

Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado

El efecto antirretroviral de APOBEC3G depende de su actividad citidina deaminasa y de su abundancia

Título para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Carolina Ingrid Allers Hernández

Profesor es: Dra. Paulette Conget

Santiago, Chile 2009

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/me-brito_m/pdfAmont/me-brito_m.pdf

Resumen . .	4
Disponible a texto completo . .	6

Resumen

Cuando APOBEC3G se expresa en una célula infectada por el VIH es empaquetada en las partículas virales. Durante la infección de una nueva célula APOBEC3G permanece asociada a la maquinaria de transcripción reversa y durante la síntesis de la primera hebra de cDNA, dada su actividad citidina deaminasa, genera una gran cantidad de cambios de citidina a uridina con lo cual el DNA viral rico en uridinas es degradado o se genera un provirus hipermutado que no se replica. Por esto, APOBEC3G ha sido descrita como una enzima celular antiviral. Sin embargo, el VIH presenta un mecanismo de defensa: la proteína Vif, la cual se une a APOBEC3G y forma un complejo que recluta proteínas celulares que gatillan la ubiquitinación de APOBEC3G y en consecuencia su degradación.

La estructura de APOBEC3G está formada por un dominio helicoidal corto, seguido por un dominio catalítico (sitio activo, AS), un péptido de unión y un dominio pseudocatalítico, en esta enzima esta estructura básica se encuentra duplicada. Se ha descrito que AS1 participaría en su empaquetamiento en las partículas virales y AS2 en la catálisis.

Hasta la fecha el requerimiento de la actividad citidina deaminasa de APOBEC3G para su efecto antirretroviral es un tema controversial. Por un lado, se ha propuesto un mecanismo antirretroviral independiente de la actividad citidina deaminasa. Sin embargo, en esos trabajos las partículas virales fueron cargadas con APOBEC3G, o mutantes catalíticamente inactivas, mediante ensayos de cotransfección, por lo tanto no representan las condiciones en que APOBEC3G restringe la replicación del VIH-1 \square *vif in vivo*. Por otro lado, otros grupos proponen que mutantes de APOBEC3G catalíticamente inactivas no presentan ningún efecto sobre la replicación viral, pero en esos trabajos no se alcanzó el nivel fisiológico de expresión de APOBEC3G, por lo cual la ausencia de inhibición podría haber estado dada por un bajo número de moléculas empaquetadas. El alto número de transiciones G \square A encontradas en virus no replicativos aislados de pacientes sugiere que a niveles fisiológicos de expresión de APOBEC3G el efecto antirretroviral de esta enzima requiere de su actividad citidina deaminasa.

Para evaluar esta hipótesis se generaron modelos celulares que expresaban establemente las moléculas catalíticamente activas hA3G o AS1, o las mutantes catalíticamente inactivas AS2 o AS1/AS2. A partir de ellos se seleccionaron clones que expresaban distintos niveles de hA3G o sus mutantes y se utilizaron para generar partículas virales cargadas con distintos niveles de estas enzimas y evaluar su efecto sobre la infectividad y replicación del VIH-1 \square *vif*.

Para evaluar el efecto sobre la infectividad del VIH-1 \square *vif* se produjeron virus reporteros en clones de células HEK 293T que expresaban distintos niveles de hA3G o sus mutantes, con ellos se infectaron células HOS.X4.T4 o GHOST-X4R5 y se cuantificó la actividad luciferasa o la expresión de GFP, respectivamente, como indicador de infectividad. Se observó que a niveles fisiológicos de expresión, hA3G y la mutante AS1 inhibieron la infectividad del VIH 1 \square *vif*.

Sin embargo, las mutantes AS2 y AS1/AS2, carentes de actividad citidina deaminasa, no inhibieron la infectividad del VIH-1 \square *vif*. Este resultado se mantuvo en virus cargados con altos niveles de AS1/AS2. Por lo tanto, a niveles fisiológicos o altos de expresión la inhibición de la infectividad del VIH-1 \square *vif* por APOBEC3G depende de su actividad

citidina deaminasa. Por otro lado, se observó que virus Δ *vif* cargados con bajos niveles de hA3G eran capaces de infectar las células blanco. Es decir, existe una relación de dosis dependencia entre la magnitud de la inhibición de la infectividad y el nivel de expresión de hA3G.

Además, se evaluó el efecto de hA3G y sus mutantes sobre la replicación del VIH-1 Δ *vif*. Para ello, clones de células CEM-SS, que expresaban distintos niveles de hA3G o sus mutantes, se infectaron alternativamente con el virus silvestre o con el virus Δ *vif*. Como indicador de replicación viral se cuantificó la proteína viral p24 en el sobrenadante cada 2 días. Se observó que en presencia de niveles fisiológicos de hA3G o AS1 se inhibe la replicación del VIH 1 Δ *vif*.

En cambio, independientemente de su nivel de expresión, las mutantes AS2 y AS1/AS2 no fueron capaces de inhibir la replicación del VIH-1 Δ *vif*. Por otro lado, se observó que a niveles bajos de expresión de hA3G o AS1 disminuye la inhibición de la replicación del VIH-1 Δ *vif*.

Por lo tanto, efecto antirretroviral de APOBEC3G sobre la infectividad y replicación del VIH- 1D *vif* depende de su actividad citidina deaminasa y de su abundancia.

Disponible a texto completo

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/me-brito_m/pdfAmont/me-brito_m.pdf