con PBS dos veces. La fijación se realizó en etanol a una concentración final del 70% durante 16 horas a -20°C. Con el fin de eliminar el etanol completamente, las células se lavaron dos veces con PBS y se trataron con RNasa (1mg/ml) a 37°C durante 1 hora. Tras este tiempo, se tiñeron con Ioduro de Propidio (0.1mg/ml) y se analizaron las células en el citómetro de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

Adams M, Sharmeen L, Kimpton J, Romeo JM, Garcia JV, Peterlin BM, Groudine M, Emerman M. **Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3862-6.

Adelman K, Wei W, Ardehali MB, Werner J, Zhu B, Reinberg D, Lis JT. **Drosophila Paf1 modulates chromatin structure at actively transcribed genes.** Mol Cell Biol. 2006 Jan;26(1):250-60.

Adkins MW, Howar SR, Tyler JK. **Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes.** Mol Cell. 2004 Jun 4;14(5):657-66.

Agbottah E, Deng L, Dannenberg LO, Pumfery A, Kashanchi F. **Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription.** Retrovirology. 2006 Aug 7;3:48.

Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K, Rawat P, Gupta A, Hariharan M, Scaria V, Lalwani M, Pillai B, Mitra D, Brahmachari SK. **Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication.** Retrovirology. 2008 Dec 23;5:117.

Ahmad K, Henikoff S. **The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly.** Mol Cell. 2002 Jun;9(6):1191-200.

Alén C, Kent NA, Jones HS, O'Sullivan J, Aranda A, Proudfoot NJ. **A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II.** Mol Cell. 2002 Dec;10(6):1441-52.

Andrulis ED, Werner J, Nazarian A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lis JT. **The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in Drosophila.** Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):837-41.

Antoni BA, Rabson AB, Kinter A, Bodkin M, Poli G. **NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line.** Virology. 1994 Aug 1;202(2):684-94.

Archin NM, Espeseth A, Parker D, Cheema M, Hazuda D, Margolis DM. **Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid.** AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Feb;25(2):207-12.

Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. **NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II.** Mol Cell. 2001 Aug;8(2):327-37.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** Science. 1983 May 20;220(4599):868-71.

Bednarik DP, Duckett C, Kim SU, Perez VL, Griffis K, Guenther PC, Folks TM. **DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappa B proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs.** New Biol. 1991 Oct;3(10):969-76.

Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. **FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration.** Science. 2003 Aug 22;301(5636):1090-3.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** Annu Rev Immunol. 1999;17:657-700.

Bieniasz PD, Cullen BR. **Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells.** J Virol. 2000 Nov;74(21):9868-77.

Bisgrove D, Lewinski M, Bushman F, Verdin E. **Molecular mechanisms of HIV-1 proviral latency.** Expert Rev Anti Infect Ther. 2005 Oct;3(5):805-14.

Blazkova J, Trejbalova K, Gondois-Rey F, Halfon P, Philibert P, Guiguen A, Verdin E, Olive D, Van Lint C, Hejnar J, Hirsch I. **CpG methylation controls reactivation of HIV from latency.** PLoS Pathog. 2009 Aug;5(8):e1000554. Epub 2009 Aug 21.

Bortvin A, Winston F. **Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones.** Science. 1996 Jun 7;272(5267):1473-6.

Bosque A, Planelles V. **Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells.** Blood. 2009 Jan 1;113(1):58-65. Epub 2008 Oct 10.

Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O'Doherty U, Bushman F. **HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture.** AIDS. 2009 Jul 31;23(12):1461-71.

Brès V, Kiernan R, Emiliani S, Benkirane M. **Tat acetyl-acceptor lysines are important for human immunodeficiency virus type-1 replication.** J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22215-21. Epub 2002 Apr 15.

Brooks DG, Hamer DH, Arlen PA, Gao L, Bristol G, Kitchen CM, Berger EA, Zack JA. **Molecular characterization, reactivation, and depletion of latent HIV.** Immunity. 2003 Sep;19(3):413-23.

Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA. **Generation of HIV latency during thymopoiesis.** Nat Med. 2001 Apr;7(4):459-64.

Chang LS, Shi Y, Shenk T. **Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor.** J Virol. 1989 Aug;63(8):3479-88.

Chapman RD, Heidemann M, Hintermair C, Eick D. **Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD.** Trends Genet. 2008 Jun;24(6):289-96. Epub 2008 May 9.

Cheung V, Chua G, Batada NN, Landry CR, Michnick SW, Hughes TR, Winston F. **Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the Saccharomyces cerevisiae genome.** PLoS Biol. 2008 Nov 11;6(11):e277.

Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. **Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells.** Nature. 2005 May 5;435(7038):108-14. Epub 2005 Apr 13.

Chun TW, Fauci AS. **Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Sep 28;96(20):10958-61.

Colin L, Van Lint C. **Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies.** Retrovirology. 2009 Dec 4;6:111.

Conaway RC, Kong SE, Conaway JW. **TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers.** Cell. 2003 Aug 8;114(3):272-4.

Contento RL, Molon B, Boularan C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. **CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 22;105(29):10101-6. Epub 2008 Jul 15.

Contreras X, Barboric M, Lenasi T, Peterlin BM. **HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription.** PLoS Pathog. 2007 Oct 12;3(10):1459-69.

Contreras X, Schweneker M, Chen CS, McCune JM, Deeks SG, Martin J, Peterlin BM. **Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells.** J Biol Chem. 2009 Mar 13;284(11):6782-9. Epub 2009 Jan 9.

Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, Davie JR, Shi Y, Hansen U, Margolis DM. **The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1.** J Virol. 2000 Aug;74(15):6790-9.

Cramer P. **Multisubunit RNA polymerases.** Curr Opin Struct Biol. 2002 Feb;12(1):89-97.

Crampton N, Bonass WA, Kirkham J, Rivetti C, Thomson NH. **Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy.** *Nucleic Acids Res.* 2006;34(19):5416-25. Epub 2006 Sep 29.

Dantoni JC, Murthy KG, Manley JL, Tora L. **Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA.** *Nature.* 1997 Sep 25;389(6649):399-402.

De Marco A, Biancotto C, Knezevich A, Maiuri P, Vardabasso C, Marcello A. **Intragenic transcriptional cis-activation of the human immunodeficiency virus 1 does not result in allele-specific inhibition of the endogenous gene.** *Retrovirology.* 2008 Nov 4;5:98.

Dengl S, Mayer A, Sun M, Cramer P. **Structure and in vivo requirement of the yeast Spt6 SH2 domain.** *J Mol Biol.* 2009 May 29;389(1):211-25. Epub 2009 Apr 14.

Dieudonné M, Maiuri P, Biancotto C, Knezevich A, Kula A, Lusic M, Marcello A. **Transcriptional competence of the integrated HIV-1 provirus at the nuclear periphery.** *EMBO J.* 2009 May 28;28(15):2231-2243.

Dinosa JB, Rabi SA, Blankson JN, Gama L, Mankowski JL, Siliciano RF, Zink MC, Clements JE. **A simian immunodeficiency virus-infected macaque model to study viral reservoirs that persist during highly active antiretroviral therapy.** *J Virol.* 2009 Sep;83(18):9247-57. Epub 2009 Jul 1.

du Chéné I, Basyuk E, Lin YL, Triboulet R, Knezevich A, Chable-Bessia C, Mettling C, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Bertrand E, Marcello A, Emiliani S, Kiernan R, Benkirane M. **Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency.** *EMBO J.* 2007 Jan 24;26(2):424-35.

Dvir A, Tan S, Conaway JW, Conaway RC. **Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter.** *J Biol Chem.* 1997 Nov 7;272(45):28175-8.

Eitoku M, Sato L, Senda T, Horikoshi M. **Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly.** Cell Mol Life Sci. 2008 Feb;65(3):414-44.

Ellenhorn JD, Woodle ES, Thistlethwaite JR, Bluestone JA. **T lymphocyte activation following OKT3 treatment.** Curr Surg. 1990 Nov-Dec;47(6):458-9.

Emiliani S, Fischle W, Ott M, Van Lint C, Amella CA, Verdin E. **Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line.** J Virol. 1998 Feb;72(2):1666-70.

Emiliani S, Van Lint C, Fischle W, Paras P Jr, Ott M, Brady J, Verdin E. **A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 25;93(13):6377-81.

English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill ME, Tyler JK. **Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1.** Cell. 2006 Nov 3;127(3):495-508.

Fanti L, Pimpinelli S. **HP1: a functionally multifaceted protein.** Curr Opin Genet Dev. 2008 Apr;18(2):169-74. Epub 2008 Mar 10.

Feuerstein N, Sahai A, Anderson WB, Salomon DS, Cooper HL. **Differential phosphorylation events associated with phorbol ester effects on acceleration versus inhibition of cell growth.** Cancer Res. 1984 Nov;44(11):5227-33.

Fish RN, Kane CM. **Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors.** Biochim Biophys Acta. 2002 Sep 13;1577(2):287-307.

Formosa T, Ruone S, Adams MD, Olsen AE, Eriksson P, Yu Y, Rhoades AR, Kaufman PD, Stillman DJ. **Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in Saccharomyces cerevisiae cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure.** Genetics. 2002 Dec;162(4):1557-71.

Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM. **Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates**

negative effectors from the transactivation response element. Mol Cell Biol. 2004 Jan;24(2):787-95.

Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. **The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.** Nucleic Acids Res. 2003 May 1;31(9):2305-12.

Gao WY, Cara A, Gallo RC, Lori F. **Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Oct 1;90(19):8925-8.

García-Rodríguez C, Rao A. **Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP).** J Exp Med. 1998 Jun 15;187(12):2031-6.

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. **CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):2927-32.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. **NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later.** Biochem Pharmacol. 2006 Nov 30;72(11):1493-505. Epub 2006 Apr 27.

Gnatt A. **Elongation by RNA polymerase II: structure-function relationship.** Biochim Biophys Acta. 2002 Sep 13;1577(2):175-90.

Greger IH, Demarchi F, Giacca M, Proudfoot NJ. **Transcriptional interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter.** Nucleic Acids Res. 1998 Mar 1;26(5):1294-301.

Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, Pierson TC, Margolick JB, Siliciano RF, Siliciano JD. **Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes.** J Virol. 2004 Jun;78(12):6122-33.

Han Y, Lin YB, An W, Xu J, Yang HC, O'Connell K, Dordai D, Boeke JD, Siliciano JD, Siliciano RF. **Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough.** Cell Host Microbe. 2008 Aug 14;4(2):134-46.

Han Y, Wind-Rotolo M, Yang HC, Siliciano JD, Siliciano RF. **Experimental approaches to the study of HIV-1 latency.** Nat Rev Microbiol. 2007 Feb;5(2):95-106.

Hartzog GA, Wada T, Handa H, Winston F. **Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in Saccharomyces cerevisiae.** Genes Dev. 1998 Feb 1;12(3):357-69.

Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT. **Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH.** EMBO J. 1996 Apr 1;15(7):1666-77.

Hsia SC, Shi YB. **Chromatin disruption and histone acetylation in regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by thyroid hormone receptor.** Mol Cell Biol. 2002 Jun;22(12):4043-52.

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. **Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.** J Biol Chem. 1985 Nov 25;260(27):14873-8.

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. **TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.** Cell. 1996 Jan 26;84(2):299-308.

Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H. **Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes.** Nat Med. 2007 Oct;13(10):1241-7. Epub 2007 Sep 30.

Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, Shumway SD, Kurama T, Boothman DA, Miyamoto S. **NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events.** J Biol Chem. 2000 Mar 31;275(13):9501-9.

Imai Y, Nakada A, Hashida R, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Oshida T. **Cloning and characterization of the highly expressed ETEA gene from blood cells of atopic dermatitis patients.** Biochem Biophys Res Commun. 2002 Oct 11;297(5):1282-90.

Jiang G, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. **c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter.** J Virol. 2007 Oct;81(20):10914-23. Epub 2007 Aug 1.

Johnson CN, Adkins NL, Georgel P. **Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action.** Biochem Cell Biol. 2005 Aug;83(4):405-17.

Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. **HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro.** EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1868-77.

Kaehlcke K, Dorr A, Hetzer-Egger C, Kiermer V, Henklein P, Schnoelzer M, Loret E, Cole PA, Verdin E, Ott M. **Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation.** Mol Cell. 2003 Jul;12(1):167-76.

Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. **Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product.** Nature. 1987 Dec 3-9;330(6147):489-93.

Kaplan CD, Laprade L, Winston F. **Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites.** Science. 2003 Aug 22;301(5636):1096-9.

Kaplan CD, Morris JR, Wu C, Winston F. **Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in D. melanogaster.** Genes Dev. 2000 Oct 15;14(20):2623-34.

Karin M, Liu Z, Zandi E. **AP-1 function and regulation.** Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):240-6.

Kattenbeck B, Rohrhofer A, Niedrig M, Wolf H, Modrow S. **Defined amino acids in the gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 are functionally active during virus assembly.** Intervirology. 1996;39(1-2):32-9.

Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. **Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation.** PLoS Pathog. 2009 Jun;5(6):e1000495. Epub 2009 Jun 26.

Kaufman PD, Cohen JL, Osley MA. **Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in Saccharomyces cerevisiae in the absence of chromatin assembly factor I.** Mol Cell Biol. 1998 Aug;18(8):4793-806.

Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P. **Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage.** Cell. 2003 Aug 8;114(3):347-57.

Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C. **HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation.** EMBO J. 1999 Nov 1;18(21):6106-18.

Kim B, Nesvizhskii AI, Rani PG, Hahn S, Aebersold R, Ranish JA. **The transcription elongation factor TFIIS is a component of RNA polymerase II preinitiation complexes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 9;104(41):16068-73. Epub 2007 Oct 3.

Kim DH, Rossi JJ. **Strategies for silencing human disease using RNA interference.** Nat Rev Genet. 2007 Mar;8(3):173-84.

Kim HJ, Seol JH, Cho EJ. **Potential role of the histone chaperone, CAF-1, in transcription.** BMB Rep. 2009 Apr 30;42(4):227-31.

Kim HJ, Seol JH, Han JW, Youn HD, Cho EJ. **Histone chaperones regulate histone exchange during transcription.** EMBO J. 2007 Oct 31;26(21):4467-74. Epub 2007 Oct 4.

Kim TK, Ebright RH, Reinberg D. **Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH.** Science. 2000 May 26;288(5470):1418-22.

Kim YK, Bourgeois CF, Pearson R, Tyagi M, West MJ, Wong J, Wu SY, Chiang CM, Karn J. **Recruitment of TFIID to the HIV LTR is a rate-limiting step in the**

emergence of HIV from latency. EMBO J. 2006 Aug 9;25(15):3596-604. Epub 2006 Jul 27.

Klase Z, Kale P, Winograd R, Gupta MV, Heydarian M, Berro R, McCaffrey T, Kashanchi F. **HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR.** BMC Mol Biol. 2007 Jul 30;8:63.

Korin YD, Brooks DG, Brown S, Korotzer A, Zack JA. **Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency.** J Virol. 2002 Aug;76(16):8118-23.

Kulkosky J, Culnan DM, Roman J, Dornadula G, Schnell M, Boyd MR, Pomerantz RJ. **Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART.** Blood. 2001 Nov 15;98(10):3006-15.

Kumar S, Orsini MJ, Lee JC, McDonnell PC, Debouck C, Young PR. **Activation of the HIV-1 long terminal repeat by cytokines and environmental stress requires an active CSBP/p38 MAP kinase.** J Biol Chem. 1996 Nov 29;271(48):30864-9.

Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF. **The multifactorial nature of HIV-1 latency.** Trends Mol Med. 2004 Nov;10(11):525-31.

Lassen KG, Bailey JR, Siliciano RF. **Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo.** J Virol. 2004 Sep;78(17):9105-14.

Laughlin MA, Zeichner S, Kolson D, Alwine JC, Seshamma T, Pomerantz RJ, Gonzalez-Scarano F. **Sodium butyrate treatment of cells latently infected with HIV-1 results in the expression of unspliced viral RNA.** Virology. 1993 Oct;196(2):496-505.

Lehrman G, Ylisastigui L, Bosch RJ, Margolis DM. **Interleukin-7 induces HIV type 1 outgrowth from peripheral resting CD4+ T cells.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2004 Aug 15;36(5):1103-4.

Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. **Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency.** Cell Host Microbe. 2008 Aug 14;4(2):123-33.

Lewinski MK, Bisgrove D, Shinn P, Chen H, Hoffmann C, Hannenhalli S, Verdin E, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. **Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription.** J Virol. 2005 Jun;79(11):6610-9.

Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. **The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells.** J Biol Chem. 2006 Jul 14;281(28):19489-500. Epub 2006 May 8.

Lomberk G, Bensi D, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R. **Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code.** Nat Cell Biol. 2006 Apr;8(4):407-15. Epub 2006 Mar 12.

Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. **The Heterochromatin Protein 1 family.** Genome Biol. 2006;7(7):228.

Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M. **Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter.** EMBO J. 2003 Dec 15;22(24):6550-61.

Mahmoudi T, Parra M, Vries RG, Kauder SE, Verrijzer CP, Ott M, Verdin E. **The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter.** J Biol Chem. 2006 Jul 21;281(29):19960-8. Epub 2006 May 10.

Mandal SS, Cho H, Kim S, Cabane K, Reinberg D. **FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation.** Mol Cell Biol. 2002 Nov;22(21):7543-52.

Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, Aunis D, Rohr O. **Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing.** EMBO J. 2007 Jan 24;26(2):412-23.

Mateescu B, Bourachot B, Rachez C, Ogryzko V, Muchardt C. **Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch.** EMBO Rep. 2008 Mar;9(3):267-72. Epub 2008 Feb 1.

Mello JA, Silljé HH, Roche DM, Kirschner DB, Nigg EA, Almouzni G. **Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway.** EMBO Rep. 2002 Apr;3(4):329-34. Epub 2002 Mar 15.

Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. **Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells.** Dev Cell. 2006 Jan;10(1):105-16.

Minc E, Courvalin JC, Buendia B. **HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes.** Cytogenet Cell Genet. 2000;90(3-4):279-84.

Munakata T, Adachi N, Yokoyama N, Kuzuhara T, Horikoshi M. **A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity.** Genes Cells. 2000 Mar;5(3):221-33.

Nabel G, Baltimore D. **An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells.** Nature. 1987 Apr 16-22;326(6114):711-3.

Omoto S, Fujii YR. **Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA.** J Gen Virol. 2005 Mar;86(Pt 3):751-5.

Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D. **The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins.** Nature. 1999 Jul 15;400(6741):284-8.

Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, Hetzer-Egger C, Henklein P, Frye R, McBurney MW, Hruby H, Jung M, Verdin E, Ott M. **SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation.** PLoS Biol. 2005 Feb;3(2):e41. Epub 2005 Feb 8.

Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D. **Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II.** Cell. 2006 May 19;125(4):703-17.

Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, Siliciano RF. **Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers.** J Virol. 2003 Feb;77(3):1659-65.

Peterson CL, Dingwall A, Scott MP. **Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 12;91(8):2905-8.

Petiti JP, Gutiérrez S, Mukdsi JH, De Paul AL, Torres AI. **Specific subcellular targeting of PKCalpha and PKCepsilon in normal and tumoral lactotroph cells by PMA-mitogenic stimulus.** J Mol Histol. 2010 Feb 23.

Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE. **Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits.** Mol Cell. 1999 Feb;3(2):247-53.

Pion M, Jordan A, Biancotto A, Dequiedt F, Gondois-Rey F, Rondeau S, Vigne R, Hejnar J, Verdin E, Hirsch I. **Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation.** J Virol. 2003 Apr;77(7):4025-32.

Pomerantz RJ, Trono D, Feinberg MB, Baltimore D. **Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency.** Cell. 1990 Jun 29;61(7):1271-6.

Prescott EM, Proudfoot NJ. **Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 25;99(13):8796-801. Epub 2002 Jun 19.

Rappaport J, Reinberg D, Zandomeni R, Weinmann R. **Purification and functional characterization of transcription factor SII from calf thymus. Role in RNA polymerase II elongation.** J Biol Chem. 1987 Apr 15;262(11):5227-32.

Reinberg D, Sims RJ 3rd. **de FACTo nucleosome dynamics**. J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23297-301. Epub 2006 Jun 9.

Reinberg D, Roeder RG. **Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains**. J Biol Chem. 1987 Mar 5;262(7):3331-7.

Reisman D, Glaros S, Thompson EA. **The SWI/SNF complex and cancer**. Oncogene. 2009 Apr 9;28(14):1653-68.

Robinson KM, Schultz MC. **Replication-independent assembly of nucleosome arrays in a novel yeast chromatin reconstitution system involves antisilencing factor Asf1p and chromodomain protein Chd1p**. Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(22):7937-46.

Rohr O, Marban C, Aunis D, Schaeffer E. **Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells**. J Leukoc Biol. 2003 Nov;74(5):736-49. Epub 2003 Aug 11.

Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. **Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1**. J Gen Virol. 2010 Jan;91(Pt 1):1-12. Epub 2009 Oct 7.

Rudd MD, Izban MG, Luse DS. **The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 16;91(17):8057-61.

Sagot-Lerolle N, Lamine A, Chaix ML, Boufassa F, Aboulker JP, Costagliola D, Goujard C, Pallier C, Delfraissy JF, Lambotte O; ANRS EP39 study. **Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir**. AIDS. 2008 Jun 19;22(10):1125-9.

Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. **Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes**. Nat Cell Biol. 2004 Jan;6(1):73-7. Epub 2003 Dec 7.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. **HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots.** Cell. 2002 Aug 23;110(4):521-9.

Sharp JA, Fouts ET, Krawitz DC, Kaufman PD. **Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing.** Curr Biol. 2001 Apr 3;11(7):463-73.

Sharp JA, Franco AA, Osley MA, Kaufman PD. **Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*.** Genes Dev. 2002 Jan 1;16(1):85-100.

Shen A, Zink MC, Mankowski JL, Chadwick K, Margolick JB, Carruth LM, Li M, Clements JE, Siliciano RF. **Resting CD4+ T lymphocytes but not thymocytes provide a latent viral reservoir in a simian immunodeficiency virus-Macaca nemestrina model of human immunodeficiency virus type 1-infected patients on highly active antiretroviral therapy.** J Virol. 2003 Apr;77(8):4938-49.

Shen W, Xu C, Huang W, Zhang J, Carlson JE, Tu X, Wu J, Shi Y. **Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails.** Biochemistry. 2007 Feb 27;46(8):2100-10. Epub 2007 Feb 3.

Sherwood PW, Tsang SV, Osley MA. **Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol Cell Biol. 1993 Jan;13(1):28-38.

Shi Y, Lee JS, Galvin KM. **Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1.....** Biochim Biophys Acta. 1997 Apr 18;1332(2):F49-66.

Siliciano JD, Lai J, Callender M, Pitt E, Zhang H, Margolick JB, Gallant JE, Cofrancesco J Jr, Moore RD, Gange SJ, Siliciano RF. **Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid.** J Infect Dis. 2007 Mar 15;195(6):833-6. Epub 2007 Jan 30.

Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, Johnson AD, Hartzog GA, Arndt KM. **Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription**

elongation factors and localizes to transcribed genes. EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1846-56.

Sims RJ 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. **Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it.** Genes Dev. 2004 Oct 15;18(20):2437-68.

Sims RJ 3rd, Chen CF, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D. **Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains.** J Biol Chem. 2005 Dec 23;280(51):41789-92. Epub 2005 Oct 31.

Sims RJ 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D. **Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing.** Mol Cell. 2007 Nov 30;28(4):665-76.

Smith ER, Lee MG, Winter B, Droz NM, Eissenberg JC, Shiekhattar R, Shilatifard A. **Drosophila UTX is a histone H3 Lys27 demethylase that colocalizes with the elongating form of RNA polymerase II.** Mol Cell Biol. 2008 Feb;28(3):1041-6. Epub 2007 Nov 26.

Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO. **Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo.** Curr Biol. 2002 Dec 23;12(24):2159-66.

Squazzo SL, Costa PJ, Lindstrom DL, Kumer KE, Simic R, Jennings JL, Link AJ, Arndt KM, Hartzog GA. **The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo.** EMBO J. 2002 Apr 2;21(7):1764-74.

Stanley SK, Folks TM, Fauci AS. **Induction of expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected promonocytic cell line by ultraviolet irradiation.** AIDS Res Hum Retroviruses. 1989 Aug;5(4):375-84.

Steger DJ, Eberharter A, John S, Grant PA, Workman JL. **Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):12924-9.

Stellbrink HJ, van Lunzen J, Westby M, O'Sullivan E, Schneider C, Adam A, Weitner L, Kuhlmann B, Hoffmann C, Fenske S, Aries PS, Degen O, Eggers C, Petersen H, Haag F, Horst HA, Dalhoff K, Möcklinghoff C, Cammack N, Tenner-Racz K, Racz P. **Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial).** AIDS. 2002 Jul 26;16(11):1479-87.

Stokes DG, Tartof KD, Perry RP. **CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of Drosophila polytene chromosomes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 9;93(14):7137-42.

Swigut T, Wysocka J. **H3K27 demethylases, at long last.** Cell. 2007 Oct 5;131(1):29-32.

Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. **Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins.** J Biol Chem. 1996 Aug 16;271(33):19935-42.

Tang Y, Poustovoitov MV, Zhao K, Garfinkel M, Canutescu A, Dunbrack R, Adams PD, Marmorstein R. **Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly.** Nat Struct Mol Biol. 2006 Oct;13(10):921-9. Epub 2006 Sep 17.

Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Jeang KT, Benkirane M. **Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication.** Science. 2007 Mar 16;315(5818):1579-82. Epub 2007 Feb 22.

Trotter KW, Archer TK. **The BRG1 transcriptional coregulator.** Nucl Recept Signal. 2008 Feb 1;6:e004.

Tsukiyama T, Palmer J, Landel CC, Shiloach J, Wu C. **Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in Saccharomyces cerevisiae.** Genes Dev. 1999 Mar 15;13(6):686-97.

Tyagi M, Karn J. **CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency.** EMBO J. 2007 Dec 12;26(24):4985-95. Epub 2007 Nov 15.

Tyler JK, Adams CR, Chen SR, Kobayashi R, Kamakaka RT, Kadonaga JT. **The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair.** Nature. 1999 Dec 2;402(6761):555-60.

VanDemark AP, Blanksma M, Ferris E, Heroux A, Hill CP, Formosa T. **The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition.** Mol Cell. 2006 May 5;22(3):363-74.

Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. **Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation.** EMBO J. 1996 Mar 1;15(5):1112-20.

Verdin E, Paras P Jr, Van Lint C. **Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation.** EMBO J. 1993 Aug;12(8):3249-59.

Verhoef K, Marzio G, Hillen W, Bujard H, Berkhout B. **Strict control of human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat.** J Virol. 2001 Jan;75(2):979-87.

Verin AD, Liu F, Bogatcheva N, Borbiev T, Hershenson MB, Wang P, Garcia JG. **Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Aug;279(2):L360-70.

Vicenzi E, Poli G. **Ultraviolet irradiation and cytokines as regulators of HIV latency and expression.** Chem Biol Interact. 1994 Jun;91(2-3):101-9.

Williams SA, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, Greene WC. **Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB.** J Biol Chem. 2004 Oct 1;279(40):42008-17. Epub 2004 Jul 28.

Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. **NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation.** EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):139-49. Epub 2005 Dec 1.

Williams SA, Greene WC. **Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation.** Cytokine. 2007 Jul;39(1):63-74. Epub 2007 Jul 20.

Williams SK, Tyler JK. **Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly.** Curr Opin Genet Dev. 2007 Apr;17(2):88-93. Epub 2007 Feb 20.

Winston F, Chaleff DT, Valent B, Fink GR. **Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of Saccharomyces cerevisiae.** Genetics. 1984 Jun;107(2):179-97.

Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. **Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli.** Science. 2006 Feb 24;311(5764):1141-6.

Xella B, Goding C, Agricola E, Di Mauro E, Caserta M. **The ISWI and CHD1 chromatin remodelling activities influence ADH2 expression and chromatin organization.** Mol Microbiol. 2006 Mar;59(5):1531-41.

Yan Q, Moreland RJ, Conaway JW, Conaway RC. **Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II.** J Biol Chem. 1999 Dec 10;274(50):35668-75.

Yang HC, Xing S, Shan L, O'Connell K, Dinoso J, Shen A, Zhou Y, Shrum CK, Han Y, Liu JO, Zhang H, Margolick JB, Siliciano RF. **Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation.** J Clin Invest. 2009 Nov;119(11):3473-86. doi: 10.1172/JCI39199. Epub 2009 Oct 1.

Yang X, Chen Y, Gabuzda D. **ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB.** J Biol Chem. 1999 Sep 24;274(39):27981-8.

Yao YL, Yang WM, Seto E. **Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation.** Mol Cell Biol. 2001 Sep;21(17):5979-91.

Yik JH, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, Zhou Q. **Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA.** Mol Cell. 2003 Oct;12(4):971-82.

Ylisastigui L, Archin NM, Lehrman G, Bosch RJ, Margolis DM. **Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression.** AIDS. 2004 May 21;18(8):1101-8.

Yoh SM, Cho H, Pickle L, Evans RM, Jones KA. **The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iws1-dependent mRNA splicing and export.** Genes Dev. 2007 Jan 15;21(2):160-74.

Zhang L, Fletcher AG, Cheung V, Winston F, Stargell LA. **Spn1 regulates the recruitment of Spt6 and the Swi/Snf complex during transcriptional activation by RNA polymerase II.** Mol Cell Biol. 2008 Feb;28(4):1393-403. Epub 2007 Dec 17.

Zhang R, Liu ST, Chen W, Bonner M, Pehrson J, Yen TJ, Adams PD. **HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells.** Mol Cell Biol. 2007 Feb;27(3):949-62. Epub 2006 Nov 13.

Zhao X, Geltinger C, Kishikawa S, Ohshima K, Murata T, Nomura N, Nakahara T, Yokoyama KK. **Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis.** Cytotechnology. 2000 Jul;33(1-3):123-30.

ANEXO 1

293T	Células embrionarias de riñón
5aza	5-aza-2' deoxicitidina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCA	Ácido Bicinconínico
CTD	Dominio carboxi-terminal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetraacético
EGTA	Ácido Etilenglicol Tetraacético
GF109203X	Inhibidor de la vía de la PKC
GFP	Proteína verde fluorescense
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HMBA	Hexametileno Bisacetamida
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
LUC	Luciferasa
MFI	Intensidad media de la fluorescencia (<i>Median Fluorescence Intensity</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD98059	Inhibidor de la vía de la MAP quinasa ERK
PIC	Cóctel de inhibidores de proteínas (<i>Protein inhibitors cocktail</i>)
PKC	Proteína Quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonil
RT-PCR	<i>Retro Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i>

SDS	Dodecil Sulfato Sódico
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TSA	Tricostatina A
WM	Wortmanina, inhibidor de la vía de PI3K

ANEXO 2

Yeast Genetic Analysis Reveals the Involvement of Chromatin Reassembly Factors in Repressing HIV-1 Basal Transcription

Manuela Vanti^{1,3}, Edurne Gallastegui^{2,3}, Iñaki Respaldiza¹, Alfonso Rodríguez-Gil¹, Fernando Gómez-Herreros¹, Silvia Jimeno-González¹, Albert Jordan², Sebastián Chávez^{1*}

1 Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Seville, Spain, **2** Centre de Regulació Genòmica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Abstract

Rebound of HIV viremia after interruption of anti-retroviral therapy is due to the small population of CD4+ T cells that remain latently infected. HIV-1 transcription is the main process controlling post-integration latency. Regulation of HIV-1 transcription takes place at both initiation and elongation levels. Pausing of RNA polymerase II at the 5' end of HIV-1 transcribed region (5'HIV-TR), which is immediately downstream of the transcription start site, plays an important role in the regulation of viral expression. The activation of HIV-1 transcription correlates with the rearrangement of a positioned nucleosome located at this region. These two facts suggest that the 5'HIV-TR contributes to inhibit basal transcription of those HIV-1 proviruses that remain latently inactive. However, little is known about the cell elements mediating the repressive role of the 5'HIV-TR. We performed a genetic analysis of this phenomenon in *Saccharomyces cerevisiae* after reconstructing a minimal HIV-1 transcriptional system in this yeast. Unexpectedly, we found that the critical role played by the 5'HIV-TR in maintaining low levels of basal transcription in yeast is mediated by FACT, Spt6, and Chd1, proteins so far associated with chromatin assembly and disassembly during ongoing transcription. We confirmed that this group of factors plays a role in HIV-1 postintegration latency in human cells by depleting the corresponding human orthologs with shRNAs, both in HIV latently infected cell populations and in particular single-integration clones, including a latent clone with a provirus integrated in a highly transcribed gene. Our results indicate that chromatin reassembly factors participate in the establishment of the equilibrium between activation and repression of HIV-1 when it integrates into the human genome, and they open the possibility of considering these factors as therapeutic targets of HIV-1 latency.

Citation: Vanti M, Gallastegui E, Respaldiza I, Rodríguez-Gil A, Gómez-Herreros F, et al. (2009) Yeast Genetic Analysis Reveals the Involvement of Chromatin Reassembly Factors in Repressing HIV-1 Basal Transcription. *PLoS Genet* 5(1): e1000339. doi:10.1371/journal.pgen.1000339

Editor: Joanna Wysocka, Stanford University School of Medicine, United States of America

Received: January 29, 2008; **Accepted:** December 12, 2008; **Published:** January 16, 2009

Copyright: © 2009 Vanti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry for Education and Science (MEC) and the Andalusian Government to SC, and by grants from the Spanish Ministry for Health and the Catalanian Government (GC) to AJ. MV, EG, SJG and ARG were recipients of predoctoral fellowships from MEC, GC, MEC and the University of Seville, respectively. AJ was the recipient of a 'Ramón y Cajal' appointment from MEC.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: schavez@us.es

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Following integration into the host cell genome, HIV-1 transcription is the most important step regulating viral replication. The main factor involved in this regulation is the viral Tat protein, which binds TAR, a structured RNA element present at the 5' end of the viral mRNAs. The structure of the mRNA 5' end also contributes to the pausing of RNA polymerase II (RNAPolII) at the LTR [1]. This pausing is characteristic of HIV-1 transcription and appears to play a role in maintaining low levels of basal transcription when the promoter is not activated [2,3].

Tat activates transcription by both inducing chromatin remodeling and recruiting P-TEFb, a cell factor required for productive transcription elongation, onto the viral LTR [4,5]. Tat also stimulates transcription by direct, TAR-independent activation of the viral promoter [6]. Induction of the host transcription factors NF- α B cooperates with Tat in completing HIV activation [7].

Chromatin plays an essential role in the transcriptional regulation of HIV (reviewed by [8,9]). The transition from basal to activated transcription correlates with drastic changes in the

acetylation levels of the nucleosomes covering the HIV promoter [10] and with the rearrangement of nucleosome positioning on the 5' LTR [11]. These chromatin alterations are catalyzed by histone modifying enzymes and ATP-dependent chromatin remodeling complexes, which are recruited by Tat to the LTR [12–14]. Tat action on HIV chromatin is also mediated by the nucleosome assembly protein hNAP-1 [15].

Several host factors, including the receptor tyrosine kinase RON [16] and a subunit of the CPSF complex [17], contribute to maintaining the repressive state characteristic of HIV latency, but most elements directly responsible for HIV postintegration latency are also related to chromatin. Histone deacetylases (HDAC) are involved in the transcriptional repression of the LTR [18] and their recruitment by CBF-1 promotes HIV-1 entry into latency [19]. HP1, binding trimethylated histone H3-K9, also plays a role in HIV-1 silencing [20]. Consistent with this role of chromatin in HIV latency, the chromatin environment of the integration site influences the transcriptional behavior of the provirus, whose level of basal transcription is undetectable in some integrants [21].

Author Summary

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by the human immunodeficiency virus (HIV). Drugs used for anti-viral therapy are very efficient in controlling the presence of viral particles in infected patients. However, if this therapy is interrupted, rebound of viremia occurs due to the small population of cells that remain latently infected. A specific region of the HIV genome (the beginning of the transcribed region) plays an important role in viral expression and may contribute to its silent state in latently infected cells. We reconstructed a minimal HIV system in yeast to perform a genetic analysis of the role played by that specific region of the viral genome. We found that the repressive role played by this region is mediated by a group of proteins (chromatin reassembly factors) so far associated with other functions during gene expression. We confirmed that this group of factors plays a role in controlling HIV-1 basal transcription in human cells.

One of the most interesting phenomena that takes place during the transcriptional activation of a latent HIV-1 provirus is the precise, transcription-independent remodelling of nucleosome-1, positioned at the 5' end of HIV-1 transcribed region (5'HIV-TR), immediately downstream of the transcription start site [11]. In this work, we performed a genetic analysis of the role of the 5'HIV-TR in basal transcription, making use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which has already been successfully used to investigate other aspects of HIV-1 biology [22–24]. We show that the 5'HIV-TR is critical in repressing basal transcription in yeast and that this phenomenon is mediated by FACT, Spt6 and Chd1, proteins involved in co-transcriptional chromatin reassembly. Finally, we confirm that this group of factors plays a role in maintaining low levels of basal transcription in human cells.

Results

The 5'HIV-TR Inhibits Basal Transcription in Yeast

It has been previously described how the entire HIV-1 LTR is transcriptionally inactive in yeast [25]. Therefore, in order to investigate transcription elongation through the 5'HIV-TR in *Saccharomyces cerevisiae*, we constructed a chimeric yeast-HIV transcription unit. We located a fragment of the HIV-1 transcribed region (+1/+671), under the transcriptional control of a Ty1 promoter, which drives a retroelement with a low, but detectable, level of basal transcription [26]. The fragment included all the sequences that have been shown to be relevant in regulating HIV-1 transcriptional elongation. We did not choose a longer piece of HIV-1 to avoid the complex pattern of spliced forms that characterize this virus. In order to ensure its detection by northern blot, we increased the length of the mRNA by adding the coding region of the yeast *PHO5* gene (Figure 1A). A transcript of the expected length (2.1 kb) was detected when we transformed three different wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae* with a centromeric plasmid containing the Ty1-HIV construct (Figures 1A and Figure S1).

In order to explore whether the 5'HIV-TR can influence transcription in yeast, we deleted a 203 bp fragment of this region, including most of the TAR-encoding R domain. The new transcription unit, Ty1-HIVTARless, also expressed a transcript of the expected length (1.9 kb). Quantification of the transcripts revealed that the deletion produced a clear increase in the mRNA amounts (Figures 1A and Figure S1). To confirm that this difference was due to RNAPolIII pausing, we performed ChIP

experiments with a Myc-tagged form of Rpb1, the biggest subunit of RNAPolIII. The results obtained with Ty1-HIV showed that the amounts of RNAPolIII bound to the 5'HIV-TR were higher than the levels detected downstream (Figure 1B). This enrichment was not due to the proximity to the initiation site, since we did not detect a significant accumulation of RNAPolIII at the equivalent region of Ty1-HIVTARless, immediately downstream of its initiation site (Figure 1B).

One of the main factors regulating HIV-1 transcription is DSIF, which exerts a negative influence on RNAPolIII transcription during early elongation [27]. We analyzed the mRNA levels of Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless in an *spt4Δ* mutant lacking one of the subunits of yeast DSIF. As expected, the absence of Spt4 partially abolished the repressive role of the 5'HIV-TR (Figure 1A).

In order to ascertain whether the TAR structure contributes to the repressive role of the 5'HIV-TR in yeast, we constructed a mutant version of Ty1-HIV (Ty1-HIVTARmut), in which we replaced the promoter-distal part of the TAR-encoding sequence (5'-GCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCC-3') by a complementary string (5'-CGAGAGACCGATTGATCCCTTGGG-3'). The new transcription unit, encoding an mRNA without the ability to form a TAR structure, showed levels of expression similar to Ty1-HIV and clearly below Ty1-HIVTARless (Figure 1C), indicating that the phenomenon that we are describing does not depend on the TAR element.

Non-active HIV-1 LTR is occupied by a set of positioned nucleosomes, one of which covers the 5'HIV-TR [11]. To complete the characterization of Ty1-HIV, we digested chromatin and naked DNA samples with micrococcal nuclease (MNase) and analyzed nucleosome positioning by quantitative PCR. As shown in Figure 1D, the transcribed region of Ty1-HIV showed a clearly defined nucleosomal pattern, similar to HIV-1 in human cells. In contrast, the pattern on the Ty1-HIVTARless transcribed region is incompatible with a unique translational phase of nucleosomes, suggesting a more dynamic chromatin structure with several alternative distributions (Figure 1D). The higher accessibility of Ty1-HIVTARless chromatin was also confirmed by hybridization of MNase-treated samples with probes covering the 5' end of its transcribed region (Figure S2). Hybridization of Ty1-HIV samples with probe 1, covering the 5'HIV-TR produced a ladder of signals, compatible with a regular nucleosomal structure, whose shortest fragment was approximately 150 bp long. Similar results were obtained with probe 3. In contrast, hybridization of Ty1-HIVTARless samples with probe 2, covering the 5' end of its transcribed region, produced a nucleosomal ladder that included a smeared signal of DNA fragments shorter than 100 bp. Rehybridization with probe 3, also showing a less regular nucleosomal ladder, excluded the possibility that this smear was due to DNA degradation (Figure S2). Taken together, the results shown so far indicate that Ty1-HIV is a good tool for investigating transcription elongation through the 5'HIV-TR, and suggest that the repressive role of this DNA element in yeast is related to its chromatin structure.

It has been described how nucleotide deprivation stimulates Ty1 transcription [28]. We found that the addition of 6-azauracil, an NTP-depleting drug, to the medium produced a rapid increase in the overall level of Ty1 mRNA (Figure S3). We made use of this simple method of activating the Ty1 promoter in order to study the effect of promoter activation on 5'HIV-TR transcription. We observed that promoter activation eliminated the functional differences between Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless, which became equally expressed in the presence of 6-azauracil. Similar results were obtained in the absence of the RNAPolIII cleavage-factor TFIIIS (*dst1Δ*), suggesting that RNAPolIII does not become arrested when transcribing the 5'HIV-TR (Figure 2A).

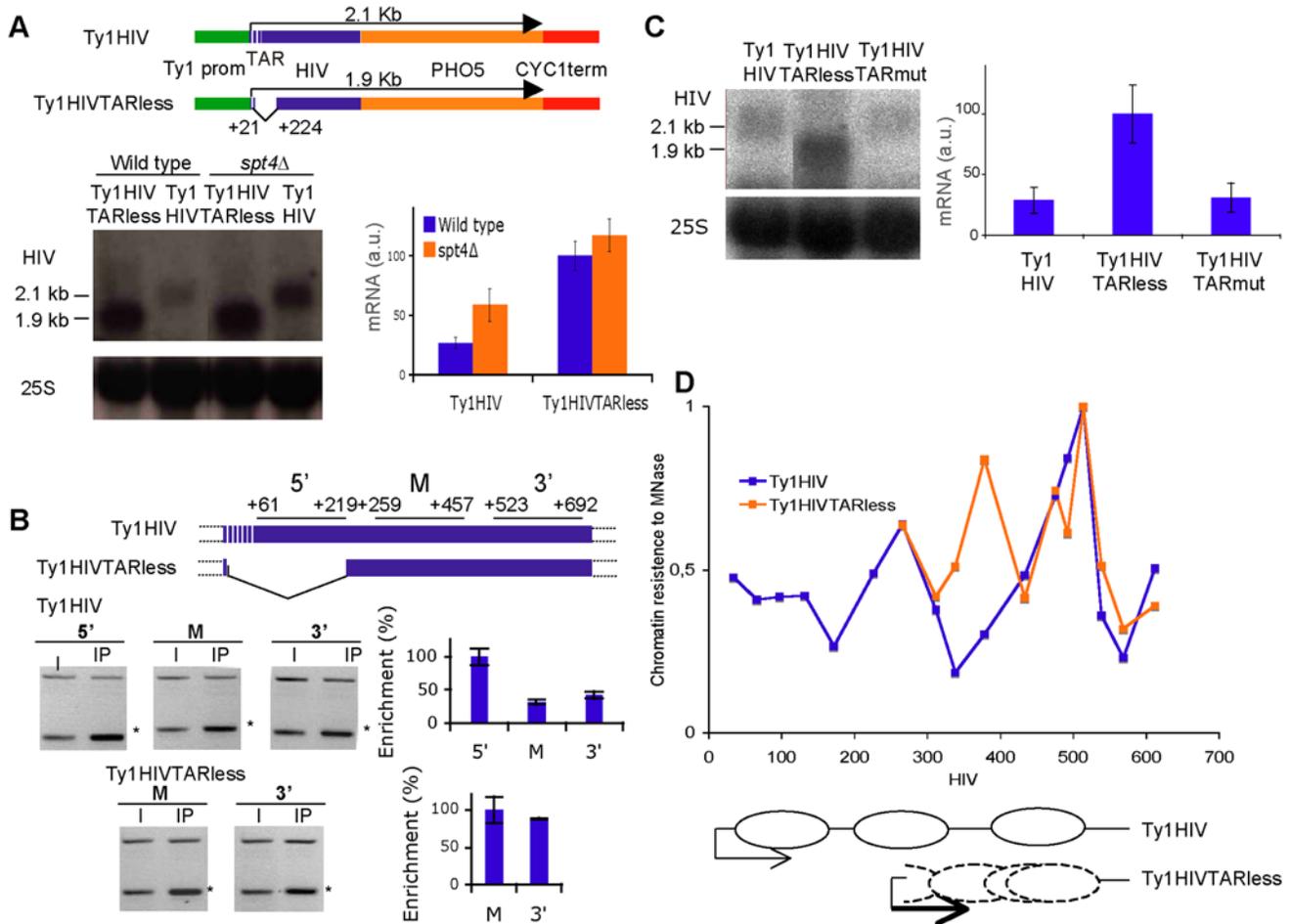


Figure 1. Influence of the 5' end of HIV-1 transcribed region on basal transcription in yeast. (A) The 5'HIV-TR inhibits Ty1-HIV-1 expression and this inhibition partially depends on yDSIF. mRNA samples from the BY4741 wild-type yeast strains and from an isogenic *spt4.1* strain, transformed with plasmids pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless, were resolved in agarose gels and analyzed by Northern blotting. Quantification of the signals is shown, after normalizing with the levels of 25S rRNA. A typical result and the quantification of three independent experiments are shown. (B) ChIP analysis of RNApol II in the two indicated transcription units. ARG3 cells, isogenic to BY4741, except for the *RPB1::cMyc* allele, transformed with pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless, were grown to mid-log phase. Cross-linked chromatin was immunoprecipitated with monoclonal anti-Myc antibody. PCR was conducted on two dilutions of whole cell extract (WCE) and two different amounts of immunoprecipitated DNA (IP; only the most diluted are shown). PCR primers flank segments located in the 5', central and 3' regions of each gene. Diagrams at the top indicate the position of the PCR amplicons relative to the HIV-1 transcription start site. A non-transcribed region adjacent to *FUS1* was used as a control. A typical experiment for each gene is shown on the left and the averages of three independent experiments are quantified on the right. The HIV signals are marked with an asterisk. (C) The TAR RNA structure is not required for the repressive effect of the 5'HIV-TR on basal transcription. Northern analyses of Ty1-HIV, Ty1-HIVTARless and Ty1HIVTARmut in BY4741 were performed as in A. (D) Chromatin configuration of the 5'HIV-TR in yeast. Spheroplasts of formaldehyde-treated BY4741 cells containing pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless were lysed and digested with MNase. After purification, DNA was quantified with real-time PCR as described in Materials and Methods, using the primers listed in Table S3. Signals were normalized against naked DNA by repeating the same procedure with control DNA, purified from formaldehyde-treated cells before digesting it with MNase. For comparison, the two profiles were represented as fractions of the signal obtained with amplicon 14 (+490/+537). Diagrams represent the estimated locations of positioned nucleosomes. Dashed ovals indicate possible alternative locations of nucleosomes in TyHIVTARless. doi:10.1371/journal.pgen.1000339.g001

To further confirm that promoter activation abolishes the repressive effect of the 5'HIV-TR, we replaced the Ty1 promoter by the one of *GALI*, a tightly regulated gene that becomes strongly activated when galactose is the carbon source. Under conditions of weak activation (2% raffinose plus 0.02% galactose) a clear difference was observed between *GALI*-HIV and *GALI*-HIV-TARless (Figure 2B), indicating that the 5'HIV-TR does not only repress Ty1-driven transcription. As expected, when we added high levels of galactose (2%) to the medium, we observed a further increase in mRNA accumulation. However, in this case, the levels of mRNA accumulation were the same in cells containing the *GALI*-HIV construct as in those transformed with *GALI*-

HIVTARless (Figure 2C). This result shows again that the repressive role of the 5'HIV-TR is not effective under activating conditions.

When HIV-1 promoter becomes active in human cells, the TAR domain is required for full activation by Tat and P-TEFb. We wondered whether the activation of the promoter in yeast still allows a supplemental induction by Tat and P-TEFb. We expressed hCDK9, hCycT1 and Tat by cloning their cDNAs in yeast expression vectors (Figure S4A and B). We did not detect any influence of Tat and P-TEFb on Ty1-HIV basal transcription (Figure 2D). We were also interested in testing the effect of Tat and P-TEFb on Ty1-HIV expression under activating conditions. The

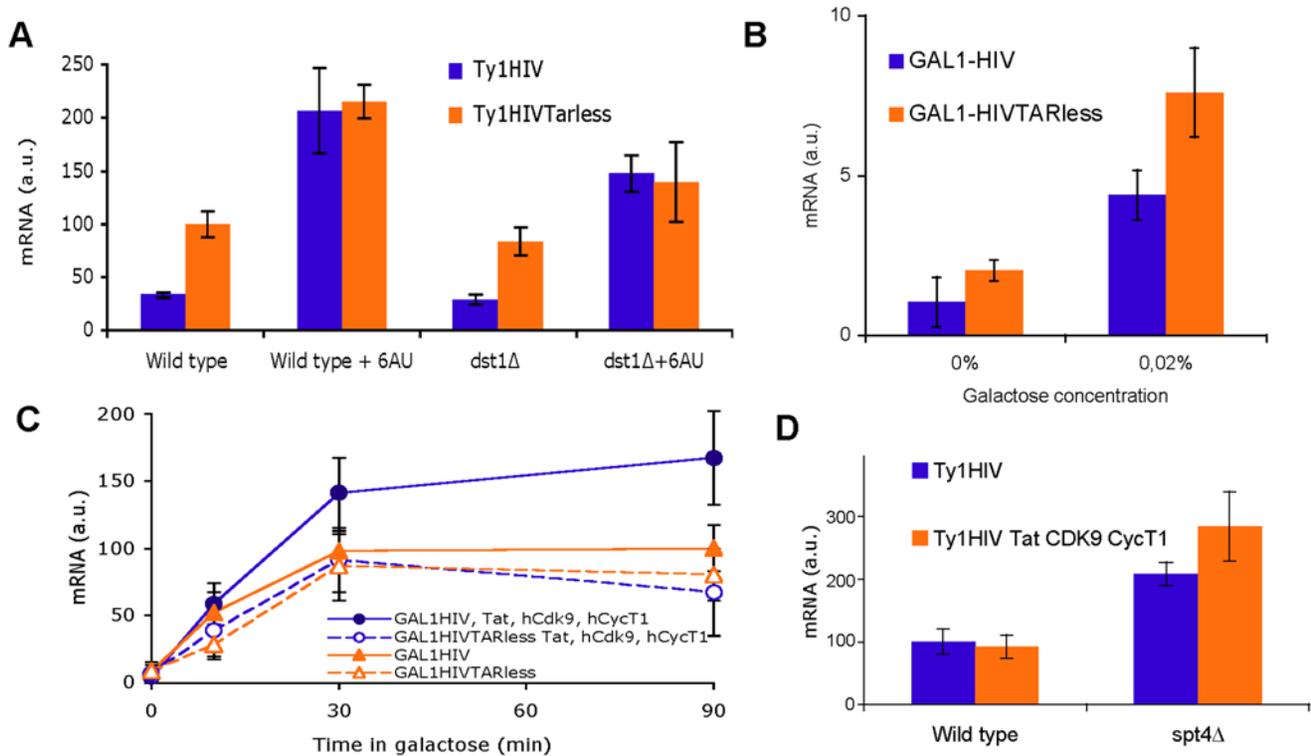


Figure 2. No effect of the 5'HIV-TR on mRNA levels upon promoter activation. (A) Activation of the Ty1 promoter by the NTP-depleting agent 6-azauracil eliminates the inhibitory effect of the 5'HIV-TR, both in a wild type and in a strain lacking TFIIIS (*dst1Δ*). Experiment details as for Figure 1A. (B) The 5'HIV-TR inhibits *GAL1*-driven transcription when the promoter is weakly active. Cells transformed with plasmids pGAL1-HIV or pGAL1-HIVTARless were grown to mid-log phase in minimal medium with raffinose (0%) or with raffinose plus 0.02% galactose (0.02%) as carbon sources. (C) No effect of the 5'HIV-TR on mRNA levels is detected when an activated *GAL1* promoter drives transcription, unless Tat and P-TEFb are present in the yeast cell. Cells transformed with plasmids pGAL1-HIV or pGAL1-HIVTARless, alone or together with p415GPD-CycT1, p414GPD-Cdk9 and p413GPD-Tat, were grown to mid-log phase as in B and incubated for 90 min in the presence of 2% galactose. (D) Tat and P-TEFb enhance Ty1-HIV expression in *spt4Δ* but they do not alter basal transcription in the wild type. Cells transformed with plasmids pTy1-HIV or pTy1-HIVTARless, alone or together with p415GPD-CycT1, p414GPD-Cdk9 and p413GPD-Tat, were grown to mid-log phase. In all cases, mRNA samples were taken and analyzed by Northern blot as in Figure 1A and the averages of three independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pgen.1000339.g002

addition of 6AU to these cells produced very irregular results, likely due the presence of three different plasmids in this strain and to the plasmid instability produced by 6-azauracil [29]. As an alternative approach, we tested the effect of Tat and P-TEFb on a more active Ty1-HIV by repeating the assay in an *spt4Δ* strain. In this case we obtained consistent results and a weak but significant effect was detected (Figure 2D). We also detected a positive effect of P-TEFb on activated *GAL1*-HIV expression, which was strictly dependent on CycT1 and partially dependent on CDK9 (Figure S4C). We analyzed whether this second level of activation was mediated by the 5'HIV-TR, encoding the TAR RNA domain. As expected, Tat and P-TEFb were unable to enhance the expression of *GAL1*-HIVTARless (Figure 2C). This set of results suggests that the repressive role of the 5'HIV-TR and the TAR-dependent regulation of HIV-1 transcription can be functionally separated.

Genetic Analysis of the 5'HIV-TR Repressive Function

We then analyzed the expression of Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless in a selected group of mutants related to the elongation step of transcription. The results of these analyses are shown in Figure S5 and 3A. Some of the mutants tested, such as *svi2Δ*, lacking a subunit of the SWI-SNF chromatin remodeling complex, *set1Δ*, affecting the COMPASS histone-methylation complex, or *ripd3Δ*, lacking one of the main histone deacetylases, did not produce a significant effect on the expression of any of the

two chimeric transcription units. We concluded that these factors do not contribute significantly to either elongation through the 5'HIV-TR or Ty1 promoter activity.

Some other mutants, such as *pag1Δ*, lacking the main subunit of the PAF1 complex; *spt2-150*, affected in a HMG component of yeast chromatin; those affecting the SAGA complex (*gen5Δ*, *spt3Δ*, *spt8Δ*), or those lacking elements of cyclin-dependent kinases involved in transcription (*bur2Δ*, *clk1Δ*) produced a negative effect on the expression of both Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless (Figure S5). The simplest interpretation of these results is that this set of factors is required for the basal activity of the Ty1 promoter and/or for transcription elongation through both Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless. In any case, it seems that these factors are not related to the repressive effect of the 5'HIV-TR.

The absence of Isw1, the catalytic subunit of the ISW1 chromatin remodeling complexes, stimulated the expression of both Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless (Figure S5). This result is fully consistent with the described role of Isw1 in inhibiting Ty1 expression [30]. A similar result was obtained with the *ioc2Δ* mutant, lacking one of the subunits of the ISW1b complex. However, the absence of Ioc3 or Ioc4, belonging to the ISW1a and ISW1b complexes respectively, enhanced the expression of Ty1-HIV but decreased that of Ty1-HIVTARless (Figure S5). These results confirm the intricacy of the roles played by the ISWI complexes [31] and might suggest their involvement in the

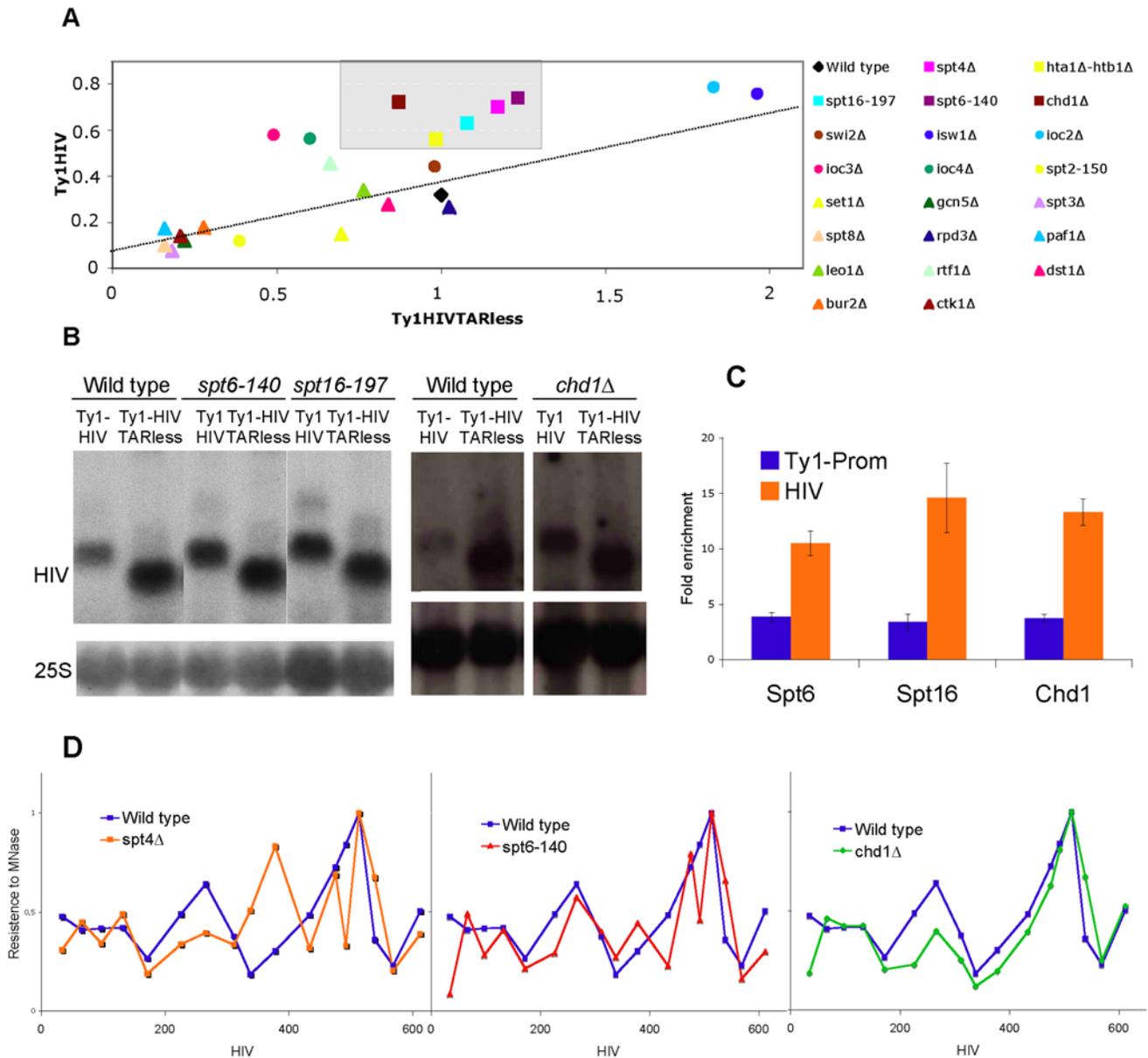


Figure 3. Genetic analysis of the 5'HIV-TR inhibitory effect. (A) The inhibitory role of the 5'HIV-TR is compromised in mutants affecting co-transcriptional chromatin reassembly. mRNA samples of the indicated mutants, transformed with pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless, were analyzed by Northern blot, as in Figure 1A. Averages of three independent experiments (see Figure S5) were plotted. Dashed line represents all possible variations of mRNA levels that maintain the Ty1HIV/Ty1HIVTARless proportion of the wild type. The grey square covers all points with a level of Ty1HIV mRNA significantly higher than the wild type (more than two standard deviations), but with a similar level of Ty1HIVTARless mRNA that the wild type (within two standard deviations). (B) Representative Northern blots, comparing the mRNA levels of Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless, in *spt6-140* (FY137), *spt16-197* (FY348), *chd1Δ* and their respective isogenic wild-type strains (FY120 and BY4741). (C) ChIP analysis of Spt6, Spt16 and Chd1. SJY25, DBY871 and DBY969 strains, transformed with pTy1-HIV, were grown to mid-log phase. Cross-linked chromatin was immunoprecipitated and quantified by real-time PCR as described in Materials and Methods. Averaged fold enrichments of three independent experiments, relative to an untranscribed telomeric region, are shown. (D) Chromatin configuration of the 5'HIV-TR in *spt4Δ*, *spt6-140* and *chd1Δ*. Averages of three independent experiments are shown. Experimental details as in Figure 1D. doi:10.1371/journal.pgen.1000339.g003

repressive effects of the 5'HIV-TR, but are difficult to interpret properly without further research.

A last group of mutants included *chd1Δ*, lacking a chromodomain protein involved in transcription elongation; *spt16-197*, affecting one of the subunits of the FACT elongation factor; and *spt6-140*, encoding a defective form of a factor related to chromatin and mRNA transactions during elongation [32–34]. Both *SPT16* and *SPT6* are essential genes and, like *CHD1*, are

involved in the reassembly of chromatin during transcription elongation [35]. Strong functional interactions have been detected amongst these three genes [36–38]. This group of mutants did not significantly affect the expression of Ty1-HIVTARless but did increase the levels of Ty1-HIV mRNA, a phenotype very similar to that of *spt4Δ* (Figure 3A, 3B and S5).

Spt16, FACT and Chd1 are general chromatin factors that are associated with actively transcribed regions in all eukaryotes

investigated so far [39–41]. Since they seemed to play a role in the weakly transcribed Ty1-HIV, we tested the presence of these factors on this transcription unit by ChIP. We found significant enrichments for the three proteins on Ty1-HIV (Figure 3C). In all three cases, the enrichment was higher on the transcribed region than on the promoter, confirming the well-known connection of these factors with transcription elongation.

These results suggest that the repressive function of the 5'HIV-TR depends on chromatin reassembly. To further corroborate this hypothesis, we analyzed the expression of Ty1-HIV and Ty1-HIVTARless in *hta1Δ-htb1Δ*, a mutant suffering from a deficit of H2A and H2B histones. The expression of Ty1-HIVTARless was not significantly affected in this mutant, whereas the mRNA levels of Ty1-HIV showed a clear increase (Figure 5S). Thus, *hta1Δ-htb1Δ* grouped with *spt4Δ* and the three chromatin-reassembly mutants (Figure 3A).

In order to verify that this group of mutants was indeed affecting the chromatin structure of Ty1-HIV, we analyzed nucleosome positioning on Ty1-HIV in some of the mutants (Figure 3D). *spt4Δ* caused a general alteration of nucleosome positioning on the transcribed region of Ty1-HIV, clearly affecting nucleosomes 1, 2 and 3. In the overlapping region, this pattern was very similar to the one exhibited by Ty1-HIVTARless in the wild type (Figure 1D). *spt6-140* also showed a less positioned pattern than the wild type, although in this case nucleosome 2 was almost unaffected. In turn, *chd1Δ* almost eliminated the signal corresponding to nucleosome 2 without significantly affecting the other two nucleosomes (Figure 3D).

Chromatin Reassembly Factors Contribute to Repressing HIV-1 Basal Transcription in Human Cells

In order to investigate whether chromatin reassembly factors really do play a role in the repression of HIV-1 basal transcription in human cells, we knocked down the expression of human Spt6 and Chd1 in HIV latently infected cells. A model of HIV-1 latency in Jurkat cells infected with an HIV minigenome encoding Tat and GFP has been previously reported [42]. Upon infection, latent cells are defined as those that do not express constitutively GFP, but need further stimuli of HIV promoter by mitogens (PMA) or cytokines (TNF- α). After removal of stimuli, the HIV promoter becomes repressed again and GFP-negative cells can be purified and maintained as a population; alternatively, individual cells representing unique latent viral integrations can be cloned. These cells are useful for investigating maintenance of HIV promoter repression and viral latency. We hypothesized that, if chromatin reassembly factors were involved in HIV promoter repression, its depletion would cause gene reactivation.

We used lentiviral shRNA expression vectors to deplete Spt6 and Chd1 in HIV latently infected cell populations (Figure 4A). 10–15 days after shRNA infection and puromycin selection, the percentage of Spt6 and Chd1 knocked-down cells expressing GFP reached ca. 5%, a significantly higher proportion that obtained with a control shRNA vector (Figure 4B). Because the latently-infected cell population is heterogeneous, representing a myriad of HIV integrations at different genome locations and chromatin environments, only a small proportion of latent HIV provirus are activated by solely depleting these factors. A similar degree of reactivation was obtained with an shRNA against YY1, a host transcription factor previously reported to be involved in histone deacetylase (HDAC) recruitment and HIV promoter repression [43,44] (Figure 4B). The HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) activates the HIV promoter in ca. 9.5% of the latently-infected cell population, indicating again that not all HIV integrations are

equally sensitive to the inhibition or depletion of a repressive chromatin factor (data not shown).

Next, we investigated the effect of Spt6 and Chd1 depletion on HIV expression in particular clones containing single latent integrations either in centromeric alphoid repeats (clones H2 and C1), an intergenic region (clone A1) or in an intron of the highly transcribed gene UBXD8 (clone 27) [42] (and unpublished results). The percentage of reactivated cells varied depending upon the clones, reaching ca. 30% reactivation in clone 27 after knocking-down Spt6 (Figure 4C and 4D). Reactivation by TSA is also dissimilar between clones, ranging from 27% in clone C1 to 47% in clone 27 (Figure 4C and data not shown). Similarly, Spt6 and Chd1 depletion promoted reactivation of the silent HIV promoter in a newly-generated model of HIV latency in HeLa cells (Figure S6). Moreover, these effects were observed with several different shRNA sequences and correlated well with the degree of target protein depletion achieved, discarding unspecific off-target effects (Figure S6). Altogether, our data indicates that these two chromatin reassembly factors identified in the yeast screening contribute to maintain HIV repression in infected human cells.

Discussion

In this work we have made use of yeast genetic analysis to investigate the influence of the 5'HIV-TR on basal transcription. Several attempts to study HIV-1 transcription in yeast have been described, all of them focused in the transactivation capacity of Tat. Although a fusion of Tat with the DNA binding domain of Gal4 can activate the *GALI* promoter [45], no Tat-dependent transactivation of the HIV-1 LTR had yet been achieved [25]. Therefore, the present work is the first successful reconstruction in yeast of a transcriptional system based on HIV-1 elements.

The artificial character of the Ty1-HIV transcription unit raises the possibility of the conclusions extracted from this work being of no relevance for HIV-1 biology. Several results presented in this piece of research argue against that point of view. We show that the 5'HIV-TR not only represses transcription driven by the Ty1 promoter but can also act on a completely different promoter (*GALI*) when this is weakly active. We also show that the 5'HIV-TR induces an accumulation of RNAPol II immediately downstream of the promoter, a very common situation throughout the human genome but extremely infrequent in yeast [46]. It has been recently proposed that the reason for this difference is the chromatin organization of the transcription start site, which is usually covered by a positioned nucleosome in yeast and immediately upstream of a positioned nucleosome in most metazoan genes [47]. We show in this work that the chromatin organization of the HIV fragment present in Ty1-HIV closely resembles the distribution of positioned nucleosomes of HIV-1 proviruses in the human genome. We also present evidence that transcription through the 5'HIV-TR in yeast is influenced by factors that have been previously shown to govern HIV-1 transcription elongation: yDSIF contributes to the repressive role of the 5'HIV-TR in basal transcription, whereas Tat and P-TEFb enhance active transcription in a 5'HIV-TR-dependent manner. Finally, the main conclusion of the genetic analysis, which is the involvement of chromatin reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription, has been confirmed in a human model of HIV-1 latency. Based on these considerations, we believe that the chimeric yeast-HIV system is a valid complementary tool for HIV research.

The role of the 5'HIV-TR in basal transcription has scarcely been studied, and the data available is sometimes contradictory [48,49], likely due to the use of transiently transfected DNA, which does not ensure a proper organization of DNA in chromatin [50]. In fact, mutation in this region produced different effects on HIV-

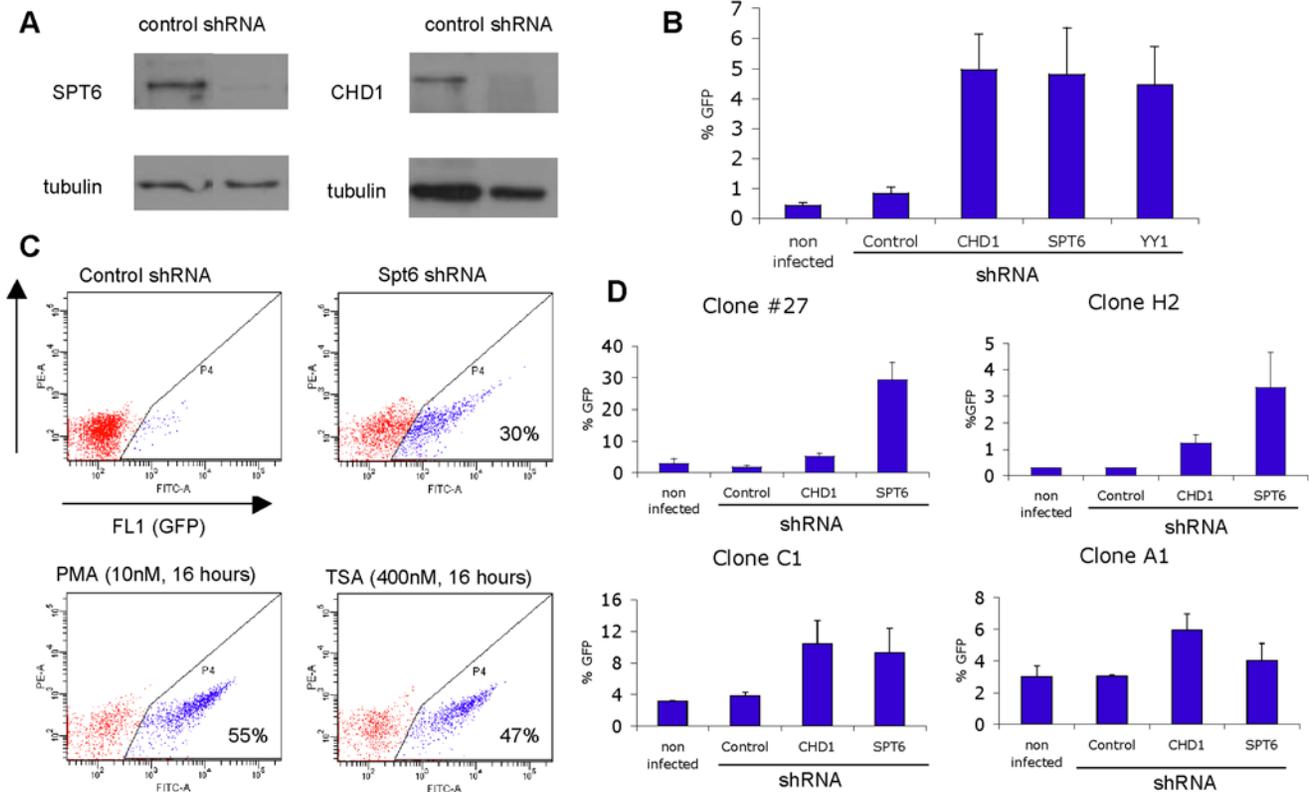


Figure 4. shRNA-mediated depletion of chromatin reassembly factors hSpt6 and hChd1 in Jurkat cells derepress latently-integrated HIV. (A) shRNA-mediated depletion of SPT6 and CHD1. A population of HIV (LTR-Tat-IRES-GFP-LTR) latently-infected human cells was infected with Control, Spt6 (#1, target sequence CGCCTTGACTGTGAATTAT) or Chd1 (#3, GCAGTTGTGATGAAACAGAAT) shRNA expression lentiviruses (pLKO.1-Puro) and, 10 days after puromycin (2 mg/ml) selection, depletion of these factors was tested in Western blot with specific antibodies and tubulin as a loading control. (B) HIV reactivation in a heterogeneous population of HIV latently infected Jurkat cells, expressed as percentage of cells that become GFP-positive 10–15 days after infection with the indicated shRNA-expressing lentiviruses and continuous selection with puromycin. Values represent the mean \pm SD of three independent infection experiments. (C) Example of FACS analysis of GFP expression as a result of HIV promoter reactivation in a latently infected Jurkat clone after infection with a Spt6 specific shRNA-expressing vector or treatment with PMA (10 nM for 16 h) or TSA (400 nM for 16 h). The percentage of GFP-positive cells is indicated inside the corresponding gate. (D) HIV reactivation in individual cell clones. Four different clones containing single HIV latent integrations previously mapped were infected with the indicated shRNA-expressing lentiviruses, selected by puromycin treatment, and GFP expression was monitored by FACS over time. Values represent the mean \pm SD of percentage of GFP-positive cells of two independent experiments 10–15 days after infection. doi:10.1371/journal.pgen.1000339.g004

1 transcription when an integrated version was compared to a transiently transfected one [51,52].

The data shown in the present work indicates that the 5'HIV-TR contributes to maintaining low levels of basal transcription without interfering with promoter activation. The genetic analysis that we have performed shows a contribution of chromatin reassembly factors to this repressive function of the 5'HIV-TR. We have also confirmed that Spt6 and Chd1 favor a close chromatin configuration on the transcribed region of Ty1-HIV. The role of chromatin reassembly factors at this level seems to be as significant as the one played by DSIF, since the combination of the chromatin alterations produced by *spt6-140* and *chd1Δ* fully matches those caused by *spt4Δ*. Deletion of the 5'HIV-TR causes a disruption of nucleosome positioning on the rest of the HIV fragment present in Ty1-HIVTARless, mimicking the patterns of *spt4Δ* and, to a lesser extent, of *spt6-140*. It is possible that this chromatin difference between the two transcription units is a consequence of the higher transcription level of Ty1-HIVTARless. Alternatively, the absence of the +1 nucleosome may destabilize the overall chromatin configuration and this would, in turn, give rise to increased transcriptional activity. The differences in the chromatin patterns of *spt4Δ*, *spt6-140* and *chd1Δ*, all showing

similar levels of expression, indicate that the chromatin differences are likely to be responsible for the transcription increase and not vice versa. This explanation also fits better with the accumulation of RNAPolII on the 5'HIV-TR and with the results of our genetic analysis. In this scenario, productive elongation would be infrequent under non-activating conditions due to both the low number of initiation events and the positioned nucleosomes sitting on the 5'HIV-TR but, in those rare occasions when RNAPol II gets through the chromatin boundary, the immediate action of chromatin reassembly factors (recruited by elongating RNAPolII itself) would contribute to rebuilding the repressive chromatin configuration, avoiding a transition into an activation-prone chromatin environment (Figure 5A).

Several chromatin-mediated mechanisms contribute to regulating HIV-1 transcription [8]: the activation of the LTR promoter is mediated by the acetylation state of its chromatin, especially by the nucleosome located upstream in the LTR (nucleosome 0) [10]. An additional role of chromatin in regulating HIV-1 transcription takes place at the level of early elongation, since the positioned nucleosome covering the 5'HIV-TR (nucleosome 1) becomes remodeled in response to promoter activation, in a transcription-independent manner [11].

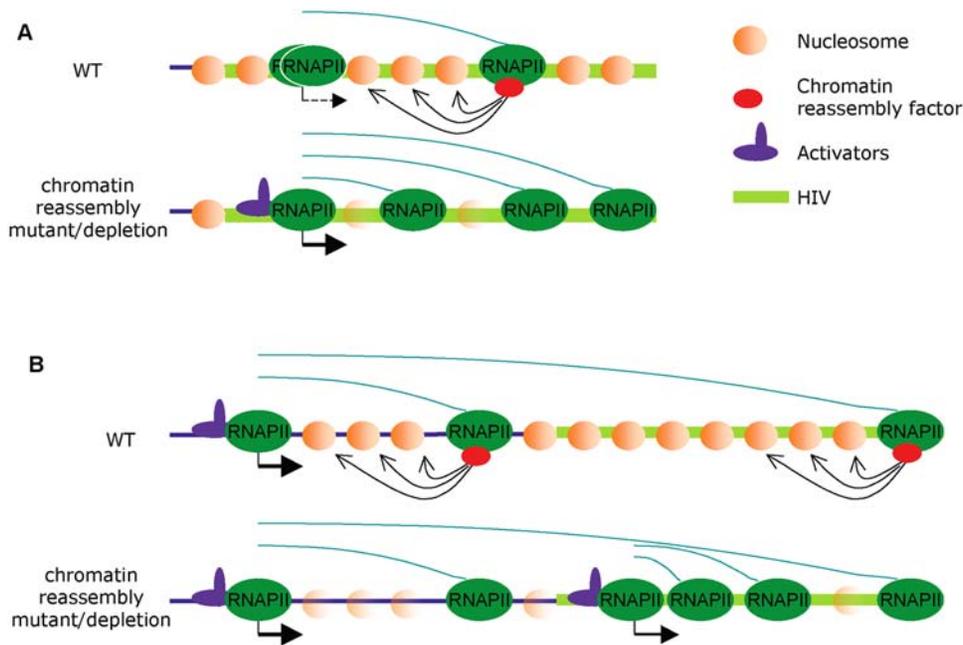


Figure 5. A model for the contribution of chromatin reassembly factors to the repression of HIV basal transcription. (A) Chromatin reassembly factors, recruited by the elongating form of RNAPol II, stabilize nucleosomes on the transcribed region, keeping basal transcription at low rates. In the absence of chromatin reassembly factors, nucleosomal configuration of the transcribed region becomes unstable, increasing basal transcription and eventually favoring promoter activation. (B) Chromatin reassembly factors may also contribute to the silencing of HIV by transcriptional interference. HIV proviruses integrated in highly expressed genes would remain untranscribed due to the repressive chromatin configuration established by chromatin reassembly factors during transcription elongation. In the absence of chromatin reassembly factors, nucleosomes repressing the 5'-LTR become unstable, allowing transcription factors to activate the HIV promoter. doi:10.1371/journal.pgen.1000339.g005

Although transcription of Ty1-HIV is more intensively repressed by chromatin reassembly factors than Ty1-HIV^{TARless}, we do not believe that the 5'HIV-TR is specifically required for their recruitment. Spt6, FACT and Chd1 are general elongation factors, whose association to actively transcribed regions, in an RNA polymerase II-dependent manner, is well documented from yeast to metazoa [33,38–41,53–55]. We favour the idea of the 5'HIV-TR being an optimal DNA sequence for nucleosome positioning. Recent genome-wide studies show the importance of 5' sequences in specifying the location of +1 nucleosomes. In turn, these act as barriers against which other nucleosomes are packed [56]. In such a DNA context the repressive action of chromatin reassembly factors would be maximal.

Basal transcription of HIV-1 is highly dependent on the chromatin environment of integration sites [21]. Nevertheless, mutations affecting the sequences located at the 3' border of nucleosome 1, which increase its stability, produce a general reduction in basal transcription, irrespective of the integration site [57]. In contrast, the deletion of 60 nucleotides within the sequence covered by this nucleosome, which presumably destabilize it, makes basal transcription even more dependent on the integration site than the wild type [57]. This data is fully compatible with our yeast results and provides support for chromatin configuration playing a role in repressing HIV-1 transcription at the level of early elongation. A similar mechanism has been reported for the human *hsp70* gene [58], where the repressive chromatin configuration covering its transcribed region becomes remodeled during activation, allowing poised RNAPolIII to complete elongation [59].

The most relevant conclusion of our genetic analysis is the involvement of chromatin-reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription. We have confirmed that their function is not

restricted to our chimeric yeast-HIV system but they are also playing a role in HIV-1 basal transcription in human cells. It has been reported that integration into regions of compacted chromatin, i.e. centromeric heterochromatin, causes HIV promoter inactivity, probably due to the inaccessibility of the basal transcriptional machinery or the inability of transcription factors to overcome the repressive chromatin state imposed [42]. In the latent integrations, this repressive state can be overcome by exogenous stimulation with mitogens or cytokines. We have found that, by knocking-down Spt6 and Chd1, the HIV promoter integrated in the context of latency increases its level of expression.

When we deplete Spt6 or Chd1 from the heterogeneous population of HIV latently infected cells, only a small proportion of integrant promoters are activated. This indicates that only a subset of integrations are either negatively regulated by these factors, or able to be reactivated by solely depleting them. In some chromatin environments, transcription may be completely inhibited, such that chromatin disruption by basal transcription would not be an issue and chromatin reassembly factors would play no role. Similarly, TSA treatment and YY1 depletion are not able to reactivate all latent integrations. We had predicted that individual integrations would have a more consistent response to the depletion of reassembly factors. In fact, we observed that individual clones responded differently, both amongst themselves and to the two distinct shRNAs. Still, not all cells of a clonal population respond equally. This behavior is also observed in response to TSA and resembles position effect variegation [42].

Depletion of Spt6 and Chd1 may cause a deficit of chromatin reassembly in those rare events, during non-activated conditions, in which RNAPolII would be able to overcome the chromatin barrier (Figure 5A). This chromatin change would facilitate additional rounds of transcription under non-activating conditions

and, eventually, an increase in transcription factor loading and PIC assembly. If transcription were enough to produce some Tat protein, then promoter activity would be reinforced. Inhibition of HDAC activity with TSA has a similar effect, supporting the idea that discrete modifications of chromatin compactness may be sufficient to switch a repressed provirus to active.

It has been shown absence of chromatin reassembly factors in yeast provokes activation of cryptic promoters located in the body of transcribed genes. In the absence of transcription, no PIC assembles on these cryptic promoters, due to the inhibitory action of chromatin; under active transcription, chromatin reassembly factors ensure rapid nucleosome deposition after RNAPol II passage, avoiding the activation of cryptic promoters [54,60]. HIV proviruses integrated in highly transcribed genes are usually latent [61]. Several mechanisms of transcriptional interference have been proposed to explain this phenomenon [62]. It has been shown that read-through transcription from an upstream promoter can interfere with HIV transcription by disturbing PIC assembly [63]. Recent published evidence indicates that transcriptional interference is caused by the elongating form of RNA pol II, transcribing through the latent HIV copy [64,65]. This situation parallels that of yeast cryptic promoter and, accordingly, it is likely that chromatin reassembly factors also play an important role in maintaining HIV latency by transcriptional interference (Figure 5B). The integration site of one of the individual clones tested in our depletion experiments (clon 27) is a highly transcribed gene. We found a clear reactivation of the latent HIV copy of this clone when chromatin reassembly factors were depleted. In fact, when Spt6 was depleted, this clone showed the maximal reactivation level reached in the whole set of experiments.

When taken together, our results indicate that Spt6 and Chd1 participate in the mechanism that controls the equilibrium between activation and repression of HIV-1 expression when the provirus is integrated in the human genome, which depends greatly on the chromatin environment of the integration site. Disturbance of this equilibrium, by depleting chromatin reassembly factors for example, makes some of the latent integrations become activated. These factors may also play a general role in repressing basal transcription throughout the human genome. Therefore, the specificity of chromatin reassembly factors in repressing viral basal transcription should be carefully evaluated before considering them as therapeutic targets against HIV-1 latency.

Materials and Methods

Yeast Strains, Plasmids, and Media

Yeast strains used are listed in Table S1 and are isogenic to the S288C derivative BY4741 [66]. Plasmids are described in Table S2. Yeast cells were grown following standard procedures [67].

Measurement of mRNA Levels

mRNA levels were measured by Northern analysis as described [29].

Western Blots

Laemmli boiled crude extracts were run on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nylon membranes (Hybond-ECL). After blocking with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% milk, proteins were detected using anti-FLAG antibodies (monoclonal, Santa Cruz) and human cyclin T1 (polyclonal, Santa Cruz) and peroxidase-conjugated goat anti-mouse and rabbit anti-goat IgG respectively. Blots were washed with tris-buffered saline and 0.1% Tween 20, and developed by enhanced chemiluminescence reactions (PIERCE). Signals were detected with Hyperfilms ECL (Amersham), exposing from 15 sec to 5 min.

Chromatin Immunoprecipitation Assays

ChIP analyses of Rpb1-Myc were performed using a monoclonal anti-cMyc antibody (9E10) as described previously [55]. For crosslinking, cells were treated with 1% formaldehyde for 15 min at room temperature. As a non-transcribed control, we amplified a region adjacent to *FUS1*. Primer mixes were empirically adjusted for balanced signals. Immunoprecipitation was defined as the ratio of each gene-specific product in relation to that of the non-transcribed region, always after normalization with the signal of its corresponding whole-cell extract. Several dilutions of the whole cell extract were tested to ensure that the assays were in the linear range.

Spt16-Myc, Spt6-HA and Chd1-HA abundances on Ty1-HIV were assayed as indicated, by using ChIP with monoclonal anti-cMyc (9E10) or anti-HA antibodies and protein A-Sepharose. We used 20- to 30-bp oligonucleotides for PCR amplification of fragments of the Ty1 promoter (positions -157 to -107, relative to the transcription start site) and the 5'HIV-TR (positions +102 to +162). Real-time quantitative PCR was performed with SYBR green dye in the 7500 Real Time PCR system of Applied Biosystems by following the manufacturer's instructions. A non-transcribed telomeric fragment was used to normalize the signals. No-antibody controls were performed to exclude unspecific amplification.

Chromatin Analysis

Yeast spheroplasts and micrococcal nuclease digestions were performed according to [68] with the modifications of [69]. Spheroplasts were prepared from mid-log phase cultures grown in SC-Ura with 2% glucose. Cells were lysed and immediately digested with 7.5 to 125 mU of micrococcal nuclease. Digested DNA was resolved in 1.5% agarose gels and analyzed by Southern blot with the probes indicated in Figure S2. Alternatively, DNA was quantified by real time PCR performed with SYBR green dye in a Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system, following the manufacturer's instructions. In order to correct for the sequence-specificity of MNase, naked-DNA samples digested with MNase were also quantified by real-time PCR. The chromatin/naked-DNA ratio was considered to be a valid estimation of chromatin-dependent resistance to MNase.

shRNA-Mediated Depletion of hSpt6 and hChd1 and HIV Expression Analysis

Pools or particular clones of Jurkat cells latently infected with an HIV-derived minigenome [42] were infected with Control, YY1, Spt6 or Chd1 shRNA-expressing lentiviruses (vector pLKO.1-Puro) obtained from Sigma (MISSION™ shRNAs). The protocol for viral particles production and cell infections has been described elsewhere [42]. Upon puromycin (2 mg/ml) selection of infected cells, HIV reactivation was followed by FACS analysis of GFP-positive cells. shRNA-mediated inhibition was tested by Western blot with specific anti-human YY1 antibodies (Santa Cruz sc-281), Spt6 (Abcam ab32820) and Chd1 (Abnova H00001105-A01). Anti-tubulin antibody was from Sigma.

A pool of latently infected HeLa cells was constructed as previously reported [42] and infected with several Spt6 and Chd1 shRNA-expressing vectors. Further details are described in the legend of the Figure S6.

Supporting Information

Figure S1 Inhibitory effect of the 5'HIV-TR on basal transcription in three different yeast genetic backgrounds. mRNA samples from three different wild-type yeast strains, transformed with plasmids pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless, were resolved in

agarose gels and analyzed by Northern blotting. Quantification of the signals is shown, after normalizing with the levels of 25S rRNA. Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s001 (2.90 MB TIF)

Figure S2 The 5'HIV-TR is protected against MNase digestion in yeast. Spheroplasts of BY4741 cells containing pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless were lysed and digested with increasing concentrations of MNase. After purification, DNA was resolved in agarose gels and hybridized with probes corresponding to the positions indicated in the diagram. The arrow points to the detected DNA fragments of subnucleosomal size. Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s002 (3.51 MB TIF)

Figure S3 Induction of Ty1 expression by 6-azauracil. Yeast cells of BY4741 and an isogenic strain lacking TFIIS (*dst1Δ*), transformed with the URA3-containing plasmid pRS416, were grown to mid-log phase in minimal medium without uracil. Samples were taken at the indicated times, after adding 6-azauracil (100 μg/ml). mRNA was extracted and analyzed by Northern blot with a Ty1 probe. Signals were normalized in accordance with the amounts of 25S rRNA. Averages of three independent experiments are shown. Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s003 (2.31 MB TIF)

Figure S4 Effect of P-TEFb on Gal1-HIV expression in the presence of Tat. (A) Expression of human cyclin T1 and human FLAG-CDK9 in yeast was verified by Western blot with anti-hCycT1 and anti-FLAG antibodies. (B) Expression of functional Tat in yeast was verified following a triple-hybrid strategy, according to Fraldi et al (J Cell Biochem 36: 247–253). Expression of *lacZ* was detected when Tat was expressed in the MVcoat-b yeast strain. (C) W303-1A cells transformed with plasmids pGAL1-HIV, alone or together with combinations of p415GPD-CycT1, p414GPD-Cdk9 and p413GPD-Tat, were grown to mid-log phase in minimal medium with glycerol and lactate as carbon sources, and incubated for 90 min in the presence of 2% galactose. mRNA samples were taken at different times and analyzed by Northern blot with an HIV probe. Signals were normalized in accordance with the amounts of 25S rRNA. Averages of four independent experiments are shown. Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s004 (14.57 MB TIF)

Figure S5 The inhibitory role of the 5'HIV-TR is compromised in mutants affecting co-transcriptional chromatin reassembly. mRNA samples of the indicated mutants, transformed with pTy1-HIV and pTy1-HIVTARless, were analyzed by Northern blot, as in Figure 1A. Averages of at least three different experiments are shown. Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s005 (3.28 MB TIF)

Figure S6 shRNA-mediated depletion of chromatin reassembly factors hSpt6 and hChd1 in a HeLa model of viral latency derepress the integrated HIV promoter. (A) Inducible HIV promoter in HeLa cells. HeLa cells were infected with a HIV minigenome, LTR-Tat-IRES-GFP-LTR. GFP-positive and GFP-negative cells were purified by cell sorting. Thereafter, GFP-negative cells were treated with TNFα overnight and resulting GFP-positive cells were purified to establish a population of latently infected cells. After several weeks in culture in the absence of TNFα, the majority of cells became GFP-negative. The response of this population to overnight treatment with PMA (10 nM), TSA (400 nM), TNFα (10 ng/ml), or a combination of

the three is shown as percentage of cells that became GFP-positive, in comparison to untreated cells. (B) shRNA-mediated depletion of Spt6 activates the HIV promoter. HIV latently infected HeLa cells were infected with Control or Spt6 (#1, target sequence CGCCTTGACTGTGAATTTAT)-shRNA expression lentivirus (pLKO.1-Puro, MISSION, Sigma). Upon puromycin (2 mg/ml) selection, depletion of this factor was tested in Western blot with specific antibodies and tubulin as a loading control (upper panel) and HIV reactivation was followed by FACS analysis of GFP-positive cells (lower panel). Spt6 depletion and HIV reactivation was observed at day 9 after infection, but was lost at day 19. (C) HIV reactivation is achieved with several different shRNAs against Spt6. As in (B), lentiviruses for two additional Spt6 shRNAs (#2, CCCTTGAAGAAATCTTGGAAA and #3, GCCCACCTTCATCCCTTATTT) were integrated into latently infected HeLa cells at two different multiplicities of infection (here called *low* and *high*, *high* being 9-fold higher than *low*). Analysis of Spt6 depletion by Western blot and of the percentage of HIV-reactivated cells was performed 9 days after infection. (D) shRNA-mediated depletion of Chd1 activates the HIV promoter. HIV latently infected HeLa cells were infected with Control or Chd1 (#1, GCGGTTTATCAAGAGCTATAA; #2, CCACTCT-TACTTCTCGGCAAA; #3, GCAGTTGTGATGAAACA-GAAT and #4, CCATCGTGATTGGGATCACTA)-shRNA expression lentiviruses (pLKO.1-Puro, MISSION, Sigma), at two different multiplicities of infection. Upon puromycin (2 mg/ml) selection, the repressive effect of these shRNAs was tested by RT-quantitative PCR with gene-specific oligonucleotides and GAPDH as a control (upper panel) and HIV reactivation was followed by FACS analysis of GFP-positive cells (lower panel). The two shRNAs with a stronger capability of knocking-down Chd1 promoted clearer reactivation of latent HIV.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s006 (26.14 MB TIF)

Table S1 Yeast strains.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s007 (0.12 MB DOC)

Table S2 Plasmids used in this work.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s008 (0.13 MB DOC)

Table S3 Primers for real-time PCR.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000339.s009 (0.11 MB DOC)

Acknowledgments

We are thankful to Miguel Beato for his support and scientific input, and to Juan José Infante for sharing his chromatin analysis protocol. We thank David Bentley, Katherine Jones, Luigi Lania, Francisco Luque and David Price for strains and plasmids.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MV EG AJ SC. Performed the experiments: MV EG IR ARG FGH SJG. Analyzed the data: MV EG AJ SC. Wrote the paper: AJ SC.

References

- Palangat M, Meier TI, Keene RG, Landick R (1998) Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol Cell* 1: 1033–1042.
- Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330: 489–493.
- Perkins KJ, Lusic M, Mitar I, Giacca M, Proudfoot NJ (2008) Transcription-dependent gene looping of the HIV-1 provirus is dictated by recognition of pre-mRNA processing signals. *Mol Cell* 29: 56–68.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92: 451–462.

5. Benkirane M, Chun RF, Xiao H, Ogryzko VV, Howard BH, et al. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 273: 24898–24905.
6. Brady J, Kashanchi F (2005) Tat gets the “green” light on transcription initiation. *Retrovirology* 2: 69.
7. Williams SA, Kwon H, Chen LF, Greene WC (2007) Sustained induction of NF-kappa B is required for efficient expression of latent human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 81: 6043–6056.
8. Quivy V, De Walque S, Van Lint C (2007) Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell Biochem* 41: 371–396.
9. Sadowski I, Lourenco P, Malcolm T (2008) Factors controlling chromatin organization and nucleosome positioning for establishment and maintenance of HIV latency. *Curr HIV Res* 6: 286–295.
10. Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M (2003) Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J* 22: 6550–6561.
11. Verdin E, Paras P Jr, Van Lint C (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J* 12: 3249–3259.
12. Agbottah E, Deng L, Dannenberg LO, Pumfery A, Kashanchi F (2006) Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription. *Retrovirology* 3: 48.
13. Mahmoudi T, Parra M, Vries RG, Kauder SE, Verrijzer CP, et al. (2006) The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* 281: 19960–19968.
14. Treand C, du Chene I, Bres V, Kiernan R, Benarous R, et al. (2006) Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *EMBO J* 25: 1690–1699.
15. Vardabasso C, Mangano L, Lusic M, Marcello A, Giacca M (2008) The histone chaperone protein Nucleosome Assembly Protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology* 5: 8.
16. Klatt A, Zhang Z, Kalantari P, Hankey PA, Gilmour DS, et al. (2008) The receptor tyrosine kinase RON represses HIV-1 transcription by targeting RNA polymerase II processivity. *J Immunol* 180: 1670–1677.
17. de la Vega L, Sanchez-Duffhues G, Fresno M, Schmitz ML, Munoz E, et al. (2007) The 73 kDa subunit of the CPSF complex binds to the HIV-1 LTR promoter and functions as a negative regulatory factor that is inhibited by the HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* 372: 317–330.
18. Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E (1996) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J* 15: 1112–1120.
19. Tyagi M, Karn J (2007) CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *EMBO J* 26: 4985–4995.
20. du Chene I, Basyuk E, Lin YL, Triboulet R, Knezevich A, et al. (2007) Suv39H1 and HPIgamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J* 26: 424–435.
21. Jordan A, Defechereux P, Verdin E (2001) The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* 20: 1726–1738.
22. Yoshizuka N, Yoshizuka-Chadani Y, Krishnan V, Zeichner SL (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol* 79: 11366–11381.
23. Parissi V, Caumont A, Richard de Soultrait V, Dupont CH, Pichuanes S, et al. (2000) Inactivation of the SNF5 transcription factor gene abolishes the lethal phenotype induced by the expression of HIV-1 integrase in yeast. *Gene* 247: 129–136.
24. Nissley DV, Garfinkel DJ, Strathern JN (1996) HIV reverse transcription in yeast. *Nature* 380: 30.
25. Daviet L, Bois F, Battisti PL, Gatignol A (1998) Identification of limiting steps for efficient trans-activation of HIV-1 promoter by Tat in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 28219–28228.
26. Morillon A, Benard L, Springer M, Lesage P (2002) Differential effects of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual yeast Ty1 retrotransposons. *Mol Cell Biol* 22: 2078–2088.
27. Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, et al. (1998) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12: 343–356.
28. Todeschini AL, Morillon A, Springer M, Lesage P (2005) Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25: 7459–7472.
29. Chavez S, Aguilera A (1997) The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev* 11: 3459–3470.
30. Kent NA, Karabetou N, Politis PK, Mellor J (2001) In vivo chromatin remodeling by yeast ISWI homologs Isw1p and Isw2p. *Genes Dev* 15: 619–626.
31. Morillon A, Karabetou N, O’Sullivan J, Kent N, Proudfoot N, et al. (2003) Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* 115: 425–435.
32. Adkins MW, Tyler JK (2006) Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol Cell* 21: 405–416.
33. Yoh SM, Cho H, Pickle L, Evans RM, Jones KA (2007) The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iwsl-dependent mRNA splicing and export. *Genes Dev* 21: 160–174.
34. Morillo-Huesca M, Vanti M, Chavez S (2006) A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *FEBS J* 273: 756–769.
35. Williams SK, Tyler JK (2007) Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly. *Curr Opin Genet Dev* 17: 88–93.
36. Biswas D, Dutta-Biswas R, Stillman DJ (2007) Chd1 and yFACT act in opposition in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 27: 6279–6287.
37. Lindstrom DL, Squazzo SL, Muster N, Burckin TA, Wachter KC, et al. (2003) Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* 23: 1368–1378.
38. Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, et al. (2002) RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol* 22: 6979–6992.
39. Kaplan CD, Morris JR, Wu C, Winston F (2000) Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev* 14: 2623–2634.
40. Saunders A, Werner J, Andrusis ED, Nakayama T, Hirose S, et al. (2003) Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* 301: 1094–1096.
41. Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, et al. (2003) Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J* 22: 1846–1856.
42. Jordan A, Biggrove D, Verdin E (2003) HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 22: 1868–1877.
43. Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, et al. (2000) The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol* 74: 6790–6799.
44. He G, Margolis DM (2002) Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol* 22: 2965–2973.
45. Southgate CD, Green MR (1995) Delineating minimal protein domains and promoter elements for transcriptional activation by lentivirus Tat proteins. *J Virol* 69: 2605–2610.
46. Wade JT, Struhl K (2008) The transition from transcriptional initiation to elongation. *Curr Opin Genet Dev* 18: 130–136.
47. Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, et al. (2008) Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453: 358–362.
48. Hauber J, Cullen BR (1988) Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 62: 673–679.
49. Selby MJ, Bain ES, Luciw PA, Peterlin BM (1989) Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev* 3: 547–558.
50. Candau R, Chavez S, Beato M (1996) The hormone responsive region of mouse mammary tumor virus positions a nucleosome and precludes access of nuclear factor I to the promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57: 19–31.
51. Berkhout B, Jeang KT (1991) Detailed mutational analysis of TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res* 19: 6169–6176.
52. Klaver B, Berkhout B (1994) Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol* 68: 3830–3840.
53. Andrusis ED, Guzman E, Doring P, Werner J, Lis JT (2000) High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev* 14: 2635–2649.
54. Mason PB, Struhl K (2003) The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol* 23: 8323–8333.
55. Jimeno-Gonzalez S, Gomez-Herreros F, Alepuz PM, Chavez S (2006) Gene-specific requirement for FACT during transcription is related to the chromatin organization of the transcribed region. *Mol Cell Biol* 26: 8710–8721.
56. Mavrich TN, Ioshikhes IP, Venters BJ, Jiang C, Tomsho LP, et al. (2008) A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* 18: 1073–1083.
57. el Kharroubi A, Martin MA (1996) cis-acting sequences located downstream of the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 16: 2958–2966.
58. Brown SA, Imbalzano AN, Kingston RE (1996) Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev* 10: 1479–1490.
59. Petesch SJ, Lis JT (2008) Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell* 134: 74–84.
60. Kaplan CD, Laprade L, Winston F (2003) Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301: 1096–1099.
61. Lewinski MK, Biggrove D, Shinn P, Chen H, Hoffmann C, et al. (2005) Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol* 79: 6610–6619.

62. Bisgrove D, Lewinski M, Bushman F, Verdin E (2005) Molecular mechanisms of HIV-1 proviral latency. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 805–814.
63. Greger IH, Demarchi F, Giacca M, Proudfoot NJ (1998) Transcriptional interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter. *Nucleic Acids Res* 26: 1294–1301.
64. Han Y, Lin YB, An W, Xu J, Yang HC, et al. (2008) Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough. *Cell Host Microbe* 4: 134–146.
65. Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM (2008) Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe* 4: 123–133.
66. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, et al. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115–132.
67. Rose MD, Winston F, Hieter P (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
68. Fedor MJ, Kornberg RD (1989) Upstream activation sequence-dependent alteration of chromatin structure and transcription activation of the yeast GAL1-GAL10 genes. *Mol Cell Biol* 9: 1721–1732.
69. Chavez S, Candau R, Truss M, Beato M (1995) Constitutive repression and nuclear factor I-dependent hormone activation of the mouse mammary tumor virus promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 6987–6998.

