

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

**Citopaticitat de la glicoproteïna de l'embolcall del VIH-1.  
Mecanismes directes i indirectes i implicació en la  
progressió clínica.**

Marta Curriu Martí

Institut de Recerca de la Sida, IrsiCaixa  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

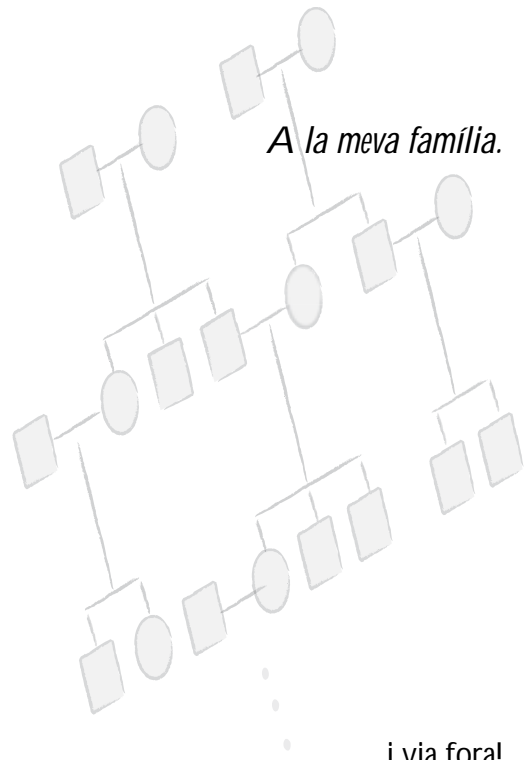
Memòria de la tesi presentada per obtenir el grau de Doctor en Immunologia  
per la Universitat Autònoma de Barcelona  
Setembre de 2012

Directors: Dr. Julià Blanco Arbués

Dra. Cecília Cabrera Navarro

Tutora: Dra. Marta Vives Pi





*A la meva família.*

*...i via foral!*

Que tot està per fer i tot és possible.

*Miquel Martí i Pol*



## ABREVIACIONS

<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>AIQ</b>	Amplitud interquartílica.
<b>APAF-1</b>	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	ARN missatger
<b>Atg</b>	<i>Autophagy-related genes</i>
<b>ATCC</b>	<i>American type culture Collection</i>
<b>CAp24</b>	Proteïna de la càpsida
<b>CDC</b>	<i>Center for disease control</i>
<b>CMSP</b>	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CPI</b>	Complex de preintegració
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
<b>CV</b>	Càrrega viral
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DC</b>	Domini citoplasmàtic
<b>DD</b>	<i>Death domain</i>
<b>DDAO</b>	<i>Dichloro-dimethylacridin-one</i>
<b>DED</b>	<i>Death-effector domain</i>
<b>DIOC<sub>6</sub></b>	3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide
<b>DISC</b>	<i>death-inducing signal complex</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Sulfoxid de dimetil
<b>DS</b>	Donant sà
<b>EBV</b>	Virus d'Epstein-Barr
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Env</b>	Glicoproteïna de l'embolcall del VIH (de l'anglès, <i>envelope</i> )
<b>FasL</b>	Lligand del receptor Fas
<b>FCR</b>	Formes circulants recombinants
<b>GALT</b>	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescence Protein</i>
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>HR1</b>	<i>Heptad-repeat 1</i>
<b>HR2</b>	<i>Heptad-repeat 2</i>
<b>IFR</b>	Intensitat de fluorescència relativa

<b>IMF</b>	Intensitat mitja de fluorescència
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>50% Inhibitory Concentration</i>
<b>IgG</b>	Immunoglobulina de tipus G
<b>IgM</b>	Immunoglobulina de tipus M
<b>IN</b>	Integrasa
<b>IP</b>	Iodur de propidi
<b>LC3</b>	<i>Light Chain 3</i>
<b>LTNP</b>	<i>Long term non progressors</i>
<b>LTNP-CE</b>	<i>Long term non progressors</i> - Controladors d'elit
<b>LTNP-CV</b>	<i>Long term non progressors</i> - Controladors virèmics
<b>LTNP-NC</b>	<i>Long term non progressors</i> - No controladors
<b>LTNP-NC</b>	<i>Long term non progressors</i> - Virèmics no progressors
<b>LTR</b>	<i>Long terminal repeats</i>
<b>MAp17</b>	Proteïna de la matriu
<b>MC</b>	Mangabeis de collar
<b>MCP</b>	Mort cel·lular programada
<b>MET</b>	Microscòpia electrònica de transmissió
<b>MPER</b>	<i>membrane-proximal external region</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>NCp7</b>	Proteïna de la nucleocàpsida
<b>NIH</b>	<i>National Institute of Health</i>
<b>nPCR</b>	PCR aniuada ( <i>nested PCR</i> )
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NS</b>	No significatiu
<b>NSI</b>	<i>Non-Syncytium-Inducing</i>
<b>OMS</b>	Organització mundial de la salut
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PF</b>	Pèptid de fusió
<b>PR</b>	Proteasa
<b>PS</b>	Pèptid senyal
<b>RCT</b>	Receptor de cèl·lules T
<b>RER</b>	Reticle endoplasmàtic rugós
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RP</b>	Ràpid Progressor
<b>rpm</b>	revolucions per minut
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

<b>sCD14</b>	CD14 soluble
<b>SHIV</b>	<i>simian-human immunodeficiency virus</i>
<b>SI</b>	de l'anglès <i>Syncytium-Inducing</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de la Immunodeficiència Humana Adquirida
<b>SFB</b>	Sèrum fetal boví
<b>SMAC</b>	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
<b>TAR</b>	Tractament antirretroviral
<b>TARGA</b>	Tractament antirretroviral de gran activitat
<b>TI</b>	Transcriptasa inversa
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TNF-R</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<b>ULR</b>	Unitats Luminomètriques Relatives
<b>VIH</b>	Virus de la Immunodeficiència Humana
<b>VIS</b>	Virus de la Immunodeficiència en Simis
<b>VIScpz</b>	Virus de la Immunodeficiència en Simis de ximpanzé
<b>VISsm</b>	Virus de la Immunodeficiència en Simis de mangabeis de collar (en anglès <i>sooty mangabeys</i> )
<b>VNP</b>	Virèmic No Progressor





## **ÍNDEX**

<i>RESUM</i> .....	13
<i>RESUMEN</i> .....	15
<i>ABSTRACT</i> .....	17
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>19</b>
1. <i>El virus de la immunodeficiència humana (VIH). Generalitats.</i> .....	21
1.1 Classificació i origen del VIH .....	21
1.2 Estructura del VIH-1 .....	21
1.2.1 La glicoproteïna de l'embolcall (Env) del VIH .....	24
1.3 Cicle de replicació del VIH-1 .....	28
1.4 Infecció pel VIH .....	31
1.4.1 Epidemiologia de la infecció pel VIH.....	31
1.4.2 Curs natural de la infecció pel VIH.....	32
2. <i>Patogènesis del VIH-1: destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup></i> .....	34
2.1 Visió general .....	34
2.2 Mecanismes de mort cel·lular .....	34
2.2.1 Apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular.....	35
2.2.2 Autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular .....	37
2.2 Factors virològics implicats en la destrucció de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> .....	39
2.2.1 Citopaticitat induïda per l'Env del VIH.....	40
a. Citopaticitat induïda per gp120. Definició de Tropisme.....	40
b. Citopaticitat induïda per gp41: fusió, hemifusió i inducció de NKp44L .....	42
2.3 Factors immunològics .....	46
2.3.1 Hiperactivació immune .....	46
2.3.2 Activitat citotòxica de macròfags, cèl·lules NK i limfòcits T citotòxics.....	49
3. <i>Diferent progressió de la infecció pel VIH-1 i pel VIS</i> .....	50
3.1 Classificació.....	50
3.2 Factors que influencien la diferent progressió de la infecció per VIS.....	52
3.3 Factors que influencien la diferent progressió de la infecció pel VIH .....	54
<b>HIPÒTESIS I OJECTIUS</b> .....	<b>57</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>61</b>
1. <i>Descripció dels pacients</i> .....	63
2. <i>Cèl·lules</i> .....	64
2.1 Cèl·lules primàries.....	64
2.2 Línies cel·lulars.....	64
2.2.1 Cèl·lules adherents.....	64
2.2.1 Cèl·lules en suspensió.....	65
3. <i>Plasmidis</i> .....	66
4. <i>Altres reactius</i> .....	67
5. <i>Amplificació del gen env</i> .....	68

6. Clonatge de l'Env .....	70
7. Mutagènesis dirigida .....	70
8. Seqüenciació .....	72
9. Anàlisi del procés de fusió induït per l'Env .....	73
10. Anàlisi del tropisme de l'Env.....	75
10.1 Aproximació <i>in silico</i> .....	75
10.2 Aproximacions <i>in vitro</i> .....	75
11. Anàlisi de la mort de cèl·lules T CD4 induïda per l'Env .....	75
12. Anàlisi de l'hemifusió i l'apoptosi induïda per l'Env.....	76
13. Anàlisi de l'autofàgia induïda per l'Env .....	77
13.1 Anàlisi per epifluorescència.....	77
12.3 Anàlisi per microscòpia electrònica de transmissió.....	79
14. Obtenció i caracterització de pseudovirus .....	79
14.1 Producció de pseudovirus per cotransfecció.....	79
14.2 Titulació i quantificació dels pseudovirus. ....	81
15. Anàlisi de la inducció de l'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> .....	82
15.1 Caracterització genotípica.....	82
15.2 Assaig <i>in vitro</i> d'inducció de NKp44L.....	82
16. Anàlisi de respostes humorals contra l'Env .....	83
16.1 Detecció d'anticossos dirigits contra l'epítop 3S de gp41.....	83
16.1.1 Quantificació d'anticossos anti-3S per ELISA .....	83
16.1.2 Avaluació de la capacitat dels plasmes d'inhibir l'expressió de NKp44L in vitro. ....	84
16.2 Quantificació general dels anticossos anti-gp120.....	84
16.3 Anàlisi de l'activitat neutralitzant dels plasmes d'individus VIH <sup>+</sup> .....	85
17. Anàlisi estadística .....	86
<b>RESULTATS .....</b>	<b>87</b>
1.1 Avaluació de la capacitat fusogènica de l'Env .....	90
1.1.1 Caracterització del model experimental utilitzat .....	90
1.1.2 Estudi de l'activitat fusogènica de diferents mutants de gp41 (D368R, 41.2 i ΔCT).....	94
1.2 Estudi de la mort induïda per l'Env en cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> .....	95
1.2.1 Anàlisi de la pèrdua de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> induïda per l'Env.....	95
1.2.2 Implicació del procés d'hemifusió en la mort cel·lular per apoptosi .....	97
1.3 Estudi de la implicació de l'activitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia.....	99
1.3.1 Rol de la capacitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia.....	99
1.3.2 Estudi de la relació entra la capacitat fusogènica de gp41 i la inducció d'autofàgia en cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> primàries .....	104

2.1 <i>Caracterització de pacients VNP i RP</i> .....	108
2.2.1 <i>Amplificació i clonatge d'Env</i> .....	111
2.2.2 <i>Tropisme de les Env de pacients VNP i RP</i> .....	111
2.2.3 <i>Capacitat fusogènica de les Env de pacients VNP i RP</i> .....	113
2.3 <i>Estudi del mecanisme de pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> mediat per cèl·lules NK. Paper de gp41 en la inducció del lligand NKp44L</i> .....	117
2.4 <i>Estudi de la resposta humoral dels pacients VNP i RP</i> .....	122
2.4.1 <i>Estudi de la resposta humoral contra la regió 3S de gp41</i> .....	122
2.4.2 <i>Evolució de l'epítotop 3S i la resposta humoral associada</i> .....	127
2.4.3 <i>Estudi de la resposta humoral anti-gp120 i de la capacitat de neutralització</i> .....	131
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>147</b>
<i>ARTICLES PUBLICATS</i> .....	151
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>153</b>
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	<b>169</b>



## RESUM

La infecció pel VIH-1 es caracteritza per una dràstica davallada en el recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que condueix a un estat d'immunodeficiència de l'individu, afavorint l'aparició de manifestacions definitòries de sida com són les infeccions oportunistes. Tot i això, la dinàmica de la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no és igual en tots els pacients. En un extrem, hi podem trobar individus en els quals la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> és accentuadament ràpida, de manera que presenten recomptes de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> inferiors a les 350 cèl·lules/ $\mu$ l en menys de 3 anys (pacients ràpid progressors, RP). A l'altre extrem hi trobem un grup molt reduït d'individus que mantenen els recomptes de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> elevats (>400 cèl·lules/ $\mu$ l) i constants tot i presentar una replicació vírica activa a nivells elevats (pacients virèmics no progressors, VNP). La glicoproteïna de l'embolcall víric (Env) representa un dels principals determinants virològics de la citopaticitat del VIH-1, afectant tant les cèl·lules infectades com les no infectades a través de diversos mecanismes directes i indirectes. Per una banda, la unió de gp120 a la molècula CD4 (receptor víric) i a les molècules CXCR4 o CCR5 (coreceptors vírics i determinants del tropisme) així com la capacitat fusogènica de gp41 contribueixen de manera directa a la destrucció de cèl·lules T CD4. Per altra banda, la capacitat de gp41 (a través de l'epítip 3S) d'induir l'expressió a la superfície de les cèl·lules T CD4 del lligand NKp44L contribueix de manera indirecta en la seva destrucció, ja que l'expressió del lligand les sensibilitza per ser destruïdes mitjançant cèl·lules NK activades.

Els objectius d'aquesta tesi són, per una banda, el desenvolupament d'un model *in vitro* per a l'estudi del tropisme i la capacitat fusogènica de l'Env així com la seva relació amb la destrucció de cèl·lules T CD4 per apoptosi i autofàgia i, per altra banda, avaluar la contribució relativa dels diferents mecanismes citopàtics descrits anteriorment en la destrucció de cèl·lules T CD4 *in vivo* caracteritzant Env aïllades de pacients RP i VNP. En aquest cas, també s'ha avaluat el paper de la resposta humoral anti-Env en els dos grups de pacients.

En primer lloc, s'ha desenvolupat un mètode per a l'avaluació *in vitro* del tropisme i la fusogenicitat de diferents Env cocultivant cèl·lules 293T que expressaven l'Env i cèl·lules TZM-bl com a diana. A més a més, també s'ha demostrat la relació entre la capacitat fusogènica i hemifusogènica de l'Env i la inducció de mort cel·lular tant per apoptosi com per autofàgia.

En segon lloc, s'han caracteritzat les Env dels pacients VNP i RP en termes de tropisme, fusió i inducció del lligand NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. En cap cas es van observar diferències significatives que poguessin explicar la diferent dinàmica de pèrdua de cèl·lules T CD4 entre ambdós grups de pacients en relació amb aquests factors virològics.

Finalment, s'ha avaluat la resposta humoral anti-Env, analitzant la resposta anti-gp120, la resposta contra l'epítip 3S de gp41 i la resposta humoral neutralitzant. Els resultats van mostrar una major presència d'anticossos contra l'epítip 3S de gp41 i la seva regió juxtaposada en els individus VNP en comparació amb els RP, evitant l'expressió *in vivo* del lligand NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4 dels pacients VNP i possiblement contribuint a la seva protecció en aquest grup d'individus. Pel que fa a la resposta humoral neutralitzant, els resultats suggereixen que la seva contribució en el fenotip de VNP és residual ja que va presentar un ventall reduït de poca potència.



## RESUMEN

La infección por VIH-1 se caracteriza por una drástica caída en el recuento de células T CD4<sup>+</sup> que conduce a un estado de inmunodeficiencia del individuo, favoreciendo la aparición de eventos definitorios de sida como son las infecciones oportunistas. Aun así, la dinámica de pérdida de células T CD4<sup>+</sup> no es idéntica en todos los pacientes. En un extremo podemos encontrar individuos que presentan una pérdida de células T CD4<sup>+</sup> acentuadamente rápida, de modo que, después de la seroconversión, sus recuentos de células T CD4<sup>+</sup> llegan a valores inferiores a las 350 células/ $\mu$ l en un periodo de tiempo inferior a los 3 años (pacientes rápido progresores, RP). En el otro extremo, encontramos un grupo muy reducido de individuos que mantienen los recuentos de células T CD4<sup>+</sup> elevados (>400 células/ $\mu$ l) y constantes aunque presentan una replicación viral activa y elevada (pacientes virémicos no progresores, VNP). La glicoproteína de la envuelta viral (Env) representa uno de los principales determinantes virológicos de la citopaticidad del VIH-1, afectando tanto las células infectadas como las no infectadas a través de distintos mecanismos directos e indirectos. Por un lado, la unión de gp120 a la molécula CD4 (receptor viral) y a las moléculas CXCR4 o CCR5 (coreceptores virales y determinantes del tropismo) así como la capacidad fusogénica de gp41 contribuyen directamente a la destrucción de células T CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, la capacidad de gp41 (a través del epítipo 3S) de inducir la expresión en la superficie de las células T CD4<sup>+</sup> del ligando NKp44L contribuye indirectamente en su destrucción, ya que la expresión del ligando provoca que las células T CD4<sup>+</sup> sean susceptibles de ser destruidas mediante células NK activadas.

Los objetivos de esta tesis fueron, por un lado, desarrollar un modelo *in vitro* para el estudio del tropismo y la capacidad fusogénica de la Env así como su relación con la destrucción de células T CD4 por apoptosis y autofagia y, por otro lado, determinar la contribución relativa de los distintos mecanismos citopáticos descritos anteriormente en la destrucción de células T CD4 *in vivo* caracterizando Env aisladas de pacientes RP y VNP. Adicionalmente, también se planteó el estudio de la respuesta humoral anti-Env en los pacientes RP y VNP.

En primer lugar, se desarrolló un método para la evaluación *in vitro* del tropismo y la fusogenicidad de distintas Env cocultivando células 293T transfectadas con las distintas Env y células TZM-bl como diana. Asimismo, se demostró la relación entre la capacidad fusogénica y hemifusogénica de la Env y la inducción de muerte celular tanto por apoptosis como por autofagia. En segundo lugar, se caracterizaron las Env de los pacientes VNP y RP en términos de tropismo, fusión e inducción del ligando NKp44L en la superficie de las células T CD4<sup>+</sup>. En ningún caso se obtuvieron diferencias significativas que pudiesen explicar la distinta dinámica de pérdida de células T CD4 observada entre ambos grupos de pacientes en relación con estos factores virológicos. Finalmente, se evaluó la respuesta humoral anti-Env, analizando la respuesta anti-gp120, la respuesta contra el epítipo 3S de gp41 y la respuesta humoral neutralizante. Los resultados mostraron una mayor presencia de anticuerpos dirigidos contra el epítipo 3S de gp41 y su región yuxtapuesta en los individuos VNP en comparación con los RP, evitando la expresión *in vivo* del ligando NKp44L en la superficie de las células T CD4 de los pacientes VNP y, posiblemente, contribuyendo a su protección en este grupo de individuos. En relación con la respuesta humoral neutralizante, los resultados obtenidos sugirieron que su contribución al fenotipo de VNP es residual ya que presentó un abanico reducido y de baja potencia.





## ABSTRACT

HIV-1 infection is characterized by an important decrease on CD4<sup>+</sup> T cell counts, resulting in weakened immune responses that lead to AIDS-defining events such as opportunistic infections. However, the dynamics of the CD4<sup>+</sup> T cell loss is highly heterogeneous among HIV-infected individuals. On the one hand, some patients show a markedly fast decay on the CD4<sup>+</sup> T cell counts, reaching values lower than 350 CD4 T cell/ $\mu$ l within the first three years after seroconversion (rapid progressors, RP). On the other hand, a really limited group of HIV-infected individuals shows high and maintained CD4<sup>+</sup> T cell counts (>400 cells/ $\mu$ l) despite an active and high viral replication (viremic non progressors, VNP).

The envelope glycoprotein (Env) represents one of the main virological determinants of HIV-1 cytopathicity, affecting both infected and non-infected cells through direct and indirect mechanisms. By one side, the binding of gp120 to the CD4 molecule (viral receptor) and CXCR4 or CCR5 (viral coreceptors which determine the viral tropism) in combination with the fusogenic capacity of gp41 directly contribute to the destruction of the CD4<sup>+</sup> T cells. By the other side, gp41 induces the expression of NK cells ligand NKp44L on the surface of the CD4<sup>+</sup> T cells through its 3S epitope, indirectly contributing to its destruction since the expression of the ligand renders these cells highly sensitive to be killed by activated NK cells.

The objectives of this thesis were, by one hand, to develop an *in vitro* method to evaluate the Env tropism and fusogenic ability and its relation with CD4 T cells destruction by apoptosis and autophagy, and, by the other hand, to evaluate the relative contribution of the different cytopathic mechanisms described above in the destruction of CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo*, characterizing Env isolated from RP and VNP individuals. Moreover, the role of the humoral immune responses against Env was also evaluated for both groups of HIV-infected individuals.

Therefore, a method for the *in vitro* evaluation of the tropism and the fusogenicity of different Env was developed based on the coculture of Env-transfected 293T cells with TZM-bl as target cells. Furthermore, the relation between the fusogenic and hemifusogenic ability of Env and the induction of cell death by both, apoptosis and autophagy, was demonstrated.

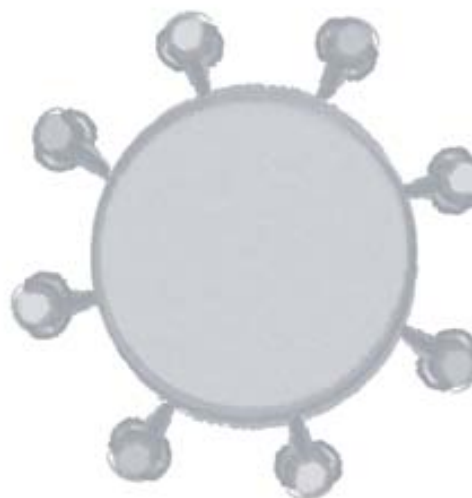
Secondly, Env from VNP and RP patients were characterized in terms of tropism, fusion and induction of NKp44L on the surface of primary CD4<sup>+</sup> T cells. No significant differences related to those virological factors which could explain the different loss of CD4 T cells between both groups of patients were observed.

Finally, the anti-Env humoral response was evaluated, analyzing anti-gp120 response, anti-3S response and the neutralizing humoral response. The results showed a higher presence of antibodies directed against the 3S epitope of gp41 and its juxtaposed region in the VNP individuals compared with the RP. *In vivo*, this response could avoid the expression of NKp44L on the surface of CD4 T cells from VNP individuals contributing to its protection in this group of patients. Related to the neutralizing humoral response, the results suggested that its contribution to the VNP phenotype was residual, since VNP individuals were unable to mount a broad and potent neutralizing response against HIV-1.





# INTRODUCCIÓ





## 1. El virus de la immunodeficiència humana (VIH). Generalitats.

### 1.1 Classificació i origen del VIH

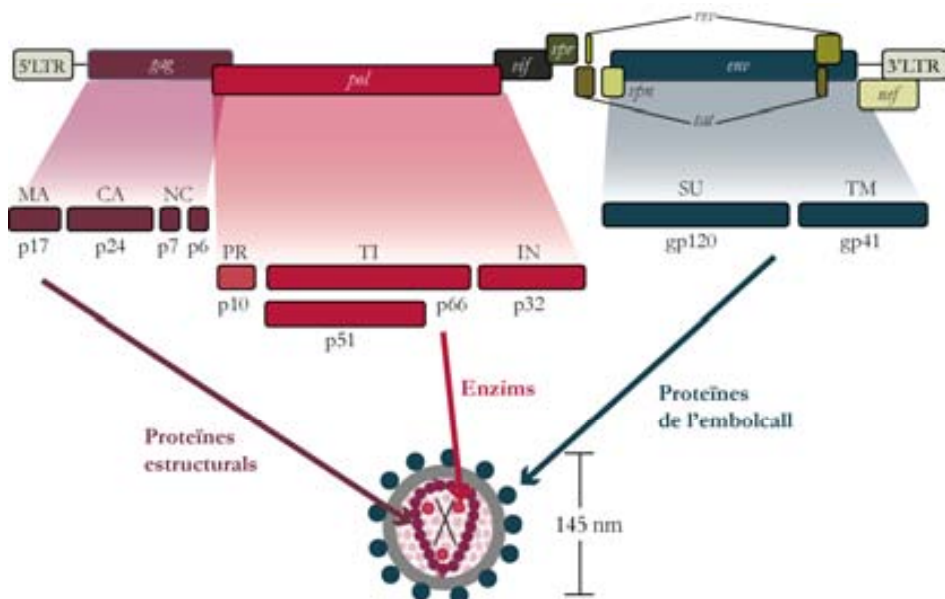
El virus de la immunodeficiència humana (VIH) és l'agent etiològic del Síndrome d'Immunodeficiència Humana Adquirida (o sida). Dins de la família Retroviridae pertany al gènere lentivirus. Se'n coneixen dos tipus, el VIH-1 i el VIH-2, els quals, al seu torn, es divideixen en diversos grups: el VIH-1 està format pels grups M (de l'anglès *Main*), N (no-M, no-O) i O (de l'anglès *Outlier*); el VIH-2 es divideix en 8 grups (A-G i AB), dels quals l'A i el B són els més importants. A més a més, el grup M del VIH-1 es classifica en 9 subtipus (A-D, F-H, J i K), subsubtipus i 48 formes circulants recombinants (CRF) [1]. El VIH-1 presenta una elevada patogenicitat i una àmplia distribució geogràfica, essent el principal causant de la pandèmia de sida a nivell mundial. El VIH-2, en canvi, és menys patogènic i la seva distribució geogràfica es concentra, principalment, en països de l'Àfrica Occidental com Guinea Bissau o Senegal. Ambdós tipus de VIH difereixen, a més, en l'organització del seu genoma i la seva relació filogenètica amb altres lentivirus de primats. Tot i que tant el VIH-1 com el VIH-2 es van descobrir durant la dècada dels 80 (els anys 1983 [2] i 1986 [3], respectivament), s'ha estimat que ambdós es van originar per zoonosis a principis del segle XX. Concretament, l'ancestre comú més recent pels grups M, O i N del VIH-1 s'ha situat a l'Àfrica central als anys 1908 (rang 1884-1924), 1920 (1890-1940) i 1963 (1948-77) respectivament; i pel VIH-2, s'estima que l'ancestre comú més recent data dels anys 1932 (1906-55) pel grup A i 1935 (1907-61) pel grup B originant-se a Guinea Bissau i/o Costa d'Ivori. Pel que fa a l'origen dels virus, molt probablement el VIH-1 es va originar per transmissió del virus de la immunodeficiència de simis (VIScpz) des d'una subespècie particular de ximpanzés (*P. t. troglodytes*) al humans i el VIH-2 per transmissió del VISsm des d'una altra espècie de primats no humans, els mangabeis de collar, a l'Àfrica central i occidental, on eren molt freqüents la convivència, la caça i la ingesta d'aquestes espècies de primats no-humans (revisat per Tebit M et al. [4] i Hahn BH et al. [5]).

### 1.2 Estructura del VIH-1

Els virions madurs del VIH-1 tenen una morfologia aproximadament esfèrica i un diàmetre de  $145 \pm 25$  nm [6]. A la seva part més externa hi trobem l'embolcall víric, una bicapa lipídica originària de la cèl·lula hoste, de la qual

sobresurten formant espícules les glicoproteïnes de l'embolcall (Env, de l'anglès *envelope*). A la part interna de l'embolcall s'hi troba la matriu formada per la proteïna MAp17, la qual forma una cavitat on s'acomoda la càpsida vírica. Aquesta càpsida, majoritàriament de forma troncocònica [6], està formada per la proteïna CAp24 i conté dins el seu interior el genoma víric, els enzims vírics proteasa (PR), transcriptasa inversa (TI) i integrasa (IN), i les proteïnes accessòries Vif, Vpr i Nef. El genoma víric, a més, està embolcallat per una estructura anomenada nucleocàpsida formada per la proteïna NC7.

El genoma del VIH-1, format per dues molècules d'ARN de cadena senzilla i polaritat positiva d'unes 9,2 kb, codifica per un total de nou gens, dels quals tres (*gag*, *pol* i *env*) originaran les proteïnes estructurals, els enzims vírics i les proteïnes de l'embolcall comunes a tots els virus de la família Retroviridae i els altres sis (*vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* i *nef*) originaran les anomenades proteïnes reguladores i accessòries (Figura 1). A més, a ambdós extrems del genoma víric hi trobem els LTR (de l'anglès *long terminal repeats*), els quals participen en la integració de l'ADN víric dins del genoma de la cèl·lula hoste i constitueixen llocs d'unió per a factors de transcripció cel·lulars regulant l'expressió gènica.



**Figura 1.** Esquema del genoma i l'estructura del VIH-1. Figura adaptada de [www.stanford.edu](http://www.stanford.edu).

***gag*** codifica una poliproteïna que és processada per la proteasa vírica [7, 8] durant el procés de maduració del virió originant diferents proteïnes estructurals: la proteïna de la matriu (MAp17); la proteïna de la càpsida (CAp24); la proteïna de la nucleocàpsida (NCp7); p6 i dos petits pèptids (p1 i p2).

***pol*** codifica els tres enzims vírics: la proteasa (PR), la transcriptasa inversa (TI) i la integrasa (IN). La PR és una aspartil-proteasa [9, 10] responsable del processament proteolític de les poliproteïnes codificades pels gens *gag* i *pol*, procés indispensable per la maduració, el correcte assemblatge dels virions i la seva infecciositat [11]. La TI és una ADN polimerasa dependent d'ARN i ADN que transcriu l'ARN víric de cadena senzilla a ADN de doble cadena. Durant aquest procés es forma un híbrid ARN-ADN on l'ARN és degradat gràcies a l'activitat ARNasa H que també presenta la TI [12, 13]. La IN té com a funció principal la integració de l'ADN víric a l'ADN cromosòmic de la cèl·lula hoste. Els llocs d'integració són preferentment gens transcripcionalment actius, especialment aquells que s'han activat degut al procés d'infecció pel VIH [14].

***env*** codifica la poliproteïna gp160 que és proteolitzada per proteases cel·lulars [15, 16] originant la subunitat de superfície gp120 i la subunitat transmembrana gp41 de l'Env. Les dues subunitats, unides no covalentment i formant estructures trimèriques [17], es troben insertades a l'embolcall víric essent les responsables de la unió i entrada del virus a les cèl·lules diana [18]. La seva exposició a la superfície dels virions i de les cèl·lules infectades les converteix també en dianes de la resposta immunològica de l'hoste actuant com a antígens i immunògens [18].

***tat*** codifica per la proteïna reguladora Tat la qual juga un paper important en l'expressió gènica del VIH, ja que actua com a regulador transcripcional augmentant els nivells de transcripció del promotor de l'LTR del VIH-1 regulant l'ARN polimerasa II i afavorint el procés d'elongació dels transcrits. Alhora actua també sobre gens cel·lulars [19].

***rev*** codifica per la segona proteïna reguladora, Rev. Aquesta proteïna activa l'exportació del nucli al citoplasma de les molècules d'ARN que han patit un procés d'empalmament (en anglès *splicing*) parcial o nul com són els transcrits de *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr* i *vpu* [20].

***nef, vpu, vpr i vif*** codifiquen per les proteïnes accessòries del VIH-1 de noms anàlegs i funcions diverses encaminades a augmentar la infecciositat de les partícules víriques. Vpu pot formar estructures similars a un canal iònic que poden actuar despolaritzant la membrana cel·lular i així facilitar l'alliberació de les partícules víriques [21]. Vpu i Nef afecten al tràfic intracel·lular de la molècula CD4, afavorint la seva degradació al reticle endoplasmàtic (Vpu) [22] o bé accelerant l'endocitosi i degradació del CD4 expressat a la membrana cel·lular (Nef) [23]. Nef down-regula, a més, l'expressió en superfície del complex d'histocompatibilitat principal de classe I [24]. Vpr realitza diverses funcions com contribuir a la importació al nucli del complex de preintegració vírica (CPI), induir la parada del cicle cel·lular, modular l'apoptosi de les cèl·lules T, coactivar transcripcionalment gens vírics i cel·lulars i regular l'activitat de NF- $\kappa$ B [25]. Vif té com a funció principal bloquejar l'acció de la proteïna antiviral APOBEC3G, una citidina desaminasa cel·lular que ataca l'ADN víric mentre s'està sintetitzant a la cèl·lula infectada [26].

### *1.2.1 La glicoproteïna de l'embolcall (Env) del VIH*

L'Env del VIH és sintetitzada al reticle endoplasmàtic rugós (RER) de les cèl·lules infectades en forma d'una poliproteïna d'uns 845-870 residus aminoacídics. Aquesta poliproteïna precursora conté un pèptid senyal (PS) a la seva regió N-terminal (Figura 2A) que la dirigeix cap a la membrana del RER. Alhora conté també un domini transmembrana hidrofòbic d'anclatge a membrana evitant que la gp160 sigui alliberada completament al lumen del RER, de manera que les futures porcions extracel·lulars de l'Env se situen dins del lumen del RER, mentre que la porció citoplasmàtica de la futura gp41 s'estén cap al citoplasma i, posteriorment, a l'interior dels virions [27]. Durant el procés de traducció de la proteïna, aquesta també és glicosidada. Així, se li uneixen diverses cadenes d'oligosacàrids, riques en mannososa i unides principalment per enllaços N-glicosídics, originant la glicoproteïna gp160 [15]. Els monòmers de gp160 oligomeritzen al RER formant trímers, principalment, tot i que també s'han observat dímers i tetràmers [27]. S'ha suggerit que el procés d'oligomerització facilitaria el seu transport cap al complex de Golgi. Mentre la gp160 transita a través de la via secretora, les cadenes laterals d'oligosacàrids adquireixen modificacions complexes a l'aparell de Golgi. Posteriorment, la



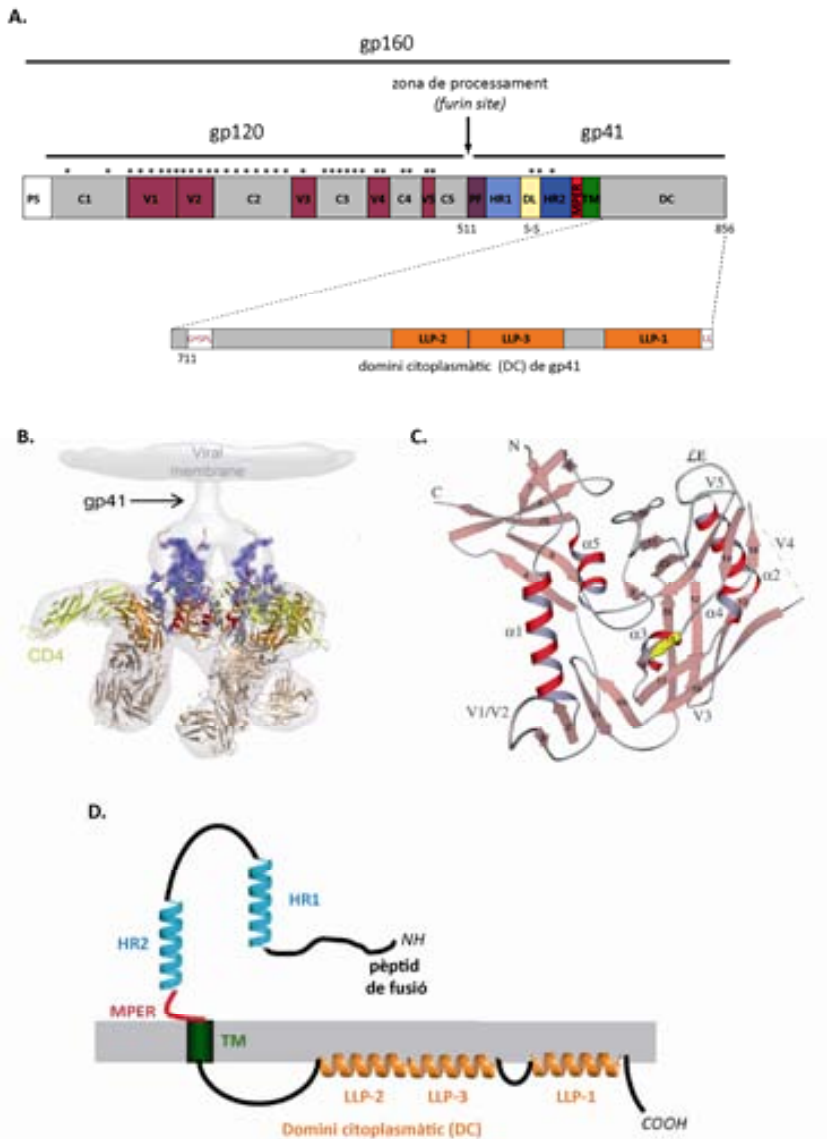
gp160 és processada per proteases cel·lulars [15, 16] (*furin* o *furin-like proteases*), en un motiu altament conservat (K/R-X-K/R-R) [28] (Figura 2A) originant les glicoproteïnes de l'Env madura: gp120, la subunitat de superfície; i gp41, la subunitat transmembrana. Gp120 i gp41 continuen associades per interaccions no covalents i tres molècules de gp120/gp41 acabaran formant l'espícula heterodimèrica de la glicoproteïna del VIH (Figura 2B) [27].

La subunitat de superfície gp120 consta de cinc dominis variables (V1-V5) intercalats amb cinc dominis relativament conservats (C1-C5) [29, 30] (Figura 2A i C). La variabilitat dels dominis V1-V5 inclou recombinacions, mutacions puntuals, insercions i/o delecions [27]. Al llarg de gp120, i també de gp41, s'han identificat diverses cisteïnes conservades, les quals formen ponts disulfur intramoleculars crucials per a la formació de l'estructura terciària de l'Env (Figura 2B i C). Generalment, gp120 conté 18 cisteïnes que formen 9 ponts disulfur [31]. La glicosidació de l'Env és especialment rellevant per a gp120, la qual conté uns 20-35 llocs de glicosidació (Figura 2A) (mentre que a gp41 només se n'han identificat de 3 a 5, Figura 2A) [27], se manera que els oligosacàrids constitueixen aproximadament la meitat de la massa molecular d'aquesta glicoproteïna [32].

Diversos residus altament conservats, situats principalment als dominis C1, C3 i C4, els quals presenten una localització espacial molt pròxima quan la gp120 es plega en la seva estructura terciària, són els principals responsables de la unió entre gp120 i el seu receptor cel·lular (la molècula CD4) [27]. En relació amb el tropisme víric, el principal determinant de l'ús preferencial de CXCR4 i/o CCR5 com a coreceptors durant el procés d'entrada és el llaç variable V3 [33-35]. Tot i això, altres regions de l'Env com són el llaç format pels dominis V1 i V2 [36, 37] o fins i tot el domini transmembrana de gp41 [38] poden influenciar en el tropisme.

Pel que fa a la subunitat transmembrana o gp41, està formada per uns 345 aminoàcids i s'organitza en 3 dominis principals: un domini extracel·lular (o ectodomini), un domini transmembrana (TM) i un domini citoplasmàtic (DC) [27] (Figura 2A i D). El domini extracel·lular (Figura D) conté els principals determinants de l'activitat fusogènica de gp41: una regió N-terminal altament hidrofòbica anomenada pèptid de fusió, una regió polar, dues regions hidrofòbiques que formen estructures d'hèlix  $\alpha$  superenrotllades anomenades

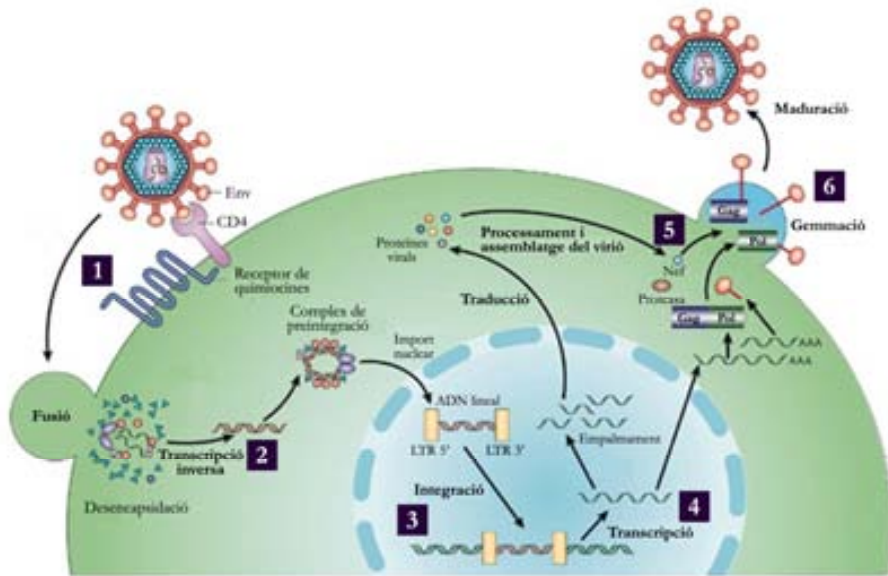
HR1 i HR2 (de l'anglès *heptad-repeat* 1 i 2) i finalment un domini ric en triptòfan anomenat MPER (de l'anglès *membrane-proximal external region*) (Figura 2A i D). Aquesta última regió, MPER, és altament conservada i reconeguda per diversos anticossos neutralitzants com són 2F5, 4E10 o Z13. El domini TM està format per uns 25 aminoàcids altament conservats que ancoren l'Env a la bicapa lipídica dels virions o de les cèl·lules infectades. Clàssicament la topologia de la regió TM consisteix en una hèlix  $\alpha$  que creua la membrana una única vegada (Figura 2D) i, tot i que s'han descrit topologies alternatives en les quals la regió TM creuaria la membrana 3 vegades, recentment s'ha suggerit que el model clàssic és el que millor s'ajustaria a l'organització de la proteïna als virions [27]. Finalment, la subunitat gp41 de l'Env de la majoria de lentivirus presenta un DC molt llarg en comparació amb d'altres retrovirus. Així, el DC del VIH-1, VIH-2 i del VIS està format per uns 150 aminoàcids, mentre que els DC del virus del sarcoma de Rous o del virus de la leucèmia murina presenten tan sols 20-40 aminoàcids. En el cas del VIH-1, el DC influencia múltiples propietats del complex gp120/gp41 com ara la incorporació de l'Env a les partícules víriques, la infecciositat, l'expressió de l'Env a la superfície cel·lular, l'alliberació de gp120 i la fusió mediada per l'Env [27]. El DC, al seu torn, també està format per diversos dominis funcionals i estructurals (Figura 2A i D). Diversos motius d'aquesta regió, especialment un motiu basat en tirosina a la regió pròxima a la membrana (amb la seqüència consens YXXL) i un motiu dileucina a la regió C-terminal de la proteïna (Figura 2A), s'han relacionat amb l'endocitosis [39-41], la distribució polaritzada [42] i el reciclatge cap a l'aparell de Golgi [43] de l'Env. Aquestes funcions es realitzen a través de la seva interacció amb diversos components de la maquinària de tràfic endocític incloent-hi els adaptadors de clatrina AP-1 i AP-2 [44, 45] i la proteïna TIP47, involucrada en el transport de certs receptors dels endosomes a l'aparell de Golgi [43]. A més a més a la regió central i C-terminal del DC també hi trobem uns segments altament conservats en forma d'hèlix  $\alpha$  amfipàtiques anomenats LLP-1, -2 i -3 (Figura 2A i D), els quals s'han relacionat amb la fusogenicitat de l'Env, l'estabilitat de la proteïna, la multimerització, l'expressió a la superfície cel·lular i la incorporació als virions [27].



**Figura 2. Estructura de l'Env del VIH-1.** A. Representació dels dominis variables (V1-V5) i constants (C1-C5) de gp120 i dels diferents dominis de gp41: domini extracel·lular amb el pèptid de fusió (PF), dues regions hidrofòbiques en estructura d'hèlix  $\alpha$  (HR-1 i HR-2) i la regió pròxima a la membrana (MPER); domini transmembrana (TM); i domini citoplasmàtic (DC). S'ha representat una ampliació del DC per remarcar-hi els senyals d'endocitosis i distribució intracel·lular YSPL i LL i les hèlix- $\alpha$  amfipàtiques LL-1, LL-2 i LL-3. La numeració correspon a la soca del VIH-1 HXB-2. Els asteriscs representen possibles llocs de glicosidació. Figura adaptada de [27] i [46]. B. Representació de l'estructura dels trimers de gp120 units a tres molècules de CD4 (en groc) i la porció Fab de l'anticòs neutralitzant 17b (en marró), utilitzats per estabilitzar l'estructura de gp120. La imatge s'ha superposat a la densitat electrònica observada per tomografia crioelectrònica (gris clar). La regió N-terminal de gp120 està representada en vermell, i la zona d'interacció amb gp41 en blau. El domini intern es pot veure en vermell i gris i el domini extern en taronja. Figura adaptada de [27]. C. Diagrama de cintes del core de gp120 que conté hèlix- $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ) i làmines- $\beta$  (1-25), amb les posicions relatives dels llaços variables (V1-V5) i de les regions N- i C-terminal. Figura adaptada de [27]. D. Esquema de l'estructura de gp41 i els seus diferents dominis. Figura adaptada de [47].

### 1.3 Cicle de replicació del VIH-1

El cicle vital del VIH-1, que es troba il·lustrat a la figura 3, segueix l'esquema general dels retrovirus, format per una fase primerenca (compresa entre l'entrada del virus a la cèl·lula i la integració del provirus) i una fase tardana (compresa entre la transcripció dels gens vírics i la formació dels nous virions).

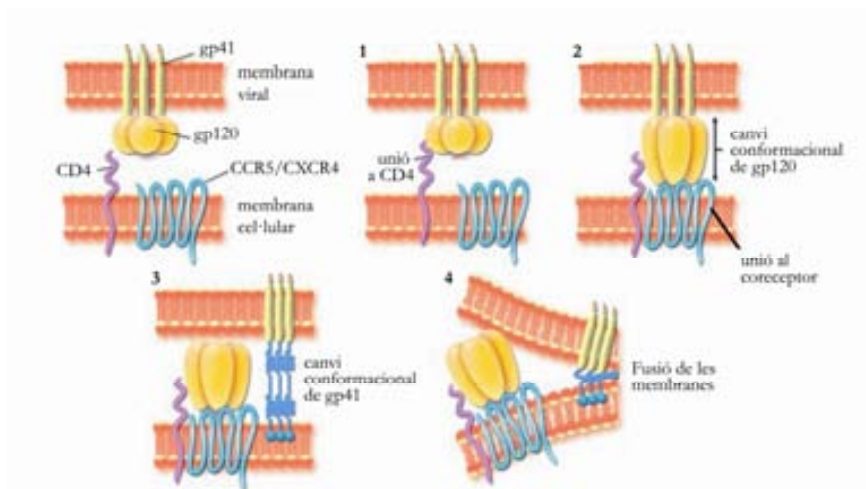


**Figura 3. Cicle de replicació del VIH-1.** Figura adaptada de [48]. Els números representen les diferents fases del cicle de replicació del VIH-1: (1) Entrada, (2) Transcripció inversa, (3) Integració, (4) Transcripció i traducció, (5) Assemblatge i (6) Alliberament i maduració.

Tot el procés segueix les etapes següents:

1. *Entrada.* El procés d'entrada (Figura 4) del virus a la cèl·lula diana (principalment limfòcits T CD4<sup>+</sup> i en menor mesura macròfags i cèl·lules dendrítiques) s'inicia per la unió d'alta afinitat entre gp120 i la molècula CD4, que actua com a receptor víric. Aquesta unió provoca canvis conformationals a gp120 provocant una major exposició del llaç V3 de gp120 i afavorint la seva interacció amb un receptor de quimiocines (generalment CCR5 o CXCR4) que actua com a coreceptor [18]. Aquestes unions provoquen la formació d'una hèlix

superenrotllada (en anglès *coiled-coil*) a gp41 provocant la reorganització de les hèlix HR-1 i HR-2 en una estructura en feix (*6-helix bundle*) i afavorint la inserció de la regió N-terminal altament hidrofòbica de gp41 (pèptid de fusió, PF) a la membrana de la cèl·lula diana (Figura 2) [18]. Aquest fet provoca la fusió entre la membrana cel·lular i la del virió, conduint a l'alliberació de la càpsida vírica a l'interior del citoplasma cel·lular on es produeix la desencapsidació i l'alliberació del material genètic i de diverses proteïnes víriques.



**Figura 4. Procés d'entrada del VIH a la cèl·lula diana.** A. Representació dels diferents passos necessaris per la unió i fusió del virus a la cèl·lula diana: (1) unió de gp120 a CD4, (2) canvis conformationals a gp120 i unió al coreceptor, (3) canvis conformationals a gp41 i (4) inserció del PF de gp41 a la membrana de la cèl·lula diana i fusió. Figura adaptada de [49].

2. *Transcripció inversa.* Un cop s'ha produït la desencapsidació, la TI del virió procedeix a la síntesis d'ADN de doble cadena. En primer lloc es sintetitza una cadena d'ADN utilitzant com a motlle l'ARN víric, formant-se un híbrid ADN/ARN. Posteriorment l'ARN és degradat per l'activitat ARNasaH de la TI i finalment es sintetitza la cadena d'ADN complementària a la que s'havia sintetitzat prèviament [13, 50].
3. *Integració.* Un cop finalitzada la transcripció inversa, l'ADN s'inclou en un complex proteic, complex de preintegració (CPI), que és transportat

fins a l'interior del nucli cel·lular. Tot seguit, la IN vírica catalitza el procés d'integració que culmina amb la unió covalent de l'ADN víric i l'ADN cel·lular [51]. Un cop integrat, el material genètic del virus (anomenat provirus) pot romandre en estat latent durant un període de temps de durada variable.

4. *Transcripció i traducció.* La transcripció de l'ADN províric depèn de la maquinària de transcripció de la cèl·lula hoste, com l'ARN polimerasa II, però està regulada per les proteïnes víriques Tat i Rev amb l'ajuda de nombrosos factors de transcripció cel·lulars presents en les cèl·lules activades. L'ARN obtingut és processat mitjançant un procés d'empalmament que origina diferents transcrits vírics: molècules d'ARN senceres, molècules resultants d'un sol procés d'empalmament i molècules on aquest procés ha succeït diverses vegades. Aquests últims transcrits són transportats al citoplasma a través de mecanismes cel·lulars, mentre que Rev dirigeix el transport dels transcrits que han patit un o cap procés d'empalmament [20]. Posteriorment tindrà lloc, al citoplasma cel·lular, el procés de traducció als diferents precursors de les proteïnes víriques.
5. *Assemblatge dels nous virions.* Els precursors de les proteïnes víriques Gag i Gag/Pol són transportats cap a la membrana cel·lular a través de la xarxa cel·lular de microtúbuls. Allà es produirà el seu assemblatge juntament amb dues molècules senceres de l'ARN víric per formar el nou virió.
6. *Alliberament i maduració.* El procés de gemmació de les noves partícules víriques immadures es produeix en aquelles regions de la membrana plasmàtica on s'expressen les proteïnes de l'embolcall. Durant la gemmació, la nova partícula vírica incorpora a la seva superfície tant les glicoproteïnes de l'embolcall com proteïnes cel·lulars que li facilitaran la posterior infecció d'una nova cèl·lula [18]. Finalment, la PR indueix la proteòlisi dels precursors de les proteïnes codificades pels gens *gag* i *pol*, provocant canvis morfològics a la partícula vírica i formant les partícules víriques madures que adquireixen la capacitat d'iniciar un nou cicle de replicació.

## 1.4 Infecció pel VIH

L'any 1981 el *Center for Disease Control* (CDC) dels Estats Units va recollir el diagnòstic de cinc casos de pneumònies causades pe *Pneumocystis carinni* (actualment *jirovecii*) en cinc joves de Los Angeles (Califòrnia) [52]. Era un fet sorprenent ja que es tractava de cinc homes joves aparentment sans i en canvi aquesta patologia era poc freqüent i es considerava restringida a individus que presentessin una forta immunodeficiència. Addicionalment, la mateixa institució va detectar també un increment en la incidència del sarcoma de Kaposi [53], la limfadenopatia crònica [54] i els limfomes no-hodgkinians [55] en el col·lectiu homosexual. Finalment, l'associació d'una d'aquestes malalties l'any 1982 amb un estat d'immunodeficiència de causa desconeguda va portar a utilitzar per primera vegada el terme de síndrome d'immunodeficiència humana adquirida, o sida.

### *1.4.1 Epidemiologia de la infecció pel VIH*

Des de l'any 1990, més de 25 milions de persones han mort a causa de la sida, constituint un dels principals problemes de salut pública a nivell mundial. Durant el període 2001-2009 s'ha observat, en termes generals, una tendència cap a la disminució de la incidència de la infecció, tot i que en certs països d'Europa de l'est o del centre de l'Àsia la incidència ha augmentat un 25%. Tot i això, durant l'any 2009 es van produir 2,6 milions de noves infeccions arreu del món, la gran majoria d'elles (97%) en països de rendes baixes i mitges. Actualment, s'estima que uns 34 milions de persones viuen infectades pel VIH arreu del món. La regió subsahariana de l'Àfrica continua essent la més afectada, ja que dels 34 milions globals 22,5 (68%) es concentren en aquesta zona, i a més a més és on es produeix un nombre major de noves infeccions (1,8 milions, 69%) i de morts atribuïbles a l'epidèmia (1,3 milions, 72%) segons estimacions fetes per la OMS l'any 2009.

Com la majoria de retrovirus, les principals vies de transmissió del VIH són el contacte sanguini i el sexual els quals impacten de manera diferent en funció de la zona geogràfica. A l'Àsia i a països de l'Europa de l'est, la transmissió es produeix més freqüentment entre usuaris de drogues injectables. A l'Amèrica del Nord i a la resta d'Europa, en canvi, són les relacions sexuals desprotegides

entre homes el principal motiu de transmissió. I, finalment, a l'Àfrica subsahariana, on més del 60% de persones que viuen infectades pel VIH són dones, la via principal de transmissió són les relacions heterosexuales sense protecció [56].

#### 1.4.2 Curs natural de la infecció pel VIH

La història natural de la infecció pel VIH, en absència de tractament, es divideix en tres etapes: fase aguda, crònica i crítica o sida (Figura 5A).

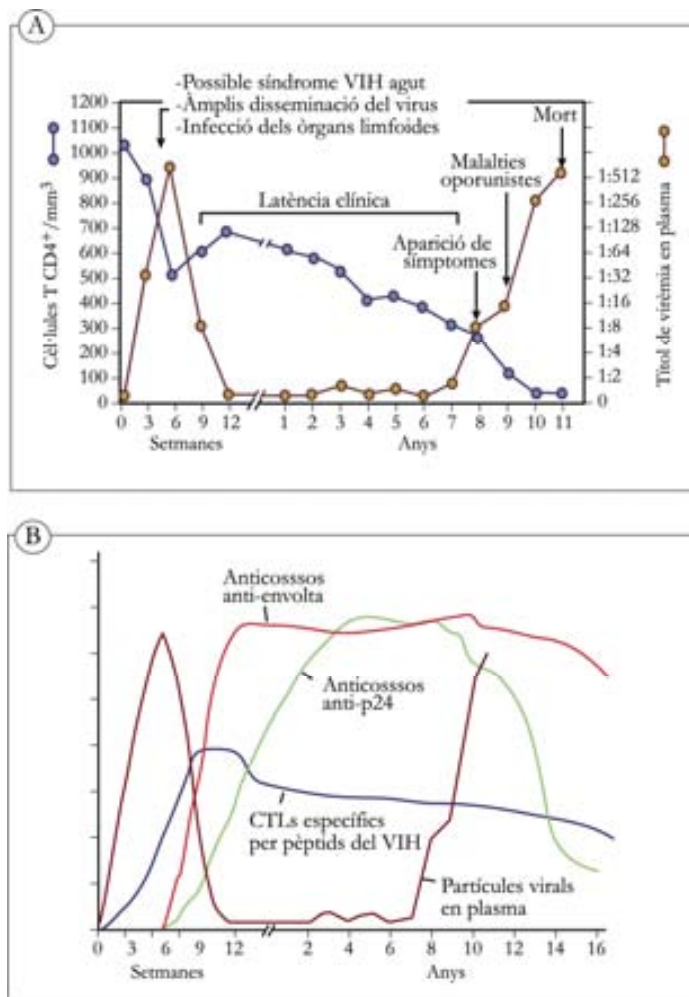
- *Fase aguda.* La fase aguda correspon a l'inici de la infecció. En aquesta fase el virus es dissemina principalment pel teixit limfoide associat a intestí (en anglès *Gut associated lymphoid tissue, GALT*), els ganglis limfàtic i altres teixits com el sistema nerviós. L'individu infectat roman asimptomàtic, excepte en alguns casos en els que s'observa l'anomenat síndrome retrovíric agut, que sol tenir una duració d'una a dues setmanes, i es caracteritza per febre, letargia, astènia o faringitis entre d'altres símptomes. Durant aquesta fase hi ha un gran replicació vírica i la càrrega viral (CV), arribant a un punt màxim després de 21-28 dies postinfecció, i la proporció de limfòcits T CD4 infectats és molt elevada. Concomitantment es produeix una marcada davallada en el número de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. Posteriorment, es genera la resposta immune específica (apareixen anticossos contra quasi totes les proteïnes reguladores i estructurals del virus, procés anomenat seroconversió, i també l'expansió clonal dels limfòcits T CD8<sup>+</sup> amb activitat citotòxica, CTL de l'anglès *cytotoxic T lymphocytes*) (Figura 5B). Aquesta resposta immune provoca una dràstica davallada de la CV i de la proporció de limfòcits T CD4 infectats i la recuperació parcial del número de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>.

- *Fase crònica.* Durant aquesta fase, que té una duració de diversos anys en funció de l'individu, la replicació vírica persisteix però a nivells baixos ja que és controlada per la forta resposta immune generada. Principalment la replicació vírica es duu a terme als òrgans limfoides, on la CV es entre 10 i 100.000 vegades superior a la present en plasma. Aquesta fase es caracteritza també per una latència clínica, ja que la majoria dels pacients romanen asimptomàtics.

- *Fase crítica, sida.* En aquesta fase es perd l'equilibri entre la replicació vírica i el control immunològic i l'activitat replicativa del virus s'incrementa notablement



de manera que la CV circulant i la CV dels òrgans limfoides s'igualen i es produeix una forta depleció de limfòcits T CD4 circulants en sang perifèrica. Clínicament es fa palesa la greu alteració de l'estat general del pacient, amb l'aparició d'infeccions oportunistes i altres manifestacions com poden ser alteracions del sistema nerviós central, caquèxia, fallada renal o, eventualment, la mort (Figura 5A).



**Figura 5. Curs clínic de la infecció pel VIH.** A. Representació de la virèmia plasmàtica (símbols marrons), el recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en sang perifèrica (símbols blaus) i els estadis clínics de la malaltia. B. Respostes del sistema immunitari a la infecció pel VIH. La resposta CTL és detectable entre 2 i 3 setmanes després de la infecció inicial i arriba al seu màxim entre les setmanes 9 i 12. La resposta humoral s'activa amb posterioritat arribant als nivells màxims a partir de les 12 setmanes. Figura adaptada de [57].

## 2. Patogènesis del VIH-1: destrucció de cèl·lules T CD4+

### 2.1 Visió general

La infecció pel VIH-1 (anomenat VIH d'aquí en endavant) es caracteritza per una dràstica davallada en el nombre de cèl·lules T CD4+, que resulta en un debilitació del sistema immunitari de l'individu conduint a l'aparició d'events definitoris de sida com són les infeccions oportunistes o altres manifestacions esmentades anteriorment [58, 59]. Diverses investigacions han demostrat que aquesta pèrdua de les cèl·lules T CD4+ és deguda a una combinació de factors tant immunològics com virològics. Un cop infectades, les cèl·lules T CD4+ tenen una vida mitja molt curta degut als efectes citopàtics directes de la replicació del VIH i de diverses proteïnes víriques amb efecte proapoptòtic com són l'Env, Nef, Tat, Vpu, Vpr o la PR [60]. A més a més, el nombre de cèl·lules infectades en un individu, que s'estima que és de l'ordre d'1 còpia de provirus per cada  $10^3 - 10^4$  cèl·lules CD4+ en infecció aguda [61], és notablement inferior al nombre de cèl·lules T CD4+ que desapareix durant la infecció. Per tant, l'efecte del VIH no repercuteix tant sols sobre les cèl·lules T CD4+ infectades, sinó que afecta també a la població de cèl·lules T CD4+ no infectada (l'anomenat efecte *bystander*) [62]. De fet, en teixit limfoide l'apoptosi es produeix principalment en les cèl·lules T CD4+ que no estan infectades [63]. Finalment, la infecció pel VIH, també és la responsable de múltiples mecanismes indirectes implicats en la desaparició de les cèl·lules T CD4+, que inclouen, entre d'altres, la mort cel·lular deguda a l'estat d'hiperactivació immunològica, l'activitat lítica de les cèl·lules CTL, NK i macròfags o el dany progressiu dels òrgans limfoides primaris i secundaris [64].

### 2.2 Mecanismes de mort cel·lular

Els mecanismes que condueixen a la mort d'una cèl·lula són múltiples i complexos i depenen, generalment, de l'execució d'una complicada seqüència de vies de senyalització intracel·lulars. L'any 2005 es va proposar una nomenclatura per a la mort cel·lular programada (MCP) basada, principalment, en criteris morfològics. Així els principals tipus de MCP són l'apoptosi, l'autofàgia i la necrosis. En el context de la infecció pel VIH, l'apoptosi és el mecanisme més àmpliament estudiat i relacionat amb la mort de cèl·lules T CD4 [63, 65-70]. Tot

i això, des de l'any 2006 també s'ha demostrat que l'autofàgia pot jugar un paper en la inducció de mort cel·lular en la població T CD4<sup>+</sup> [71].

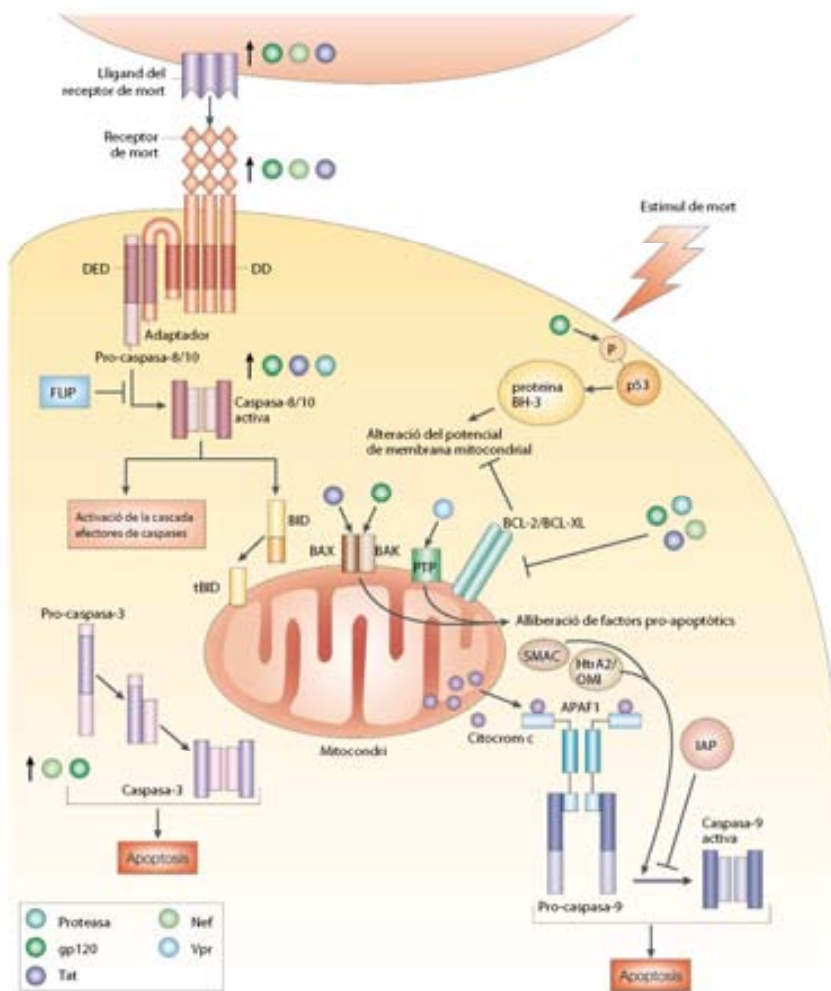
### 2.2.1 Apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular

L'apoptosi és un mecanisme estrictament regulat de mort cel·lular essencial per a la homeòstasis cel·lular. L'apoptosi pot produir-se seguint dues vies de senyalització, la via extrínseca i la via intrínseca, en funció de la procedència de l'estímul que la desencadeni. Així, senyals extracel·lulars com poden ser toxines, citocines o factors de creixement poden induir apoptosi per la via extrínseca a través de receptors de mort cel·lular com CD95 (també anomenat FasR), membre de la família de receptor TNF-R (de l'anglès, *tumor necrosis factor receptor*) [72]. Per altra banda, l'activació de sensors intracel·lulars, generalment relacionats amb l'estrès cel·lular, transmeten senyals als mitocondris induir apoptosi per la via intrínseca [73]. Els estímuls que poden activar aquests sensors intracel·lulars són, entre d'altres, la radiació, la calor, la inanició, la infecció vírica o la hipòxia.

En relació amb les vies de senyalització, la ruta extrínseca s'inicia per la unió dels lligands corresponents als receptors transmembrana de mort cel·lular. A través dels seus dominis DD (de l'anglès *death domains*), els receptors multimeritzats interaccionen amb els dominis DD de les proteïnes adaptadores, les quals també presenten dominis DED (de l'anglès *death-effector domains*) els quals faciliten la unió a pro-caspasa-8 (o pro-caspasa-10) formant el complex DISC (de l'anglès *death-inducing signal complex*) on les procaspases són processades formant-se les seves formes actives. Posteriorment la caspasa-8 (o-10) activa s'allibera del DISC al citoplasma on activa diverses proteïnes incloent diferents caspases com la procaspasa-3 i completant el programa de mort cel·lular. En alguns casos la formació del DISC es troba molt disminuïda de manera que la cascada de caspases no es pot propagar directament sinó que necessita ser amplificada a través de la via mitocondrial. Així la caspasa-8 pot proteolitzar la proteïna Bid (de la família BCL-2) la qual "activa" els mitocondris [72] (Figura 6).

Pel que fa a la via intrínseca, aquesta s'inicia per sensors interns, com p53, els quals activen proteïnes que contenen el domini BH-3 provocant l'assemblatge de membres de la família proapoptòtica BCL-2, com BAX i BAK, en porus

hetero-oligomèrics a la membrana mitocondrial. Aquest fet provoca en l'alliberació al citoplasma de factors proapoptòtics com el citocrom-c, SMAC (de l'anglès *second mitochondria-derived activator of caspase*) i HtrA2/OMI que s'associa amb una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial, el qual pot ser bloquejat per proteïnes antiapoptòtiques com BCL-2/BCL-XL. L'alliberació de citocrom c promou la formació de l'apoptosoma, el qual inclou APAF1 (de l'anglès, *apoptotic protease activating factor 1*) i pro-caspasa9. L'activació autolítica de la caspasa-9 inicia la cascada efectora de caspases que inclou l'activació de caspasa-3 [74] (Figura 6).



**Figura 6. Esquema de les rutes extrínseca i intrínseca d'apoptosi en el context de la infecció pel VIH.** Figura adaptada de [75].

### 2.2.2 Autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular

En condicions fisiològiques, l'autofàgia és també un mecanisme essencial pel manteniment de la homeòstasi cel·lular i es caracteritza per la degradació lisosomal, el reciclatge de proteïnes i fins i tot òrgans enveïllats o alterats, especialment en situacions de restricció nutricional [76, 77]. En alguns casos, però, l'autofàgia acaba conduint a la mort cel·lular, com és el cas de l'autofàgia induïda per l'Env del VIH [71]. A més a més, alguns estudis suggereixen que l'autofàgia pot ser un requeriment per a la inducció d'apoptosi cel·lular [78, 79].

L'autofàgia s'inicia amb la formació dels anomenats autofagosomes, vacuoles de doble membrana que contenen porcions del citoplasma cel·lular. La primera proteïna que es va identificar a les membranes dels autofagosomes va ser la proteïna associada als microtúbuls LC3 (de l'anglès *Light Chain 3*) [80]. Així, la formació d'aquestes vacuoles pot observar-se per microscòpia electrònica i per microscòpia de fluorescència després de la sobreexpressió de LC3 acoblada a GFP. Aquests autofagosomes es fusionen amb lisosomes per a la degradació del material que contenen a través d'hidrolases lisosomals permetent el reciclatge dels components degradats. A més a més, la ruta endosòmica pot unir-se amb els processos autofàgics a través de la formació dels amfisosomes, unes vacuoles formades després de la fusió dels autofagosomes amb els endosomes tardans [60].

L'autofàgia és un mecanisme altament regulat per processos fisiològics a través de dues vies relacionades amb la ubiquitinació. Ambdós sistemes depenen de les proteïnes Atg (de l'anglès, *autophagy-related genes*) i les seves vies de senyalització. El primer sistema, Atg12 és activat per l'enzim E1-like Atg7, transferit cap a E2-like Atg10 i finalment conjugat a Atg5 per formar un precursor autofagosomal [81]. En el segon sistema, és Atg8 la proteïna activada per Atg7 i posteriorment transferida a Atg3 i finalment conjugada a la fosfatidil etanolamida [81]. A més a més, la fosfatidilinositol-3-cinasa, (cinasa PI3) es troba involucrada en els estadis primers de la formació dels autofagosomes i controla la via autofàgica a través de la seva associació amb Beclin-1 [82] (Figura 7).

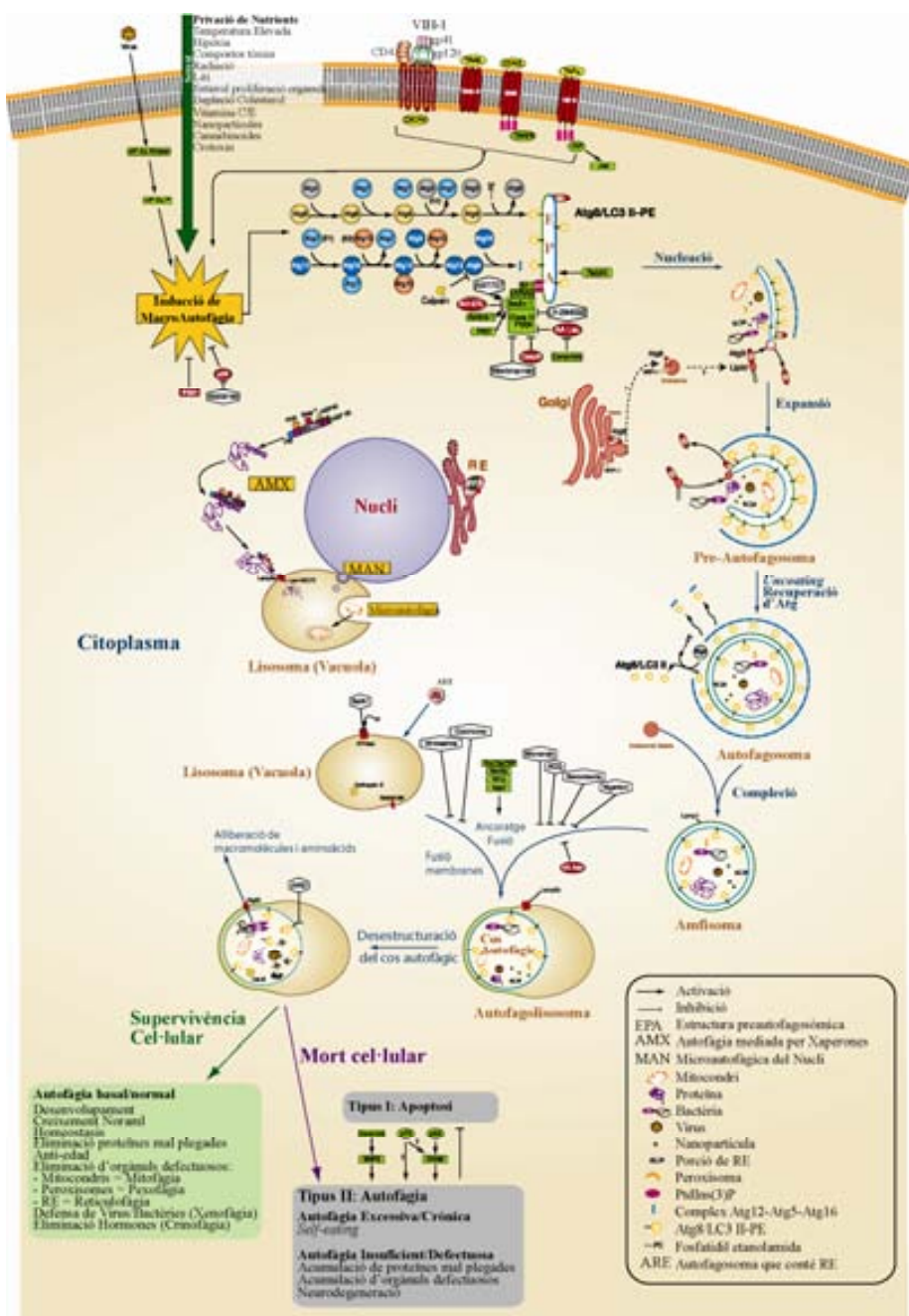


Figura 7. Representació de la ruta autofàgica de mort cel·lular. Figura adaptada de [83].

## 2.2 Factors virològics implicats en la destrucció de cèl·lules T CD4+

El VIH codifica diferents proteïnes (Tat, Vpr, Nef, Vpu, Vif, PR i Env) que han demostrat tenir efectes citopàtics sobre les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> infectades i també les no infectades [60]. L'efecte de l'expressió de Tat en les cèl·lules infectades pel VIH és controvertit degut als múltiples i complexos rols d'aquesta proteïna sobre els mecanismes de senyalització cel·lular. Mentre que alguns estudis demostren un efecte antiapoptòtic de Tat, d'altres han descrit la seva implicació en la inducció d'apoptosi via caspasa-8 o la desregulació de la producció de citocines com TGF- $\beta$ , TNF i IL-2 [60]. A més a més, Tat pot ser secretada des de les cèl·lules infectades i capturada per les cèl·lules no infectades adjacents en les quals acabarà induint processos apoptòtics interferint en diverses proteïnes senyalitzadores com són p56lck, cinases dependents de ciclines i NF- $\kappa$ B, induint l'alliberació de citocrom-c dels mitocondris o augmentant els nivells de Fas/FasL [60]. La dualitat funcional de Tat podria dependre de la seva concentració intracel·lular. El mateix escenari el trobem per a Vpr o Nef pels quals també s'ha descrit una activitat pro i antiapoptòtica possiblement dirigida per la seva concentració intracel·lular [60]. La proteïna Vpr expressada a baixes concentracions sembla que té un efecte més aviat antiapoptòtic, modulant proteïnes com Bcl-2 o Bax i, en canvi, quan s'expressa a altes concentracions el seu efecte és proapoptòtic, inhibint l'activació de NF- $\kappa$ B, activant les caspases-3 i -9 i aturant el cycle cel·lular en fase G2. A aquest últim efecte sembla que hi contribuiria també la proteïna Vif, ja que la deleció d'ambdues proteïnes aboleix l'aturada del cycle cel·lular [84]. Així, sembla que Vpr podria protegir les cèl·lules de morir per apoptosi en les fases primerenques de la infecció mentre que la seva expressió en fases tardanes conduiria a un augment de la susceptibilitat a l'apoptosi [60]. Nef té un efecte antiapoptòtic bloquejant senyals de mort cel·lular a través dels receptors R-TNF o Fas [85] i també pot inhibir l'apoptosi intrínseca bloquejant l'acció de la proteïna proapoptòtica Bad [86]. Per altra banda, també hi ha evidències de que Nef podria interferir en el nivell de potencial mitocondrial i l'activació de caspasa-3, induint apoptosi [87]. Vpu té la capacitat de formar canals iònics en bicapes lipídiques artificials, modificant la seva permeabilitat i augmentant la sensibilitat als senyals apoptòtics [88]. A més a més, l'expressió de Vpu a les cèl·lules T infectades augmenta la seva sensibilitat a l'apoptosis induïda per Fas [89]. La capacitat proteolítica de la PR no

es restringeix a les proteïnes víriques, sinó que s'ha demostrat que també pot afectar diverses proteïnes de la cèl·lula hoste, com són Bcl-2, caspasa-8 o proteïnes del citoesquelet, contribuint a la inducció d'apoptosi [90]. A més a més, el tractament *in vitro* de cèl·lules T amb inhibidors de la proteasa (IP) s'ha vist que redueix la susceptibilitat a l'apoptosi [91, 92] i, en individus infectats pel VIH, les teràpies basades en IP s'associen a una millora del recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i a una reducció de l'apoptosi de cèl·lules T dels pacients [93], tot i que també existeixen dades contradictòries en referència amb aquesta última observació [94].

Finalment, l'Env representa la proteïna vírica més extensament estudiada i relacionada amb la citopaticitat induïda pel VIH. En funció de la seva presentació (Env soluble secretada per les cèl·lules infectades, Env expressada a la superfície dels virions o bé a la membrana cel·lular de les cèl·lules infectades) els mecanismes que conduiran a l'aparició d'apoptosi cel·lular seran diversos [95]. Així, l'Env soluble es pot considerar un lligand de CD4 i de CCR5 o CXCR4 actuant com a molècula senyalitzadora a través d'aquests receptors. Per altra banda, la seva expressió a la superfície de les cèl·lules infectades li facilita la interacció amb les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> adjacents, jugant un paper decisiu en la inducció d'apoptosi en la població T CD4<sup>+</sup> *bystander* [66, 69, 70, 96]. En aquest context, és la responsable de diferents events: senyalització proapoptòtica i autofàgica a través del receptor/coreceptor, hemifusió de les membranes cel·lulars conduint a la mort de les cèl·lules diana, o la fusió completa d'ambdues membranes cel·lulars originant una cèl·lula gegant multinuclear anomenada sincici [95].

### 2.2.1 Citopaticitat induïda per l'Env del VIH

#### a. Citopaticitat induïda per gp120. Definició de Tropisme.

Gp120 pot induir apoptosi a través de la seva unió a la molècula CD4. En condicions fisiològiques, aquesta molècula funciona com a coreceptor pel complex format pel receptor de cèl·lules T (TCR) i CD3. No obstant, la unió a la molècula CD4 prèvia a l'estimulació a través del TCR condueix a l'augment de Fas en cèl·lules T i a l'expressió de FasL després de l'estimulació a través de CD3, susceptibilitzant-les per patir processos apoptòtics mediat per Fas [97]. A



més a més, l'expressió de FasL a la superfície de les cèl·lules T CD4 també afecta a la susceptibilitat d'apoptosi de les cèl·lules T CD8 [97]. En un individu VIH<sup>+</sup> és plausible que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades entrin en contacte sovint amb gp120 ja sigui a través de virions, de gp120 soluble o bé de l'Env expressada a la superfície de les cèl·lules infectades. Aquest fet és especialment rellevant en el teixit limfoide, el qual representa el principal reservori de la infecció vírica i la zona principal de presentació antigènica i activació limfocitària [95]. En estudis *in vitro* s'ha demostrat que la unió de gp120 a CD4 pot desencadenar un procés d'apoptosi depenent de Fas contribuint a la depleció de cèl·lules T CD4 [98]. A més a més, la unió intracel·lular entre gp120 i CD4 dins d'una cèl·lula infectada també pot resultar en la mort d'aquesta [99].

La unió de gp120 als coreceptors CCR5 i CXCR4 també s'ha relacionat amb la inducció d'apoptosi en aquest cas principalment en cèl·lules no infectades. La unió de l'Env a CCR5 expressat en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en repòs provoca apoptosi via augment de l'expressió de FasL i l'activació de caspasa-8. Al seu torn, la unió a CXCR4 condueix a apoptosi però per un mecanisme d'apoptosi intrínseca (independent de Fas), que cursa amb una despolarització mitocondrial, l'alliberació de citocrom-c al citoplasma i l'activació de les caspases 3 i 9 [60].

També s'ha associat la senyalització a través del CXCR4 amb la inducció de mort per autofàgia en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades [71]. A més a més, la presència d'autofàgia es va observar també en els sincicis, cèl·lules gegants multinucleades formades per la fusió entre una cèl·lula que expressa l'Env a la seva superfície i una cèl·lula que expressa CD4 i, en aquest cas, CXCR4 [71]. La inhibició de l'autofàgia induïda per l'Env vírica mitjançant inhibidors generals d'autofàgia (3-MA o BafA1) o bloquejant l'expressió de 2 gens involucrats en la via autofàgica (*Beclin 1* o *Atg7*) inhibia l'activitat de caspasa-3 i conseqüentment l'apoptosi i la mort les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades [71]. Remarcablement, no succeeix el mateix a la inversa, ja que la inhibició específica de l'apoptosi no bloquejava totalment la inducció de mort cel·lular, indicant que l'Env pot induir processos no apoptòtics de mort cel·lular amb característiques autofàgiques [71].

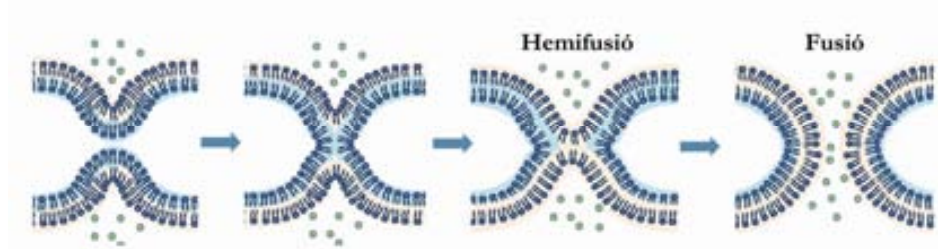
L'ús d'un o altre coreceptor, que depèn principalment del llaç V3 de gp120, determina el tropisme víric. Així, des de l'any 1998 es va establir una classificació del VIH que identifica les soques que utilitzen CCR5 (CCR5-tròpiques o R5), les soques que utilitzen CXCR4 (CXCR4-tròpiques o X4) i les soques que utilitzen

ambdós coreceptros (dual tròpiques o R5/X4) [100]. Ja als anys 80 es va relacionar el tropisme amb la virulència del VIH. En aquell moment es classificava el VIH segons la seva capacitat de produir sincicis, en la línia cel·lular MT-2 la qual expressava el coreceptor CXCR4 però no CCR5. Així, les soques es classificaven com a formadores de sincicis (SI, de l'anglès *Syncytium-Inducing*) o no formadores de sincicis (NSI, de l'anglès *Non-Syncytium-Inducing*). L'any 1988 Termsette et al. van descriure que les soques SI del VIH (que correspondrien a soques X4 o R5/X4) eren aïllades més freqüentment en individus en fase de sida que no pas les soques NSI (que correspondrien a les soques R5) [101]. Posteriorment, en un estudi longitudinal van confirmar l'associació entre la presència de soques SI del VIH i una accelerada progressió a sida i una menor taxa de supervivència després del diagnòs de sida [102]. El canvi de tropisme i la seva associació amb un pitjor pronòstic i progressió a sida s'ha demostrat també en models animals, de macacos infectats pel VIS [103]. La diferent presència de soques X4 i R5 en estadis finals de la infecció pel VIH s'ha relacionat amb el fet que generalment les soques víriques transmises a l'inici de la infecció solen ser soques R5 mentre que, generalment, les soques X4 emergeixen en fases posteriors de la infecció [104]. A més, s'ha observat que una deleció de 32 parells de bases al gen CCR5 pot prevenir la infecció pel VIH-1 [105, 106], suggerint una forta selecció per soques R5 durant la transmissió i la infecció primerenca. De fet tan sols s'ha descrit un únic cas d'infecció en un individu homozigot per la deleció 32 [107]. Ja que tant la unió a CXCR4 com la unió a CCR5 s'ha descrit que pot produir apoptosi en les cèl·lules T CD4+, la major citopaticitat associada a les soques X4 pot ser deguda, almenys en part, al fet que el coreceptor CXCR4 s'expressa en pràcticament totes les subpoblacions de cèl·lules T CD4+, mentre que l'expressió de CCR5 es troba restringida al 15-30% de les cèl·lules T CD4+, principalment en cèl·lules de memòria activades [108].

#### b. Citopaticitat induïda per gp41: fusió, hemifusió i inducció de NKp44L

La principal associació entre gp41 i la inducció de mort cel·lular és a través de la seva capacitat fusogènica, especialment en el context dels contactes cèl·lula-cèl·lula on l'Env és expressada a la superfície d'una cèl·lula infectada [66]. De fet, l'addició *in vitro* de virus lliure a un cultiu de cèl·lules T CD4+ primàries no

indueix mort cel·lular, mentre que si la mateixa quantitat d'Env és presentada a la superfície cel·lular la inducció d'apoptosi és altament eficient [96]. L'ús d'inhibidors del procés de fusió, com T20 o C34, aboleix la formació de sincicis i inhibeix completament l'apoptosi de les cèl·lules no infectades [96, 109]. La fusió entre dues membranes implica un pas intermediari, anomenat hemifusió [110, 111], durant el qual es produeix una interacció transitòria entre les capes lipídiques externes de les membranes sense que s'arribi a formar el porus de fusió ni existeixi contacte entre citoplasmes (Figura 8). Aquest procés resulta en un intercanvi de lípids entre les dues membranes que pot desencadenar la seva desestabilització induint senyals apoptòtics en la cèl·lula diana [69, 96]. Així, tant la fusió completa com aturada en l'etapa d'hemifusió poden induir apoptosi en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. La hemifusió sembla ser més rellevant que la fusió *in vivo* ja que els sincicis són rarament observats en pacients infectats pel VIH, concentrats al teixit limfoide com l'amígdala [112] o al cervell [95].



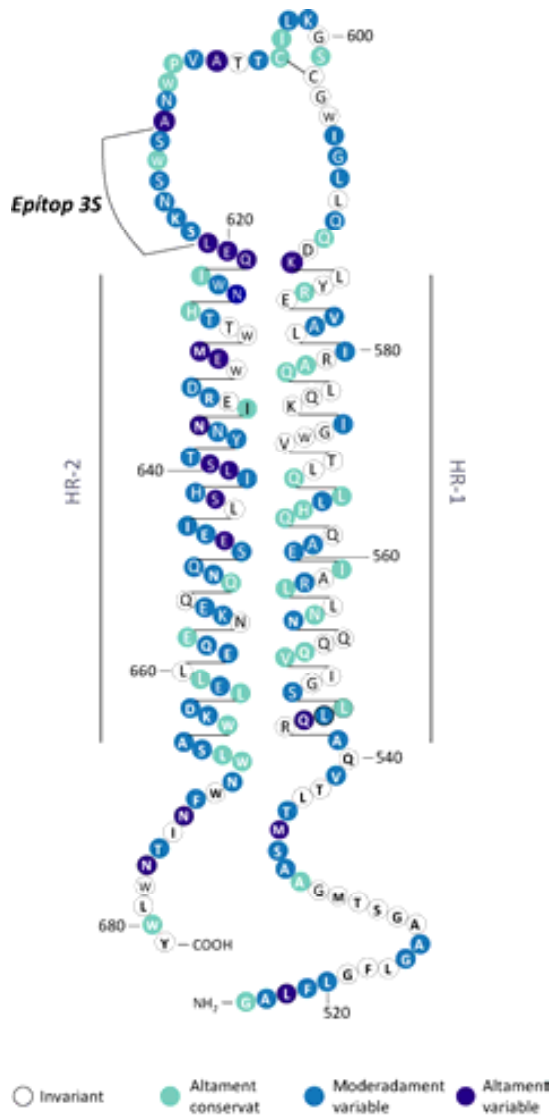
**Figura 8. Representació del procés de fusió entre bicapes lipídiques.** La hemifusió representa un intermediari del procés de fusió entre membranes durant el qual es produeix un intercanvi de lípids entre les membranes sense intercanvi de material citoplasmàtic. Figura adaptada de [111].

Els sincicis presenten una elevada inestabilitat i entren en apoptosi a les 48-72 hores aproximadament després de la seva formació [113]. En aquest cas l'apoptosi està mediada per la via intrínseca mitocondrial [60].

El paper de l'hemifusió en cultius mixtes de cèl·lules infectades i no infectades s'ha demostrat per la inhibició completa de l'apoptosi de cèl·lules individuals a través de l'inhibidor de fusió C34 (o T20) i per la presència de lípids procedents de la cèl·lula efectora Env<sup>+</sup> en les cèl·lules no infectades que pateixen processos apoptòtics en absència d'intercanvi de material citoplasmàtic entre ambdues [68,

96]. En aquest cas la ruta apoptòtica és independent de p53, però sí que requereix de l'activació de caspasa-3 prèvia a la despolarització mitocondrial [68]. A més a més s'ha observat una elevada presència d'espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*) a les cèl·lules apoptòtiques, signe d'estrès oxidatiu [68].

Addicionalment, l'any 2005, Vieillard et al. van descriure un nou mecanisme de mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades que relaciona gp41 amb l'activitat citotòxica de les cèl·lules NK [114]. La interacció de gp41 amb les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades induïx l'expressió a la seva superfície del lligand NKp44L, la qual cosa provoca que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> siguin susceptibles de ser lisades per una cèl·lula NK activada que reconegui el lligand a través del receptor NKp44 [114]. Recentment, el mateix grup, ha descrit que la interacció entre gp41 i les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> succeeix a través de la unió d'un motiu altament conservat de gp41 anomenat 3S (situat al llaç entre les 2 regions helicoidals HR-1 i HR-2, Figura 9) i el receptor per domini globular de C1q (gC1qR) de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> [115]. L'expressió en superfície de NKp44L en individus VIH<sup>+</sup> correlaciona directament amb la CV i indirectament amb el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> [114]. A més a més, la translocació del lligand a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> s'inhibeix per respostes humoral contra l'epítip 3S tant en individus infectats pel VIH com en macacos infectats pel virus quimera SHIV (de l'anglès, *simian-human immunodeficiency virus*) [116-118], i la desaparició dels anticossos anti-3S al llarg de la progressió a sida coincideix amb la depleció de cèl·lules T CD4 i l'augment de l'expressió de NKp44L a la seva superfície [116, 119].

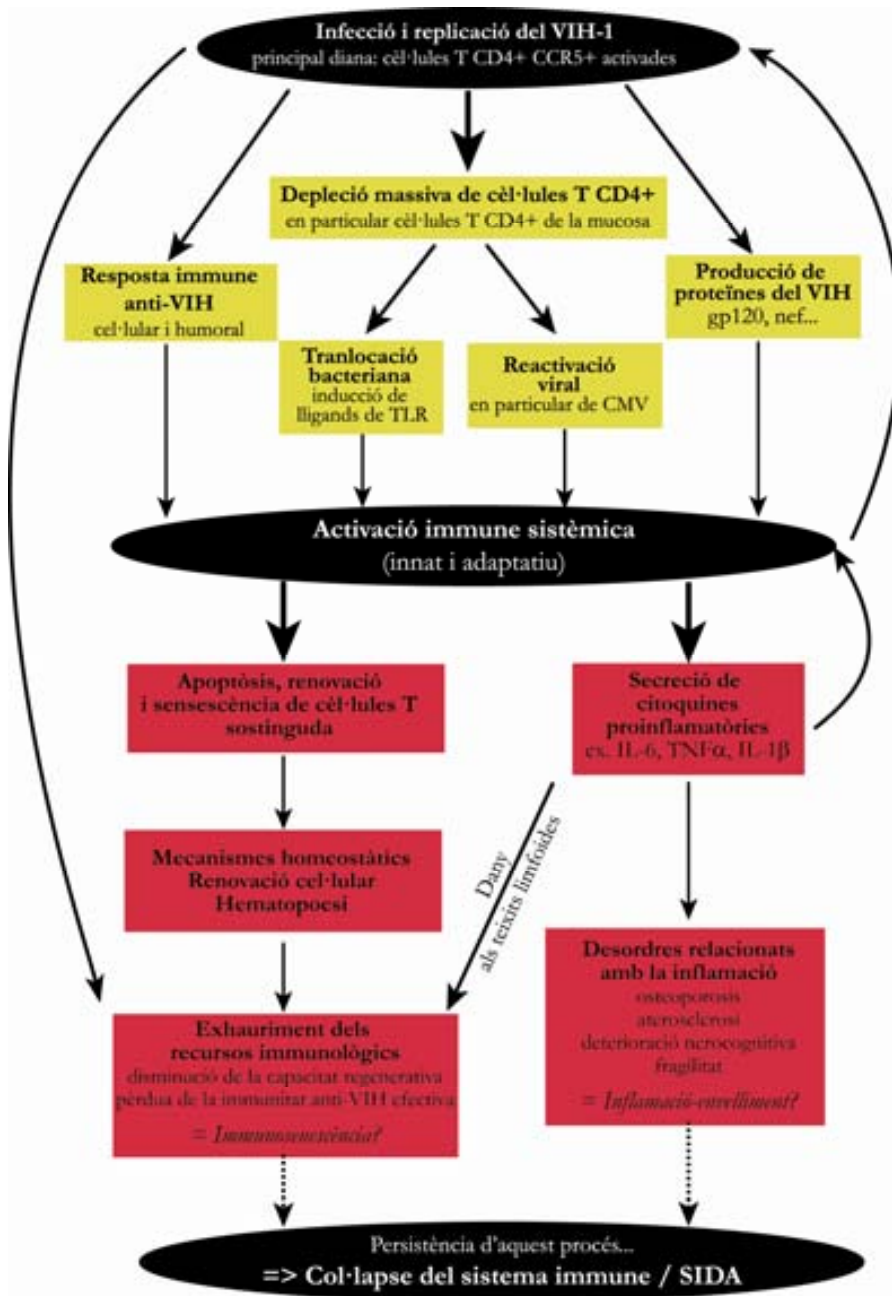


**Figura 9. Situació i variabilitat de l'epítip 3S de gp41.** Esquema de la seqüència de l'ectodomini de gp41, amb els dominis HR-1 i HR-2, el llaç intermedi i l'epítip 3S. Els colors dels aminoàcids representen la seva variabilitat en funció dels valors d'entropia calculats a partir de l'alineament de 123 seqüències de subtipus B. Color blanc, invariant (valor d'entropia de zero); blau clar, altament conservat (valor d'entropia per sota de la mediana, que correspon a l'observació d'una única substitució); blau fosc, moderadament variable (valor d'entropia per sobre de la mediana: observació de dues o més substitucions); lila, altament variable (el 10% dels valors d'entropia més elevats, >0.8). La numeració correspon a l'Env de la soca vírica de referència HXB-2. Figura adaptada de [120].

## 2.3 Factors immunològics

### *2.3.1 Hiperactivació immune*

La infecció pel VIH resulta en una elevada activació i renovació de les cèl·lules del sistema immunològic, accelerant tant la producció com la destrucció de cèl·lules T CD4+. Una forta resposta immune és, a priori, beneficiosa pel control de la replicació vírica. Tot i això, independentment de la CV, una activació aberrant, crònica i elevada del sistema immune pot contribuir directament a la depleció progressiva de cèl·lules T CD4+ [121-124] (Figura 9). De fet, l'activació immune té un valor predictiu per a l'apoptosi de cèl·lules T CD4+ superior a la pròpia virèmia plasmàtica [125, 126]. A més a més, la hiperactivació immune no tan sols determina la progressió de la infecció sinó que també influeix en la resposta al tractament anti-retroviral (TAR). La pobre recuperació de cèl·lules T CD4+ observada en alguns pacients, tot i aconseguir nivells indetectables de CV gràcies al TAR de gran activitat (TARGA), s'ha associat a una elevada activació de les cèl·lules T CD4+ i CD8+ [127, 128]. A part de l'increment de la freqüència de cèl·lules T amb un fenotip d'activació, aquesta també es manifesta en una activació policlonal de les cèl·lules B, una elevada renovació de cèl·lules T, i un augment en els nivells de quimiocines i citocines proinflamatòries en sèrum, entre d'altres vies [64]. L'elevada renovació de les cèl·lules T CD4 i CD8, altera els seus mecanismes homeostàtics i acaba resultant en una disminució general de la vida mitja de les cèl·lules T. Remarcablement, la inducció d'activació immune genera, a més, noves dianes per a la replicació vírica [64]. Per altra banda, el dany inflamatori generat als teixits limfoides pot provocar una disfunció tímica i una fibrosi dels nodes limfàtics vehiculades per TGF- $\beta$ , ambdues associades a una retenció anormal de les cèl·lules efectores de tipus T [64].



**Figura 9. Model de la patogènesis associada al VIH.** Diagrama de les causes (en groc) i conseqüències (en vermell) de l'activació immune. Les conseqüències hipotètiques de l'activació immune que presenten un paral·lelisme amb l'envelliment humà s'han escrit en cursiva. Esquema adaptat de [129].

Les causes de l'hiperactivació immune són diverses i estan relacionades amb la replicació vírica tan de manera directa com indirecta (Figura 9). Durant la fase aguda de la infecció, el VIH indueix una forta resposta de les cèl·lules T, especialment de les cèl·lules T CD8+, que pot persistir durant la fase crònica de la infecció deguda a la constant replicació del virus. De fet s'ha calculat que en individus no tractats i crònicament infectats pel VIH gairebé el 20% de les cèl·lules T CD8+ circulants poden ser VIH-específiques [130]. Tot i això, la magnitud de l'activació observada durant el curs de la infecció pel VIH és tal que l'estimulació per antigens del VIH no és suficient per a justificar-la. Diversos estudis *in vitro* suggereixen que productes del VIH (com gp120 o Nef) poden induir directament l'activació dels limfòcits i els macròfags, i la producció de citocines i quimiocines proinflamatòries. Tot i això, la rellevància fisiològica d'aquests processos roman incerta [129].

Per altra banda el VIH pot causar activació immune i inflamació a través de mecanismes indirectes. Durant el curs de la infecció, la depleció de cèl·lules T CD4+ pot resultar en un control immunològic subòptim d'altres infeccions cròniques com poden ser la infecció per citomegalovirus (CMV) o virus d'Epstein-Barr (EBV), permeten la seva reactivació i replicació. Així aquestes infeccions addicionals contribuirien a l'estimulació antigènica del sistema immune [129]. Finalment, una de les causes conegudes de la hiperactivació és la translocació bacteriana, la qual també s'ha relacionat amb la progressió de la infecció [131] (Figura 9). La mucosa del tracte gastrointestinal (GI) forma una barrera estructural i immunològica contra els microorganismes externs i és on es concentren la majoria de limfòcits [132]. Durant la fase aguda de la infecció pel VIH la majoria de cèl·lules T CD4+ del tracte GI són destruïdes possiblement com a resultat directe de la infecció. La depleció de cèl·lules T CD4 al tracte GI, a més, continua al llarg de tot el curs de la malaltia i s'associa a una enteropatia caracteritzada per l'aparició de diarrea, un increment de la inflamació GI i de la permeabilitat intestinal i malabsorció [133]. Aquest escenari és el que afavoreix la translocació de productes microbians al sistema circulatori contribuint a l'estat d'activació del sistema immunitari i a un pitjor pronòstic i progressió de la malaltia [127, 131].



### 2.3.2 Activitat citotòxica de macròfags, cèl·lules NK i limfòcits T citotòxics.

A part de l'apoptosi induïda per la pròpia activació cel·lular, s'ha vist que els macròfags i els monòcits derivats d'individus infectats pel VIH poden induir la mort de cèl·lules T CD4 no infectades autòlogues a través del sistema Fas/FasL [134]. Els macròfags expressen nivells basals de FasL que augmenten significativament amb la infecció pel VIH, i els monòcits d'individus VIH+ presenten nivells de FasL significativament superiors als monòcits derivats d'individus sans. S'ha observat que els macròfags infectats (i en menor mesura els no infectats) maten les cèl·lules T diana Fas-susceptibilitzades de manera dependent de Fas/TNF i sense restriccions del complex d'histocompatibilitat principal [134]. Aquest mecanisme de mort vehiculat per macròfags, a més, sembla que és selectiu per les cèl·lules T CD4 no infectades [134, 135].

En relació amb les cèl·lules NK, dades epidemiològiques suggereixen que l'activitat lítica de les cèl·lules NK juga un paper important en el control de la replicació vírica a través del reconeixement de cèl·lules infectades a través d'una xarxa de receptors anomenats KIR (de l'anglès *killer immunoglobulin-like receptors*) [136]. A més a més, tal com s'ha descrit anteriorment, la citotoxicitat de les cèl·lules NK també s'ha associat amb la mort de cèl·lules T CD4+ no infectades a través d'un mecanisme relacionat amb l'Env que provoca l'expressió del lligand NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4+ i la seva lisis posterior vehiculada per cèl·lules NK activades que expressen el receptor NKp44 [114].

La resposta citotòxica mediada per CTL també pot contribuir a la destrucció de les cèl·lules T CD4+ infectades. S'ha demostrat que, dins dels diferents subgrups de limfòcits, les cèl·lules T són més susceptibles que les cèl·lules B o NK a l'activitat lítica dels CTL, essent les cèl·lules T CD4 més susceptibles que les cèl·lules T CD8 [137]. A més a més, dins dels diferents llinatges, la susceptibilitat a la lisis per CTL és superior pels subgrups més diferenciats en comparació amb les cèl·lules naïve, i per exemple, les cèl·lules T CD4 de memòria CCR5+ presenten una susceptibilitat incrementada unes 10 vegades mentre que les cèl·lules naïve o en repòs presenten una elevada resistència a la lisis per CTL. Aquestes observacions aporten una nova explicació per a la pèrdua específica de cèl·lules T memòria CCR5+ que succeeix durant la infecció crònica per VIH [137].

### 3. Diferent progressió de la infecció pel VIH-1 i pel VIS

#### 3.1 Classificació

Tot i que en la majoria de pacients l'evolució de la infecció pel VIH-1 és tal com s'ha descrit anteriorment, amb una durada mitjana de la fase latent de la infecció d'uns 8-10 anys [138], existeixen grups minoritaris que presenten una evolució de la infecció amb una dinàmica marcadament diferent. Per una banda, els individus Ràpid Progressors (RP), que representen aproximadament el 5% dels individus infectats per VIH-1 [138], presenten una progressió a sida accelerada, amb una dràstica davallada del nombre de cèl·lules T CD4+ i la manifestació de símptomes definitoris de sida durant els primers tres anys des de la seroconversió. En alguns casos més severes, la progressió a sida es dona, fins i tot, durant el primer any després de la infecció (0,5%) [138, 139]. A l'altre extrem hi trobem un grup d'individus en els quals no s'observa una progressió de la malaltia presentant una estabilitat clínica i immunològica durant més de 10 anys en absència de TAR (no progressors a llarg termini, LTNP, de l'anglès *long term non progressors*) [140, 141]. Dins d'aquest grup de pacients, que representa el 5-15% dels individus infectats per VIH-1, hi podem distingir diferents subgrups en funció del control que presenten sobre la replicació vírica: controladors d'elit (LTNP-CE), amb CV indetectables; controladors virèmics (LTNP-CV), amb CV inferiors a les 2.000 còpies d'ARN/ml; i virèmics no controladors (LTNP-NC), amb CV superiors a les 2.000 còpies d'ARN/ml (Taula 1) [142]. Dins el grup de LTNP-NC, una petita part dels individus presenten CV superiors a les 10.000 còpies d'ARN/ml i tot i així mantenen constant i elevat (>500 cèl·lules/ $\mu$ l) el nombre de cèl·lules T CD4+, pacients virèmics no progressors (LTNP-VNP o VNP).

Taula 1. Definició dels diferents grups de progressió clínica de la infecció pel VIH.

<b>LTNP-CE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecció pel VIH asimptomàtica durant 10 anys des de la seroconversió</li> <li>• Nivells plasmàtics d'ARN del VIH, en absència de TAR, inferiors al límit de detecció dels assajos disponibles (&lt;50 còpies per PCR)</li> <li>• Episodis aïllats de virèmia superior a 1.000 còpies ARN/ml sempre que no siguin consecutius i representin la minoria de les determinacions disponibles.</li> <li>• Determinació longitudinal de l'ARN víric (mínim de 3 determinacions i en absència de TAR), cobrint almenys un període de 12 mesos.</li> </ul>
<b>LTNP-CV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecció pel VIH asimptomàtica durant 10 anys des de la seroconversió.</li> <li>• Nivells d'ARN víric sense TAR igual o inferiors a 2.000 còpies/ml.</li> <li>• Episodis aïllats de virèmia superior a 2000 còpies ARN/ml sempre que representin la minoria de les determinacions disponibles.</li> <li>• Determinació longitudinal de l'ARN víric (mínim de 3 determinacions i en absència de TAR), cobrint almenys un període de 12 mesos.</li> </ul>
<b>LTNP-NC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecció pel VIH asimptomàtica durant 10 anys des de la seroconversió</li> <li>• Nivells plasmàtics d'ARN víric superiors a 2.000 còpies/ml sense TAR, en més del 50% de les mostres.</li> </ul>
<b>LTNP-VNP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nivells plasmàtics d'ARN víric sempre superiors a 10.000 còpies/ml</li> <li>• Valors de limfòcits T CD4+ superiors a 400 cèl·lules/<math>\mu</math>l amb una pèrdua inferior a 50 cèl·lules/<math>\mu</math>l/any</li> <li>• Complir els criteris anteriors durant un període mínim de 2 anys en absència de TAR</li> </ul>
<b>P</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecció simptomàtica per VIH o inici de TAR abans dels 10 anys des de la seroconversió</li> <li>• Determinació longitudinal de l'ARN víric (mínim de 3 determinacions i en absència de TAR), amb un set-point superior a les 2.000 còpies/ml.</li> </ul>
<b>RP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 2</math> determinacions de cèl·lules T CD4 per sota de les 350 cèl·lules/mm<sup>3</sup> durant els 3 primers anys després de la seroconversió, sense cap valor <math>\geq 350</math> cèl·lules/mm<sup>3</sup> posterior en absència de TAR.</li> <li>• i/o, TAR iniciat dins dels 3 primers anys després de la seroconversió, i almenys una determinació precedent de cèl·lules T CD4 &lt;350 cèl·lules/mm<sup>3</sup>.</li> <li>• i/o, sida o mort relacionada amb la sida durant els 3 primers anys després de la seroconversió i almenys una determinació precedent de cèl·lules T CD4 &lt;350 cèl·lules/mm<sup>3</sup>.</li> </ul>

LTNP-CE: de l'anglès *long term non-progressor*, controladors d'elit; LTNP-CV: de l'anglès *long term non-progressor*, controladors virèmics; LTNP-NC: de l'anglès *long term non-progressor*, no controladors; LTNP-VNP: de l'anglès *long term non-progressor*, virèmics no progressors; P: progressors crònics; RP: Ràpid progressors. TAR: Tractament antiretroviral. Taula adaptada de Casado C et al. [142].

En primats no humans, la infecció per VIS també resulta en diferents manifestacions clíniques. En els seus hostes naturals, com és el cas dels mangabeis de collar (*Cercocebus atys*) o en cercopitecs verds africans (*Cercopithecus aethiops*) la infecció és asimptomàtica i no progressa tot i presentar una replicació vírica activa i molt elevada (de l'ordre de  $10^5$ - $10^7$  còpies ARN/ml) [143, 144]. En canvi, quan el virus ha passat a infectar una nova espècie, com són els macacos rhesus (*Macaca mulatta*) o macacos de cua de porc (*Macaca nemestrina*), la infecció presenta CV comparables als casos anteriors però en aquest cas sí que esdevé patogènica i indueix una síndrome d'immunodeficiència semblant a la sida en humans [145-147]. Infeccions *in vitro* de macacos rhesus han resultat en una progressiva depleció dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> circulants, l'aparició d'infeccions oportunistes per patògens com el *Pneumocystis jirovecii*, micobacteris i citomegalovirus i un increment en el risc de desenvolupar limfomes [148, 149].

Així doncs, la infecció per VIS en diferents espècies de primats no humans en paral·lel amb la infecció pel VIH en individus VNP i RP suggereix que la CV, tot i que s'ha demostrat la seva associació amb la davallada de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i amb diferents estadis de la malaltia [150], no és suficient, per sí sola, per explicar els diferents models de progressió de la malaltia i que, per tant, altres factors virològics i/o immunològics juguen també un paper important en la determinació de la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i la conseqüent progressió de la infecció cap a estadis de sida.

### 3.2 Factors que influencien la diferent progressió de la infecció per VIS

En relació amb la diferent manifestació de la infecció per VIS en diverses espècies de primats no humans, sembla ser que la diferència més rellevant entre ambdós fenotips consisteix principalment en l'activació del sistema immunitari. Nombrosos estudis han demostrat l'associació de la infecció en macacos amb una depleció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> lligada a una activació immune generalitzada i atípica, amb una elevada presència de cèl·lules T apoptòtiques o proliferants, una elevada freqüència de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> efectores actives i hiperplàsia dels òrgans limfoides entre d'altres manifestacions [145]. En canvi, la infecció en mangabeis de collar, en la qual s'observa un manteniment del recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en el 80-90% dels animals, es caracteritza per presentar baixos

nivells d'activació immune al llarg de la fase crònica de la infecció [143, 145, 151], amb un manteniment de les poblacions de limfòcits T i de la seva capacitat regenerativa i baixos nivells d'apoptosi [151]. L'arquitectura dels nodes limfàtics, així com el seu nombre, també es manté sobre valors normals tot i la infecció per VIS i la seva elevada taxa de replicació [143]. En la fase aguda de la infecció, però, la dramàtica destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de les mucoses, especialment de l'intestí, descrita en els individus VIH<sup>+</sup> i en les infeccions patogèniques de VIS en macacos, també es produeix en els hostes naturals del VIS, sense que aquest fet determini la progressió de la malaltia [152]. A més a més, en un reduït nombre de casos (<2%) s'ha observat una disminució de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> arribant a nivells inferiors a les 50 cèl·lules/ $\mu$ l, però tot i això aquests animals no desenvolupen signes de sida i, tot i presentar nivells d'activació més elevats que els animals que conserven alts nivells de limfòcits T CD4, l'activació general del seu sistema immune continua essent inferior a la que s'observa en individus infectats pel VIH [153]. Diferents factors semblen contribuir a l'absència d'hiperactivació del sistema immune en els hostes naturals del VIS. S'ha observat que es produeix una resposta immune antiviral vigorosa però transitòria, amb una marcada activació primerenca de les respostes d'interferó de tipus I de les cèl·lules dendrítiques plasmàtiques (CDp) que s'atenuen notablement en la transició cap a l'etapa crònica de la infecció, mentre que són mantingudes en les infeccions patogèniques per VIS en macacos [154]. A més a més, també s'ha descrit que la resposta citotòxica T CD8<sup>+</sup> VIS-específica és realment limitada en els mangabeis infectats per VIS [151, 155]. Un altre factor que podria contribuir a la manca d'hiperactivació immune és l'absència de translocació microbiana durant la fase crònica de la infecció [131, 152] que es produeix a causa del deteriorament de la mucosa intestinal contribuint a l'hiperactivació del sistema immune en infeccions patogèniques per VIS o VIH [131]. En alguns casos s'ha observat la presència de translocació microbiana en infeccions no-progressives de mangabeis de collar, però aquesta és marcadament transitòria i restringida a la fase aguda [152]. Finalment, un nou mecanisme relacionat amb l'expressió del receptor o coreceptor del VIS s'ha associat, recentment, amb la manca de progressió en mangabeis de collar i cercopitecs verds africans. En ambdós casos, el resultat final és la protecció de la infecció de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de memòria central, contribuint al manteniment de la homeòstasi de les cèl·lules T i limitant l'activació immune. En el cas dels

mangabeis de collar s'ha descrit una regulació de l'expressió del coreceptor CCR5 en aquest subpoblació cel·lular [156] i, en canvi, en el cas dels cercopitecs verds africans s'ha vist que es produeix una disminució de l'expressió de la molècula CD4 en la transició de les cèl·lules naïve cap a memòria [157].

### 3.3 Factors que influencien la diferent progressió de la infecció pel VIH

En el cas de la infecció pel VIH, els nivells d'activació immune estan clarament associats a la progressió de la infecció, a una depleció més ràpida de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i a la disminució de la supervivència en infeccions cròniques [64, 124, 158, 159]. Tot i això, no hi ha evidències tan clares com en el cas de la replicació no citopàtica del VIS en primats no humans d'una marcada disminució de l'activació en individus VIH<sup>+</sup> que mantenen constant i elevat el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> tot i presentar una replicació vírica activa i elevada (individus VNP). La manca de dades, és deguda, principalment, a l'extremada baixa freqüència d'aquest grup de pacients dificultant la seva identificació i caracterització. Tanmateix, un estudi de l'any 2007 apuntava cap a una disminució de l'activació i la proliferació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> en pacients VNP, però tant sols incloïa 3 pacients amb aquestes característiques i les diferències observades en l'expressió dels marcadors d'activació CD38 i HLA-DR no arribaven a ser estadísticament significatives, però sí que ho eren les diferències en el marcador de proliferació Ki67 [160]. En pacients LTNP-EC, sí que s'ha vist una disminució de l'activació de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> en comparació amb pacients amb una progressió estàndard [161, 162]. Tot i això, els valors d'activació continuen essent superiors als observats en individus VIH negatius i fins i tot superiors, en el cas de les cèl·lules T CD8, en comparació amb individus amb CV controlades gràcies al TAR [161]. Tanmateix, la correlació entre l'estat d'activació dels limfòcits i la pèrdua de cèl·lules T CD4 presenta resultats controvertits, associant-se a un menor recompte de cèl·lules T CD4 en alguns casos [161] o no correlacionant-se amb la dinàmica de depleció de cèl·lules T CD4 observada en alguns LTNP-EC en d'altres casos [162].

Factors alternatius, tant virològics com genètics, s'han estudiat extensament i s'han relacionat tant amb la ràpida progressió com amb la no progressió. Per una banda, la transmissió de soques víriques amb un tropisme dual (R5/X4) o

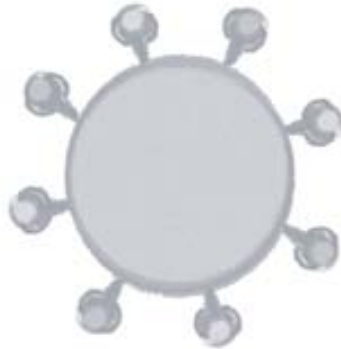
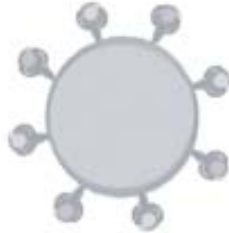
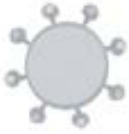
bé la presència de la combinació de soques víriques R5 i X4 amb elevada capacitat replicativa als inicis de la infecció s'ha relacionat amb una ràpida i dràstica progressió a sida (en menys d'1 any) en pacients joves [139]. No obstant això, en altres cohorts d'individus amb ràpida progressió a sida en un interval de temps de fins a 3 anys no s'han identificat soques víriques capaces d'utilitzar CXCR4 com a coreceptor [142]. Pel que fa a factors genètics, la presència de certs al·lels d'HLA com ara HLA-B\*35Px (el qual presenta un elevat desequilibri de lligament amb l'al·lel HLA-Cw\*04), s'han associat amb una ràpida progressió a sida [163-165] mentre que d'altres al·lels, principalment HLA-B\*27 i HLA-B\*57, s'han associat a un millor pronòstic prevenint la progressió a sida [163, 165]. A més a més, la concordança d'al·lels d'HLA entre individus en la transmissió horitzontal del VIH-1 s'ha identificat també com un factor de risc de ràpida progressió. L'adaptació del virus a l'individu transmissor provoca l'aparició de mutacions d'escapament a la resposta CTL de manera que s'observa una absència de resposta citotòxica mitjançada per CTL en l'individu receptor quan ambdós tenen en comú almenys 3 al·lels d'HLA [139]. De fet, la manca de resposta CTL, ja sigui per la raó esmentada anteriorment o bé per un defecte en la resposta immune innata o adaptativa de l'individu, està associada a un pitjor pronòstic [139], mentre que una resposta CTL potent i polifuncional s'ha associat a un control de la virèmia en individus LTNP-EC [166, 167].

En un anàlisi a nivell transcripcional de la població de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, s'han identificat 4 gens (*CASP1*, *CD38*, *LAG3* i *TNFSF13B*) sobreexpressats tan en macacos rhesus com en RP i 2 gens (*SOCS1* i *EEF1D*) sobreexpressats específicament en mangabeis de collar i individus VNP [168]. Els gens sobreexpressats en RP i macacos estan relacionats amb processos inflamatoris i apoptòtics (Precursor de Caspasa-1, *CASP1*), esgotament immunològic i activació (*CD38*), homeòstasi de les cèl·lules T i la seva funció reguladora (*LAG3*) i l'estimulació de les funcions de cèl·lules B i T i la regulació de la resposta humoral (liligand de TNF membre de la superfamília 13B, *TNFSF13B*). Per altra banda, *SOCS1* (de l'anglès *suppressor of cytokine signaling*) està involucrat en la regulació de la transducció de senyals per citocines a través de la ruta de JAK/STAT5 [168].

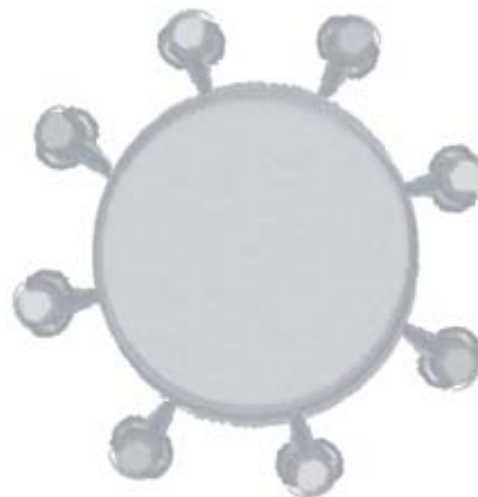
Finalment sembla que la translocació bacteriana també podria ser diferent en individus RP *versus* VNP. La quantificació de CD14 soluble (sCD14), que és

produït pels monòcits quan són activats per LPS, s'utilitza com a mesura de les respostes de l'hoste a productes bacterians que s'hagin translocat al torrent sanguini i constitueix un predictor independent de la mortalitat en la infecció pel VIH [169]. En aquesta línia, *Rotger et al* van determinar els nivells de sCD14 en plasma de pacients RP, progressors crònics i VNP i van observar que la presència de sCD14 en individus RP era superior en comparació amb els individus progressors crònics, un grup control de donants sans i també en comparació amb 3 dels 4 pacients VNP estudiats [168].





## **HIPÒTESIS I OJECTIUS**





## **Hipòtesis i objectius**

La citopaticitat de l'Env està estretament relacionada amb la seva funció i contribueix extensament a la destrucció massiva de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que es produeix durant la infecció per VIH-1. L'estudi dels diferents factors que caracteritzen la citopaticitat de l'Env, com són la fusogenicitat o el tropisme, requereix el desenvolupament de models *in vitro* que permetin avaluar i comparar les característiques de diferents Env així com també determinar els mecanismes que condueixen a la mort cel·lular.

→ **Objectiu 1:** Desenvolupar un mètode *in vitro* per a l'anàlisi de la capacitat fusogènica i el tropisme de l'Env del VIH-1.

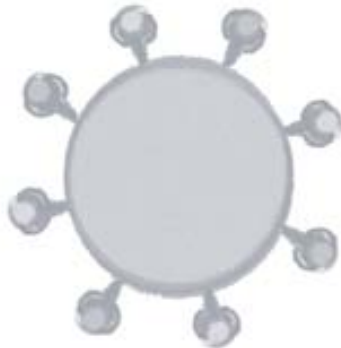
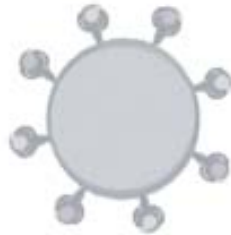
→ **Objectiu 2:** Avaluar la relació entre la capacitat fusogènica i hemifusogènica de l'Env del VIH-1 i la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> per apoptosi i autofàgia.

*In vivo*, la presència dels diversos tipus cel·lulars del sistema immunitari així com la resposta humoral i cel·lular generada afegeixen complexitat a l'estudi de la citopaticitat del VIH-1. En particular, l'Env pot provocar la mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de manera directa, a través de la interacció amb els coreceptors (tropisme) i la seva capacitat fusogènica, i també de forma indirecta, a través de la inducció per part de gp41 del lligand de cèl·lules NK NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. A més a més, els diferents mecanismes estan modulats per la resposta humoral anti-Env. La caracterització de tots aquests processos en individus VIH<sup>+</sup> que presenten una replicació no citopàtica del VIH (virèmics no progressors, VNP) *versus* individus que presenten una replicació altament citopàtica del virus (ràpid progressors, RP), pot proporcionar evidències de la seva contribució relativa en la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *in vivo*.

→ **Objectiu 3:** Determinar la citopaticitat de l'Env del VIH-1 aïllada de pacients VNP i RP analitzant el tropisme víric, la capacitat fusogènica i la inducció (per part de gp41) de l'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>.

→ **Objectiu 4:** Caracteritzar la resposta humoral anti-Env dels pacients VNP i RP avaluant la presència d'anticossos contra gp120, d'anticossos contra la regió 3S de gp41 i d'anticossos amb activitat neutralitzant.





# **MATERIALS I MÈTODES**





## 1. Descripció dels pacients

Es van seleccionar individus VIH+ classificats en 2 grups: pacients virèmics no progressors (VNP) i pacients ràpid progressors (RP).

Els **pacients VNP** es caracteritzen per presentar una replicació no citopàtica del VIH definida seguint els criteris següents:

- Càrrega viral (CV) documentada superior a 10.000 còpies d'ARN/ml
- Nivells de cèl·lules T CD4+ superiors a 400 cèl·lules/ $\mu$ l
- Pèrdua de cèl·lules T CD4+ inferior a 50 cèl·lules/ $\mu$ l/any.

En el cas dels **pacients RP**, la ràpida progressió a sida es va definir mitjançant els següents criteris:

- CV documentada superior a les 10.000 còpies d'ARN/ml
- Seroconversió documentada per un test negatiu durant un període màxim d'1 any anterior al primer test positiu.
- Nivell de cèl·lules T CD4+ inferior a 350 cèl·lules/ $\mu$ l durant els primers 3 anys posteriors a la seroconversió.

Es van identificar quatre pacients VNP que no havien rebut teràpia antiretroviral durant un període mínim de dos anys (i que eren naïf per a inhibidors de fusió) a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona). Paral·lelament, es van identificar cinc pacients RP al Centro Sanitario Sandoval (Madrid).

Les mostres procedents d'individus sans van ser proporcionades pel banc de sang local (Banc de Sang i de Teixits, BST, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona). També es van obtenir mostres de sang de cordó umbilical obtingudes de processos de cesària (Montpeller, França.)

Tots els procediments van seguir la Declaració de Helsinki de 1975 (revisada al 1983).

## 2. Cèl·lules

### 2.1 Cèl·lules primàries.

Es van obtenir cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) a partir de residus leucocitaris de sang perifèrica i mostres de sang de cordó umbilical (en el cas dels donants sans) o bé de mostres de sang perifèrica total (en el cas dels individus VIH+ tant VNP com RP).

En tots els casos, les CMSP es van purificar mitjançant un gradient estàndard de densitat de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, Axis-Shield, Oslo, Noruega). Un cop centrifugat (durant 30 minuts a 1850 rpm) es van obtenir 3 fases : una capa superior de líquid grogós que contenia la majoria del plasma, una capa inferior de fluid vermellós que contenia la majoria de cèl·lules vermelles de la sang i una fina capa intermèdia que contenia les CMSP. Es va recollir la capa intermèdia i després de rentar-la 2 vegades amb PBS a l'1% es va resuspendre amb medi *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Invitrogen, Madrid, Espanya) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF, Invitrogen, Madrid, Espanya) inactivat prèviament per calor (1 hora a 56°C).

Les CMSP obtingudes es van criopreservar amb medi de congelació: SBF amb DMSO al 10% (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) o, alternativament, es van utilitzar immediatament per a la purificació de cèl·lules T CD4+.

Les cèl·lules T CD4+ procedents de CMSP obtingudes de sang perifèrica de donants sans es van purificar (>95%) per selecció immunomagnètica positiva (Miltenyi-Biotec, Madrid, Espanya). Les cèl·lules T CD4+ procedents de CMSP de cordó umbilical es van purificar per selecció negativa utilitzant el *kit* comercial *Human CD4 T cell Enrichment cocktail* (StemCell Technologies, Grenoble, França).

### 2.2 Línies cel·lulars

#### 2.2.1 Cèl·lules adherents

La línia cel·lular embrionària de ronyó **293T** (CD4-, CCR5-, CXCR4-) és un derivat de la línia 293 a la qual se li va insertar el gen de l'antigen T del *Simina Virus* 40 (SV40) [170] . És una línia cel·lular altament permissiva a la transfecció. Va ser proporcionada per l'*American Type Culture Collection* (ATCC).



També es va utilitzar un derivat de la línia 293T (**293/CD4.403/CXCR4**) que expressa establement (per transfecció) la molècula CXCR4 i una forma truncada de la molècula CD4 (CD4.403) que presenta una deleció de la part citoplasmàtica d'aquesta molècula i per tant té bloquejada la seva capacitat d'iniciar rutes de senyalització intracel·lular però conserva la capacitat d'unió a gp120.

La línia cel·lular de carcinoma d'epiteli cervical humà **TZM-bl** (prèviament anomenada JC53-bl) és una línia cel·lular HeLa que va ser transfectada establement per expressar CD4 i CCR5. A més a més conté integrades dins el seu genoma diferents còpies dels gens de la luciferasa i la  $\beta$ -galactosidasa sota el control del promotor del VIH [171] i expressa de manera endògena el coreceptor CXCR4. Les cèl·lules TZM-bl es van obtenir dels Drs. John C. Kappes, Xiaoyun Wu i de Tranzyme Inc. a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

Totes aquestes línies cel·lulars van ser cultivades en medi *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Invitrogen) complementat amb un 10% de SBF (DMEM-10% SBF) a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.1 Cèl·lules en suspensió

La línia cel·lular T limfoblàstica **CEM** va ser proporcionada per l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Aquesta línia es va obtenir a partir d'un residu leucocitari de sang perifèrica d'una pacient amb leucèmia limfoblàstica aguda [172].

La línia cel·lular **A2.01/CD4.403** [173, 174], és una línia cel·lular limfoblàstica CD4<sup>-</sup> que deriva de la línia CD4<sup>+</sup> A3.01 (que al seu torn és una variant de la línia cel·lular CEM) i que expressa la forma truncada de CD4 (CD4.403) descrita anteriorment. Aquesta línia cel·lular va ser proporcionada per D.R. Littman (New York Medical College, New York, EUA).

Totes les línies cel·lulars en suspensió van ser cultivades amb RPMI-1640 (Invitrogen) complementat amb un 10% SBF (RPMI-10% SBF) i un 1% de penicil·lina/estreptomicina.

### 3. Plasmidis

*pHEnv*: conté els gens *env* i *rev* del VIH procedent d'un virus NL4-3 (soca del VIH adaptada al laboratori de tropisme X4). El plasmidi es va utilitzar per a amplificar el gen *env/rev* del virus NL4-3 i clonar-l'ho al vector d'expressió pcDNA3.1D/V5-His Topo (Invitrogen) (plasmidi que es va anomenar **envNL43**). El plasmidi original va ser cedit pel Dr. Eric O. Freed (HIV Drug Resistance Program National Cancer Institute NCI-Frederick, Frederick, MD, EUA) [175].

*p41.2*: conté els gens *env* i *rev* del VIH procedent d'un virus NL4-3 amb una mutació Val→Glu a la posició 2 de gp41 (zona del pèptid de fusió). Aquest canvi d'aminoàcid a gp41 bloqueja el procés de fusió [176]. El plasmidi es va utilitzar per a amplificar el gen *env/rev* i clonar-l'ho al vector d'expressió pcDNA3.1D/V5-His Topo (Invitrogen) (plasmidi anomenat **env41.2**). El plasmidi va ser cedit pel Dr. Eric O. Freed (HIV Drug Resistance Program National Cancer Institute NCI-Frederick, Frederick, MD, EUA).

*envBaL*: conté els gens *env* i *rev* d'un virus BaL (soca del VIH adaptada al laboratori de tropisme R5) clonats al vector d'expressió pcDNA3.1D/V5-His Topo (Invitrogen) (clon BaL.01). Es va obtenir a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program* on va ser cedit pel Dr. JR Mascola [177].

*SVPB13* i *SVPB16*: contenen els gens *env* i *rev* procedents d'aïllats primaris del VIH (amplificats, respectivament, a partir d'ADN genòmic de CMSP i d'ARN associat a virus extret de plasma). Ambdós casos representen Env de virus de subtipus B aïllades de pacients en infecció aguda i tenen un tropisme R5 [178]. Es van obtenir dels Drs. David Montefiori, Feng Gao, B. H. Hahn i J. F. Salazar-Gonzalez a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

*pTat*: conté el gen *tat* del VIH-1 clonat al vector pDS56, RBH, 6X [179, 180]. Es va obtenir dels Drs. Abhay Patki i Michael Lederman a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

*pSG3 $\Delta$ env*: conté tot el genoma del VIH-1 però codifica per una Env truncada (de només 142 aminoàcids). El plasmidi deriva del pSG3.1 al qual se l'hi van inserir 4 nucleòtids (CATG) al gen *env* introduint-hi un codó de parada després de l'aminoàcid 142 [181]. El plasmidi es va obtenir dels Drs John C. Kappes i Xiaoyun Wu a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

*pEGFP-LC3*: codifica per a una proteïna de fusió GFP i LC3. Es va utilitzar en l'assaig d'autofàgia per a monitorar la formació d'autofagosomes. Va ser proporcionat pel Dr. T. Yoshimori (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japó).

#### 4. Altres reactius

Per a bloquejar la interacció entre la subunitat gp120 de l'Env i els seus coreceptors es va utilitzar l'antagonista sintètic de CXCR4 JM-2987, bromur del compost AMD-3100 [182]) i l'antagonista de CCR5 TAK-779 [183].

Per a bloquejar el procés d'autofàgia dirigit per la subunitat gp41 de l'Env es van utilitzar els inhibidors C34 [184] i T20. Ambdós compostos són petits pèptids sintètics que s'uneixen a gp41 (als aminoàcids 628-661 per a C34 i 638-673 per a T20) bloquejant els canvis estructurals necessaris per al procés de fusió entre la membrana lipídica que expressa l'Env (ja sigui vírica o cel·lular) i la membrana de la cèl·lula diana.

Tots els inhibidors esmentats anteriorment es van obtenir a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

Per a l'estudi de la hemifusió (veure més avall) es va utilitzar la sonda lipofílica DiI (per marcar les cèl·lules efectores) i el *far red cell tracker* DDAO (per marcar les cèl·lules diana). Ambdós es van obtenir a través de Molecular Probes (Invitrogen).

Per l'estudi de la mort cel·lular es va utilitzar DIOC<sub>6</sub> (Invitrogen) un colorant lipofílic verd fluorescent i que és selectiu per a les mitocòndries de les cèl·lules vives quan s'utilitza a baixes concentracions. Alternativament es va utilitzar també el colorant vital *trypan blue* (Invitrogen).

Per l'estudi del mecanisme d'inducció de NKp44L i l'anàlisi de la resposta humoral anti-3S (veure més avall) es van utilitzar anticossos contra la regió 3S (anti-3S) i contra NKp44L (anti-NKp44L). Ambdós anticossos havien estat descrits i van ser proporcionats pel Dr. Vincent Vieillard (INSERM UMR-S 945, Laboratoire Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Paris 6, París, França) [114, 116]. En l'anàlisi de la resposta humoral anti-3S també es

van utilitzar cinc pèptids sintètics amb la seqüència de l'epítot 3S i la seva regió flanquejant (pèptid consens 3S: NH<sub>2</sub>-PWNASWSNKSLDDIW-COOH, pVNP-8: NH<sub>2</sub>-PWNSSWSNKSYEQIW-COOH, pVNP-9: NH<sub>2</sub>-PWNTSWSNKTLNDIW-COOH, pVNP-11: NH<sub>2</sub>-PWNASWSNKSLNDIW-COOH i pVNP-16: NH<sub>2</sub>-PWNTSWSNKSYHEIW-COOH) sintetitzats per Covalab (Villeurbanne, France).

Per l'assaig de neutralització (veure més avall) es van utilitzar dos anticossos monoclonals per bloquejar la unió entre gp120 i CD4: IgG12 (dirigit contra gp120, concretament contra la seva regió d'unió a CD4) i Leu3a (dirigit contra la pròpia molècula CD4); i dos anticossos monoclonals dirigits contra la regió MPER de gp41: 4E10 i 2F5. Tots els anticossos es van obtenir de Polymun (Viena, Àustria) excepte Leu3a que és de BD Biosciences (Madrid, Espanya).

## 5. Amplificació del gen *env*

El gen *env* del VIH-1 es va amplificar a partir d'ARN extret de mostres de plasma de pacients VIH<sup>+</sup>. Addicionalment, per a construir els vectors d'expressió envNL4-3 i env41.2 el gen *env* es va amplificar a partir dels plasmidis pHenv i p41.2. En ambdós casos, la seqüència amplificada correspon al gen *env* i conserva també el gen *rev* (*env/rev*) ja que aquest últim està implicat en l'exportació de l'ARNm víric del nucli al citoplasma cel·lular i per tant és important per a la correcta expressió de l'Env.

Per a l'amplificació d'*env/rev* procedent d'aïllats primaris es va purificar l'ARN víric de mostres de plasma de pacients VIH<sup>+</sup> utilitzant el *kit* QIAamp viral RNA minikit (QIAGEN, L'Hospitalet de Llobregat, Espanya) a partir de 160 µl de plasma i seguint les instruccions del fabricant. Seguidament es van utilitzar 5 µl d'ARN per a realitzar la transcripció inversa d'ARN a ADN (RT-PCR) i una primera PCR en una sola reacció utilitzant el *kit* de RT-PCR d'Invitrogen *SuperScript III* que combina una retrotranscriptasa (*SuperScript III*, Invitrogen) i una ADN polimerasa d'alta fidelitat de còpia (*Platinum Taq High Fidelity*, Invitrogen). Per a aquesta amplificació es van provar 2 parelles d'encebadors, RNA-ExonF/RNA-ExonR i 571/575. Les seqüències dels diferents encebadors i les seves posicions al genoma de la soca de referència del

VIH-1 HXB-2 es mostren a la taula 2. La transcripció inversa es va realitzar a 55°C durant 30 minuts. Per a l'amplificació següent, el programa del termociclador constava d'un pas inicial de 2 minuts a 94°C seguit de 40 cicles formats per un pas de desnaturalització d'1 minut a 94°C, un pas d'enllaçament d'1 minut a 56°C i un pas d'extensió de cadena de 2 minuts a 68°C. Seguidament es va realitzar una PCR *aniuada* (nPCR, de l'anglès *nestedPCR*) per obtenir la quantitat d'ADN òptima per a les anàlisis següents. Per a la nPCR també es van utilitzar 2 combinacions de primers alternativament, RNA-NestedF/RNA-NestedR i 551/555 (Taula 2) i la polimerasa utilitzada va ser novament la *Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen). El programa del termociclador per a la nPCR constava d'un pas inicial de 2 minuts a 94°C seguit de 35 cicles formats per un pas de desnaturalització d'1 minut a 94°C, un pas d'enllaçament d'1 minut a 55°C i un pas d'extensió de cadena de 2 minuts a 68°C. Els productes finals de la reacció de nPCR es van visualitzar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa a l'1% amb *Sybr Safe DNA gel stain* (Invitrogen).

Taula 2. Encebadors utilitzats en l'amplificació d'*env/rev*.

	Nom	Seqüència (5' → 3')	Posició (HXB-2)
1	RNA-ExonF <sup>a</sup>	TAGAGCCTGGAAGCATCCAGGAAG	5853-5877
	RNA-ExonR <sup>a</sup>	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT	8913-8936
2	571	AGAGAGACCCAGTACAGGCCAAAAAGC	9548 – 9523
	575	GGATACTTGGGCAGGAGTGGAAGC	5711 – 5734
3	RNA-NestedF <sup>a</sup>	CACCTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG	5954-5983
	RNA-NestedR <sup>a</sup>	GTCTCGAGATACTGCTCCCACCC	8882-8904
4	551	GGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGC	
	555	CCAGAGTCACACAACCGCGGGGCACACACTACT	

<sup>a</sup> La seqüència d'aquests encebadors està modificada en base a la seqüència descrita al protocol d'amplificació d'*env* de Gao et al.[178]

L'amplificació d'algunes mostres va presentar diverses bandes d'ADN inespecífiques. Per tal de millorar l'eficiència d'amplificació en aquells casos en què l'inespecificitat pogués ser deguda a estructures secundàries de l'ARN, es va realitzar puntualment un pas de desnaturalització de l'ARN (de 2 min a 95°C)

previ a la reacció de RT-PCR, aconseguint una notable millora en l'especificitat de l'amplificació.

Per a l'amplificació d'*env/rev* procedent de plasmidis d'ADN (pHenv i p41.2) es van utilitzar els encebadors RNA-NestedF/RNA-NestedR i es va realitzar només la reacció de nPCR seguint el protocol descrit anteriorment.

## 6. Clonatge de l'Env

Els fragments de PCR corresponents als gens *env/rev* (tan d'aïllats primaris com de plasmidis) es van sotmetre a una electroforesis en gel d'agarosa a l'1% amb *Crystal Violet* (Invitrogen) i es van purificar utilitzant el *kit* comercial *S.N.A.P. Gel Purification Kit* (Invitrogen). Els fragments d'ADN resultants es van clonar direccionalment al vector d'expressió pcDNA3.1D/V5-His Topo (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Les reaccions de clonatge es van utilitzar per transformar cèl·lules bacterianes (*One Shot TOP10 chemically competent E. coli*, Invitrogen) mitjançant xoc tèrmic i seguint les instruccions del fabricant.

Les colònies bacterianes obtingudes es van cribrar mitjançant una reacció de PCR realitzada amb un encebador complementari de l'insert *env/rev* (5' GCAGCAGGAAGCACTATGGG 3') en combinació amb un encebador complementari de la seqüència del vector (5' CCTCGACTGTGCCTTCTA 3'). D'aquesta manera es va comprovar que els plasmidis obtinguts contenien l'insert *env/rev* i que, a més a més, aquest estava orientat correctament. Es va utilitzar la polimerasa *GoTaq* (Promega, Madrid, Espanya).

Finalment es van seleccionar entre 10 i 15 colònies de bactèries transformades per a cada mostra procedent d'aïllats primaris i 1 colònia de les mostres procedents dels plasmidis pHenv i p41.2).

## 7. Mutagènesis dirigida

El procés de mutagènesis dirigida es va realitzar utilitzant el *kit GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen) amb el plasmidi envNL43 com a vector

de partida i seguint les indicacions del fabricant. Les mutacions es van generar usant parelles d'encebadors dissenyats a tal efecte. En concret es van dissenyar 2 parelles de primers (Taula 3) per originar els mutants Env-D368R i Env- $\Delta$ T. El mutant Env-D368R conté les mutacions G $\rightarrow$ A, A $\rightarrow$ G i C $\rightarrow$ A que provoquen el canvi D $\rightarrow$ R a la posició 368 de gp120 (Figura 10). Aquest canvi impedeix la interacció entre gp120 i el seu receptor CD4 [185]. El mutant Env $\Delta$ T conté una mutació C $\rightarrow$ T que introdueix un codó de parada a la posició 710 de l'Env donant lloc a una proteïna Env amb la regió citoplasmàtica truncada (li falten 144 aminoàcids dels 151 que hauria de tenir) [186].

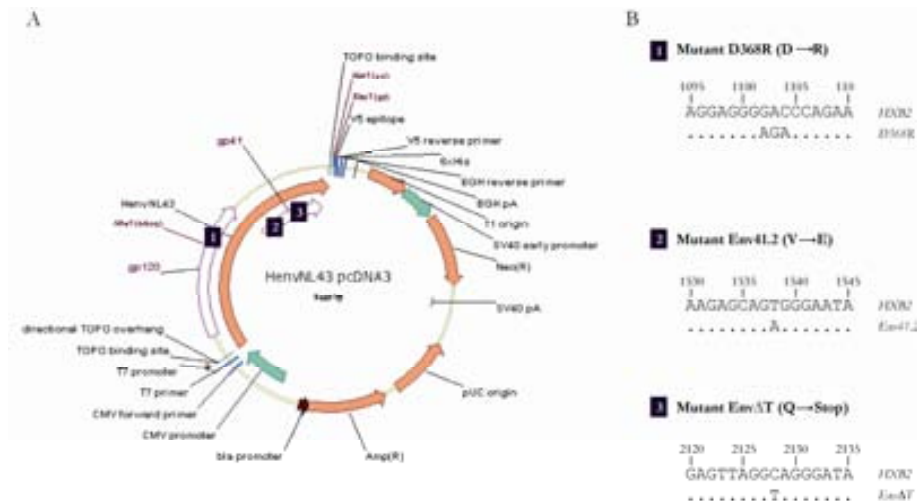
Taula 3. Encebadors utilitzats en la mutagènesis dirigida.

	Nom	Seqüència (5' $\rightarrow$ 3')	Posició HXB-2)
1	D368R-F	TTAAGCAATCCTCAGGAGGGAGACCAGAAATTG	7306 $\rightarrow$ 7338
	D368R-R	CCCTCCTGAGGATTGCTTAAAGATTATTGT	7325 $\rightarrow$ 7296
2	$\Delta$ T-F	CTATAGTGAATAGAGTTAGGTAGGGATATTCACC	8332 $\rightarrow$ 8365
	$\Delta$ T-R	CCTAACTCTATTCACTATAGAAAGTACAGC	8351 $\rightarrow$ 8322

Per comprovar que els plasmidis obtinguts tenien la mutació desitjada es va seqüenciar la zona diana de l'insert *env/rev* utilitzant els encebadors L7692/U6923 (per a gp120) o Egp41F/Egp41R (per a gp41) (Taula 4) seguint el protocol de seqüenciació descrit més avall. Les seqüències es van editar utilitzant el programa Sequencher 4.26 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, EUA).

Un cop seleccionat el plasmidi candidat i per assegurar que aquest contenia tan sols el canvi desitjat i no qualsevol altre d'inespecífic al llarg de tota la seqüència de l'insert o bé del propi vector, es va seqüenciar tot l'insert *env/rev* utilitzant encebadors específics (Taula 4) seguint el protocol de seqüenciació descrit a continuació. Seguidament es van seleccionar dos enzims de restricció, NotI i NheI (Fermentas GmbH, Madrid, Espanya) per digerir tant el plasmidi mutat com el plasmidi original. Els productes de la digestió són 2 fragments d'ADN, un d'uns 1700pb que conté la zona mutada de l'insert i un altre d'uns 6800pb format per tota la resta de vector. Després de sotmetre els productes de la digestió d'ambdós plasmidis a electroforesis en gel d'agarosa 1% amb *Crystal Violet* es va purificar el fragment corresponent a l'insert del plasmidi mutat i el fragment corresponent a la resta de vector del plasmidi original utilitzant el *kit*

comercial *S.N.A.P. Gel Purification Kit* (Invitrogen). Finalment, els dos fragments obtinguts es van relligar utilitzant la T4 ADN ligasa (*Rapid DNA ligation kit*, Roche, Barcelona, Espanya) i es van seqüenciar les regions de les dianes de la digestió enzimàtica per comprovar la correcta construcció del plasmidi final.



**Figura 10.** A. Esquema del plasmidi envNL43 utilitzat per generar els mutants D368R i gp41ΔT. B. Detall dels canvis introduïts al gen *env* per construir els diferents mutants. També s'indica els canvis que conté el plasmidi env41.2.

## 8. Seqüenciació

Per a la seqüenciació de l'ADN, es va realitzar una amplificació del material genètic utilitzant el kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Madrid, Espanya). Aquesta amplificació constava d'un pas inicial de 5 minuts a 95°C seguit de 30 cicles formats per un pas de desnaturització de 30 segons a 95°C, un pas d'enllaçament de 15 segons a 50°C i un pas d'extensió de cadena d'1 minut a 60°C. A continuació, les mostres amplificades es van seqüenciar utilitzant un seqüenciador automàtic d'ADN (3100 Analyzer; Applied Biosystems) i totes les seqüències obtinguts es van editar utilitzant el programa Sequencher 4.26 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, EUA).



Taula 4. Encebadors utilitzats en la seqüenciació d'*env*.

	Nom	Seqüència (5' → 3')	Posició (HXB-2)
1	T7prom <sup>a</sup>	TAATACGACTCACTATAGGG	-
2	BGHR <sup>a</sup>	TAGAAGGCACAGTCGAGG	-
3	EnvF	AGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAG	6208 → 6236
5	U6835	GGTATCCTTTGAGCCAATTCC	6845 → 6865
6	7030R	TCTTCTTCTGCTAGACTGCCATTTA	7030 → 7006
7	U7316	CTCAGGAGGGGACCCAGAAA	7316 → 7335
8	L7344	CCTCCACAATTAATACTGTG	7363 → 7344
9	L7692	TTGGTGGGTGCTACTCCTAATG	7723 → 7702
10	Egp41F	AAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG	7728 → 7749
11	Ngp41R	TATCCCTGCCTAACTCTATTAC	8359 → 8337
12	Egp41R	ATTCCTTCGGCCTGTCCG	8422 → 8404
13	RNA-NestedR	GTCTCGAGATACTGCTCCACCC	8904 → 8882

<sup>a</sup> La seqüència d'aquests primers és complementària a la regió que flanqueja l'insert *env* del vector pcDNA3.1D/V5-His Topo (Invitrogen).

## 9. Anàlisi del procés de fusió induït per l'Env

Per analitzar la capacitat fusogènica de gp41 es van cotransfectar cèl·lules 293T amb el plasmidi pTat i els plasmidis d'Env clonades.

Per a la transfecció es van sembrar  $1,5 \times 10^5$  cèl·lules 293T/pou en una placa de 24 pous utilitzant medi DMEM-10% SBF. Transcorregudes 24 hores les cèl·lules es van cotransfectar amb els plasmidis pTat i el plasmidi de l'Env corresponent (Env clonades de pacients o bé les Env control envBaL, envNL43, env41.2, envD368R o envΔT) utilitzant el *kit* de transfecció CalPhos (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, França) seguint les instruccions del fabricant. Per utilitzar com a control negatiu també es van transfectar cèl·lules 293T únicament amb el plasmidi pTat. A les 24 hores postransfecció es van recollir les cèl·lules i es van utilitzar per avaluar l'activitat fusogènica de l'Env i també (en el cas de l'estudi d'Env primàries) per a analitzar l'expressió de l'Env a la seva superfície.

Per analitzar l'activitat fusogènica de gp41, es van cocultivar (ratio 1:1)  $1 \times 10^4$  cèl·lules 293T transfectades amb Env i Tat (o només amb Tat en el cas del control negatiu) amb cèl·lules TZM-bl en una placa de 96 pous durant 6 hores o, alternativament, durant 2, 4, 6, 12, 24 o 48 hores per a la cinètica de fusió. L'activitat luciferasa es va mesurar (*Fluoroskan Accent*, Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Espanya) utilitzant el substrat *Brite-Lite* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) seguint les instruccions del fabricant i es va normalitzar al valor de l'activitat fusogènica mitjançada per l'Env control (envNL4-3 o envBaL en funció del tropisme de les Env avaluades) seguint la fórmula següent: % relatiu de fusió = (valor absolut de fusió de l'Env estudiada (en unitats luminomètriques relatives, ULR) / valor absolut de fusió de l'Env control (en ULR)) \* 100. En el cas de l'estudi de la capacitat fusogènica de les Env primàries, es va definir un Índex de Fusogenicitat que relativitza la capacitat fusogènica de les Env en funció de la seva expressió en superfície i es calcula dividint el valor de l'activitat fusogènica relativa entre la intensitat de fluorescència relativa (IFR) definida a continuació.

Per analitzar l'expressió de les Env primàries a la superfície cel·lular,  $2 \times 10^5$  cèl·lules 293T transfectades van ser incubades amb els anticossos monoclonals 2G12 i IgGb12 a una concentració de 4  $\mu\text{g/ml}$  cadascun durant 40 minuts a 37°C. Les cèl·lules es van rentar amb PBS i seguidament es van resuspendre en 100  $\mu\text{l}$  de PBS on es va afegir l'anticòs secundari anti IgG humana de cabra marcat amb ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Regne Unit). Les cèl·lules es van incubar a temperatura ambient durant 15 minuts i posteriorment van ser rentades amb PBS i fixades amb formaldehid 1% (Sigma-Aldrich) durant 15 minuts. Finalment les cèl·lules es van adquirir en un citòmetre de flux (FACS LSRII, BD Biosciences) i van ser analitzades amb el programa FlowJo (Tree Star Inc., Celeza GmbH, Olten, Suïssa). El percentatge de cèl·lules que expressaven l'Env i la Intensitat Mitja de Fluorescència (IMF) de les cèl·lules positives es van considerar com a paràmetres individuals i també es van utilitzar per a calcular la Intensitat de Fluorescència Relativa (IFR) segons la fórmula següent:  $\text{IFR} = \% \text{ cèl·lules Env}^+ \times \text{IMF de les cèl·lules Env}^+$ , tal com s'havia descrit anteriorment [187]. Com a control positiu del marcatge de les

Env procedents d'aïllats primaris a la superfície cel·lular es van utilitzar les Env envBal i envNL4-3.

## 10. Anàlisi del tropisme de l'Env

### 10.1 Aproximació *in silico*

Per avaluar el tropisme dels clons d'Env es va seqüenciar la regió de gp120 que conté el llaç V3 utilitzant primers específics (U6923/L7344, Taula 4) i seguint el protocol de seqüenciació i edició de seqüències descrit anteriorment. Tot seguit, el llaç V3 es va analitzar mitjançant el programa PSSM [188] i geno2pheno [189] obtenint una predicció *in silico* del seu tropisme. Totes les seqüències generades es van dipositar al GenBank (números d'accés del JN673311 al JN673335).

### 10.2 Aproximacions *in vitro*

La valoració fenotípica del tropisme de les Env de pacients VNP i RP es va realitzar utilitzant els inhibidors dels coreceptors CXCR4 (JM-2987) i CCR5 (TAK779) (1 µg/ml) en pous separats del cocultiu a 6 hores entre cèl·lules 293T transfectades amb Env/Tat i cèl·lules TZM-bl de l'assaig de fusió descrit anteriorment. El grau d'inhibició en cada cas és indicador de l'ús preferencial per part de l'Env d'un o altre coreceptor. Com a controls positius de tropisme es van utilitzar les Env envNL43 (tropisme X4) i envBaL (tropisme R5).

## 11. Anàlisi de la mort de cèl·lules T CD4 induïda per l'Env

Per a l'anàlisi de la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, ja fos per apoptosi de cèl·lules individuals o bé per inducció de sincicis i posterior apoptosi, es avaluar la pèrdua/desaparició total de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en un cocultiu entre cèl·lules 293T que expressaven l'Env per transfecció i cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries. Les cèl·lules efectores 293T es va transfectar, en pous separats d'una placa de 6 pous, amb 1,3 µg dels plasmidis que codificaven per les Env envNL43 salvatge i els mutants envΔT, envD368R i env41.2. Com a control negatiu es van utilitzar unes cèl·lules 293T que havien seguit tot el procés de la transfecció però en

absència de plasmidi. A les 24 hores postranfecció,  $1 \times 10^5$  cèl·lules 293T Env+ es van cocultivar amb  $5 \times 10^4$  cèl·lules T CD4+ primàries durant 24 hores en una placa de 96 pous en la presència/absència de l'inhibidor de fusió C34 a una concentració de  $5 \mu\text{g/ml}$ . Transcorregudes 24 hores de cocultiu, es van transferir  $150 \mu\text{l}$  del cultiu a una nova placa de 96 pous. A continuació s'hi van afegir  $50 \mu\text{l}$  de microesferes de concentració coneguda (Beads Perfect Counts) (Vitro, Madrid, Espanya) i seguidament es van analitzar els cultius a través d'un citòmetre de flux FACS LSRII (BD Biosciences). Per criteris morfològics de mida i rugositat (FSC i SSC, de l'anglès *Forward Scatter* i *Side Scatter* respectivament), es va seleccionar la població corresponent als limfòcits T CD4+ així com també la població corresponent a les microesferes. A partir del nombre absolut d'events present en cadascuna d'aquestes poblacions es va calcular la concentració de cèl·lules T CD4+ presents als cocultius seguint la fórmula següent:  $[\text{cèl·lules T CD4+}] = \left( \frac{[\text{microesferes}] \cdot n^\circ \text{absolut de cèl·lules T CD4+}}{n^\circ \text{absolut de microesferes}} \right)^4$ . Es va assumir que la presència de C34 inhibia la mort induïda per l'Env de manera que es va considerar que en aquests cocultiu el nombre de cèl·lules T CD4 que havia sobreviscut al cocultiu era del 100% i sobre aquesta assumpció es va calcular quin percentatge de cèl·lules T CD4+ havia sobreviscut en absència de C34 seguint la fórmula següent:  $\% \text{ de cèl·lules T CD4+ vives} = \frac{[\text{CD4 en absència de C34}] \cdot 100}{[\text{CD4 en presència de C34}]}$ . El % de cèl·lules que havia sobreviscut al cocultiu reflecteix el % de cèl·lules que han estat destruïdes per l'Env. Finalment, tots els valors obtinguts es van normalitzar al percentatge de supervivència dels cocultius en absència d'Env, en els quals es va considerar que aquesta era del 100 % permetent comparar diversos experiments independents.

## 12. Anàlisi de l'hemifusió i l'apoptosi induïda per l'Env

Per avaluar la capacitat de l'Env d'induir hemifusió i apoptosi, es van transfectar cèl·lules 293T amb  $4 \mu\text{g}$  dels plasmidis envNL43, env41.2 i env $\Delta$ T en pous separats d'una placa de 6 pous utilitzant el *kit* comercial de transfecció CalPhos (Clontech) i seguint les instruccions del fabricant. 24 hores post-transfecció, les cèl·lules efectores 293T-Env+ van ser tenyides amb  $1 \mu\text{l}$  de la sonda lipofílica

Dil a una concentració d'1mM durant 5 minuts a 37°C. Seguidament, les cèl·lules CEM (utilitzades com a diana) també es van marcar en aquest cas amb el *far red cell tracker* DDAO (10 µg/ml) durant 1 hora a 37°C i rentar exhaustivament amb PBS. A continuació es van cocultivar 1x10<sup>5</sup> cèl·lules 293T-Env+Dil+ amb 5x10<sup>4</sup> cèl·lules CEM-DDAO+ en la presència/absència de l'inhibidor de fusió C34 en un volum final de 200 µl amb medi RPMI-10% en plaques de 96 pous. La hemifusió i la inducció d'apoptosi es van mesurar paral·lelament a les 24, 48 i 72 hores de cocultiu. Per valorar l'hemifusió, 100 µl del cocultiu es van adquirir en un citòmetre de flux (LSRII, BD Biosciences). Es va seleccionar la població de cèl·lules CEM per criteris morfològics i també per la positivitat en DDAO+ i es va analitzar la quantitat de cèl·lules CEM que presentava un doble marcatge, DDAO+ Dil+ signe de que havien hemifusionat amb les cèl·lules efectores 293T-Env+Dil+. Pel que fa a l'apoptosi, els 100 µl restants del cocultiu es van marcar amb DIOC<sub>6</sub> (a una concentració de 40nM) durant 1 hora a 37°C i posteriorment també es van analitzar per citometria de flux. La població de cèl·lules CEM es va definir amb els criteris descrits anteriorment i es va avaluar el % de cèl·lules que presentaven un marcatge reduït de DIOC<sub>6</sub>. La disminució de la intensitat del marcatge en DIOC<sub>6</sub> reflexa una disminució en el potencial mitocondrial, signe de que la cèl·lula està entrant en apoptosi.

### **13. Anàlisi de l'autofàgia induïda per l'Env**

#### 13.1 Anàlisi per epifluorescència

Per a l'assaig d'inducció d'autofàgia (en absència de replicació vírica) es va utilitzar un model de cocultiu entre cèl·lules efectores que expressaven l'Env per transfecció transitòria a la seva superfície i cèl·lules diana que expressaven CD4 i CXCR4 (Figura 11) tal com s'havia descrit anteriorment [71]. Així, es van utilitzar cèl·lules 293T que s'havien transfectat prèviament amb els plasmidis envNL43, env41.2 o envΔT utilitzant el reactiu *jetPEI* (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, França). Per tal d'equiparar la quantitat d'Env present a la superfície de les cèl·lules efectores, aquestes es van transfectar amb 2 µg dels plasmidis corresponents a l'Env envNL43 salvatge o env41.2 i, alternativament,

1  $\mu\text{g}$  del plasmidi env $\Delta$ T. Com a control negatiu també es van transfectar cèl·lules 293T amb 2  $\mu\text{g}$  del vector pcDNA3.1 buit.

Les cèl·lules diana utilitzades van ser la línia limfoblàstica T A2.01/CD4.403 (que expressa la molècula CD4 truncada CD4.403 així com CXCR4) o, alternativament, limfòcits T CD4<sup>+</sup> primaris procedents de sang de cordó umbilical. En ambdós casos les cèl·lules van ser transfectades prèviament amb el plasmidi pEGFP-LC3 (o pEGFP com a control) utilitzant l'aparell *Nucleofector* (Amaxa Biosystems, Les Mureaux, França) i seguint les instruccions del fabricant.

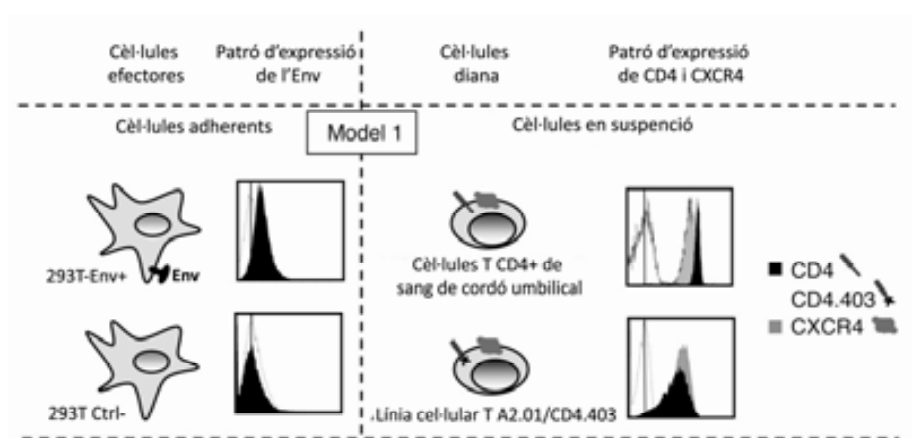


Figura 11. **Esquema del model de cocultiu utilitzat per l'estudi de l'autofàgia induïda per l'Env del VIH-1.** Figura adaptada de [71]

Transcorreguts 2 dies de cocultiu (alternativament d'1 a 3 dies) es van recollir les cèl·lules diana, les quals es trobaven en suspensió, i després de rentar-les amb PBS es van fixar amb paraformaldehid (3,7% en PBS) durant 10 minuts a temperatura ambient i es van marcar amb DAPI (Invitrogen). Tot seguit, les cèl·lules es van examinar per epifluorescència utilitzant un microscopi Leica (Leica Microsystems, Nanterre, França). Tres investigadors van comptar independentment més de 100 cèl·lules diana transfectades per mostra i només aquelles que contenien almenys 5 senyals positives (definides com a agregats fluorescents de LC3-GFP) es van comptabilitzar com a cèl·lules autofàgiques.

Paral·lelament també es va avaluar el percentatge de mort en les cèl·lules diana mitjançant un test d'exclusió amb *trypan blue* (Invitrogen). El nombre de cèl·lules mortes es va normalitzar en funció del nombre total de cèl·lules analitzades.

### 12.3 Anàlisi per microscòpia electrònica de transmissió

Seguint el model de cocultiu descrit anteriorment, es van cocultivar durant 2 dies cèl·lules 293T (que expressaven o no diferents Env per transfecció) i cèl·lules A2.01/CD4.403. Les cèl·lules van ser fixades *in situ* amb una solució al 2,5% de glutaraldehyd en un tampó cacodilat (pH7 7,4) durant 60 minuts a 4°C. Seguidament les cèl·lules es van postfixar amb una solució al 2% de tetròxid d'osmi i rentar amb tampó cacodilat que contenia un 0,5% d'àcid tànnic. Després de rentats intensius amb tampó Sorensen fosfat (0,1M, pH7 7,2). Seguidament les cèl·lules es van postfixar amb una solució de tetròxid d'osmi (2%) i àcid tànnic (0,5%), es van deshidratar i van ser incrustades en resina epon (*EMbed-812; Electron Microscopy Sciences*). Les seccions van ser contrastades amb acetat d'urani i acetat de plom i examinades amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H7100 TEM.

## **14. Obtenció i caracterització de pseudovirus**

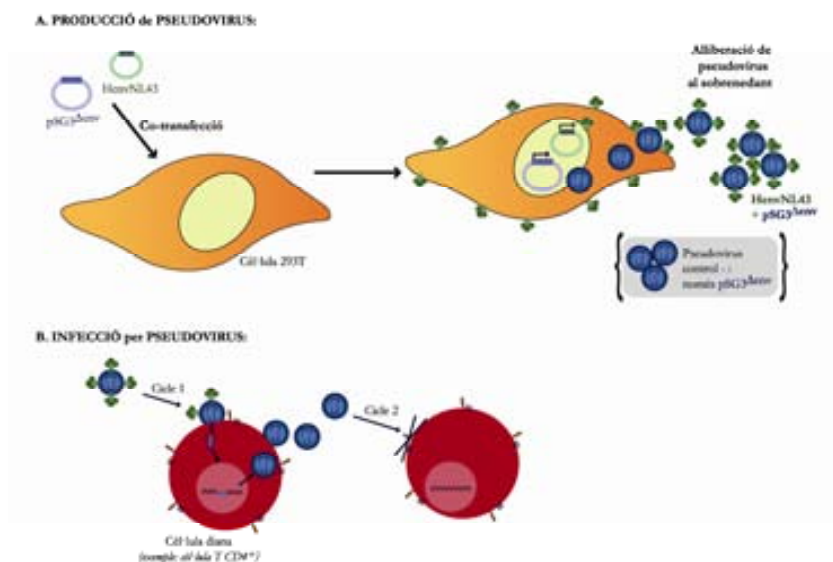
### 14.1 Producció de pseudovirus per cotransfecció.

Els pseudovirus es van obtenir per cotransfecció en cèl·lules 293T d'un plasmidi que codifica per la proteïna Env juntament amb el plasmidi pSG3<sup>Δenv</sup> que conté tot el genoma del VIH però inclou un codó de parada al gen de l'envolta evitant la producció d'aquesta proteïna. En cotransfectar separatament el plasmidi que conté l'Env vírica i el plasmidi que conté la resta de genoma del VIH les partícules pseudovíriques que es generen tenen la proteïna Env a la seva superfície però no en el seu material genètic. D'aquesta manera els pseudovirus obtinguts poden completar tot un cicle d'infecció però els nous virions produïts per la cèl·lula infectada no expressaran l'Env a la seva superfície i seran incapaços d'iniciar nous cicles d'infecció (Figura 12).

Per a la transfecció es van sembrar  $7,5 \times 10^5$  cèl·lules 293T/pou en una placa de 6 pous cultivades en DMEM-10% SBF. Passades 24 hores, les cèl·lules es van

cotransfectar amb els 2 plasmidis esmentats anteriorment (ratio 1:2, Env:ΔEnv) utilitzant el *kit* de transfecció CalPhos (Clontech) i seguint les instruccions del fabricant. A les 36 hores post-transfecció es van recollir els sobrenedants dels cultius on s'havien anat acumulant les partícules pseudovíriques produïdes per les cèl·lules transfectades.

Es van construir pseudovirus cotransfectant el plasmidi pSG3Δenv amb les Env envBaL i envNL4-3 (soques víriques adaptades al laboratori) i també amb Env de virus aïllats de mostres de plasma de pacients VNP (clons VNP8-C3, VNP9-C10, VNP11-C1 VNP16-C10) i de pacients RP (RP2-C10, RP6-C5, RP7-C12, RP8-C4, RP10-C19). També es van obtenir pseudovirus transfectant únicament el pSG3Δenv. Aquestes partícules, que no contenen Env a la seva superfície i per tant no poden realitzar ni el primer cycle d'infecció ni produir cap efecte relacionat amb l'Env, es van utilitzar com a control negatiu en diferents experiments.



**Figura 12. Esquema de la producció de pseudovirus i representació de la infecció per pseudovirus (1 sol cycle d'infecció).** A. Els pseudovirus es van obtenir per cotransfecció en cèl·lules 293T d'un plasmidi que codifica per a l'Env vírica (per exemple envNL43) i un plasmidi que conté tot el genoma del VIH excepte l'Env (pSG3ΔEnv). B. Els pseudovirus generats poden completar un primer cycle d'infecció però com que el genoma que s'integra en la cèl·lula hoste no codifica per a l'Env, les noves partícules viriques produïdes no expressen l'Env a la seva superfície i, per tant, no podran iniciar cap més cycle d'infecció.



## 14.2 Titulació i quantificació dels pseudovirus.

La infecciositat dels pseudovirus presents a cada sobrenedant es va analitzar seguint un experiment basat en l'activitat luciferasa i les cèl·lules TZM-bl descrites anteriorment. Primerament, es van sembrar  $1 \times 10^5$  cèl·lules TZM-bl/pou en medi DMEM-SBF 10% que contenia  $37,5 \mu\text{g/ml}$  de DEAE-dextrà (Sigma), que facilita la infecció de les cèl·lules, en plaques de 96 pous. Tot seguit es van afegir dilucions seriades (1/5) dels diferents pseudovirus a 11 pous consecutius per quadruplicat i la placa es va incubar durant 48 hores a  $37^\circ\text{C}$  i un 5% de  $\text{CO}_2$ . Les cèl·lules TZM-bl contenen varies còpies del gen de la luciferasa sota el promotor del VIH integrades al seu genoma de manera que el gen es transcriu quan la cèl·lula s'infecta amb el virus. L'activitat luciferasa es va analitzar per luminometria (*Fluoroskan Accent*, Labsystems) utilitzant el substrat *Britelite Reagent* (*Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System*, Perkin Elmer, Life Sciences).

La quantitat de pseudovirus es va expressar utilitzant el valor de la dosis infectiva del 50% (TCID<sub>50</sub>, de l'anglès *50% Tissue Culture Infective Dose*) calculat segons el protocol del Dr. Montefiori [190]. El valor de TCID<sub>50</sub> representa la quantitat necessària d'un patògen per a produir canvis patològics en el 50% del cultiu cel·lular inoculat i s'expressa com a TCID<sub>50</sub>/ml.

Els pseudovirus produïts per cotransfecció d'un plasmidi que conté el gen *env* i el pSG3 $\Delta_{\text{env}}$  poden avaluar-se en l'assaig descrit anteriorment ja que aquests pseudovirus tenen la capacitat de completar, almenys, un cicle d'infecció. En canvi, les partícules víriques produïdes per la transfecció únicament del plasmidi pSG3 $\Delta_{\text{env}}$  no poden realitzar ni un sol cicle d'infecció i no poden avaluar-se amb l'assaig de les cèl·lules TZM-bl.

Per a poder determinar la quantitat de virus  $\Delta_{\text{env}}$  (així com també la resta de pseudovirus amb Env) es va calcular en paral·lel la concentració de partícules pseudovíriques presents als sobrenedants mitjançant la tècnica d'ELISA (de l'anglès *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) mesurant la quantitat d'antigen p24 de la càpsida del VIH amb un kit comercial (*Innotest HIV antigen mAb*, Innogenetics, Barcelona, Espanya). Per a calcular la concentració d'antigen p24 dels sobrenedants (utilitzat com a mesura de la quantitat de partícules víriques que contenien) es va realitzar en paral·lel una recta patró utilitzant un preparat

d'antigen p24 de concentració coneguda. Les absorbàncies obtingudes per a cada mostra es van extrapolar a l'equació de la recta patró i es van expressar en ng de p24/ml.

## **15. Anàlisi de la inducció de l'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4+**

### 15.1 Caracterització genotípica

Per avaluar genotípicament la capacitat de les Env clonades de pacients VNP i RP d'induir l'expressió a la superfície de les cèl·lules T CD4+ del lligand de cèl·lules NK NKp44L, es va seqüenciar l'ectodomini de gp41 utilitzant encebadors específics (Ngp41F/Ngp41R, Taula 4) i seguint els protocols de seqüenciació i edició de seqüències descrits anteriorment. Totes les seqüències generades es van dipositar al GenBank (números d'accés del JN673277 al JN673310).

### 15.2 Assaig *in vitro* d'inducció de NKp44L

Les cèl·lules T CD4+ obtingudes de donants sans es van activar cultivant-les en medi RPMI amb un 10% de SBF, 5 µg/ml de PHA (Sigma-Aldrich) i 10 Unitats/ml d'IL-2 (Roche) durant 72 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar i es van mantenir en cultiu només amb RPMI-10%SBF i 10 Unitats/ml d'IL-2. Seguidament, es van cultivar 2x10<sup>5</sup> cèl·lules T CD4+ activades en una placa de 96 pous durant 5 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> amb la presència d'un pèptid sintètic (pèptid sintètic 3S, Covalab, Villeurbanne, França) a una concentració de 5µg/ml o dels diferents pseudovirus descrits anteriorment (1.000 TCID<sub>50</sub>/ml). Tant el pèptid consens 3S com els pseudovirus havien estat incubats prèviament (o no) amb un anticòs anti-3S. Transcorregudes les 5 hores, es va afegir als cultius l'anticòs monoclonal anti-NKp44L (nº 7.1, IgM [114]) i es van incubar les cèl·lules 1 hora a 4°C. Seguidament les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar amb l'anticòs secundari *PE-Rat anti-mouse IgM* (BD Biosciences) durant 30 minuts a 4°C. Finalment, les cèl·lules es van rentar amb PBS, fixar amb formaldehid 1% (Sigma) durant 15 minuts, adquirir en un

citòmetre de flux (FACS LSRII, BD Biosciences) i analitzar amb el programa Flow-Jo (Tree Star Inc.).

Per avaluar l'expressió de NKp44L a la superfície de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> d'individus infectats pel VIH (pacients VNP i RP) es van utilitzar alíquotes criopreservades de CMSPs. Un cop descongelades, es van marcar durant 15 minuts a temperatura ambient amb un anticòs de ratolí anti CD4 humà acoblat a APC (clon L200, BD Biosciences Pharmingen) i es va avaluar l'expressió en superfície de la molècula NKp44L per citometria de flux (LSRII, BD Biosciences) tal com s'ha descrit anteriorment. Alternativament, les CMSP dels pacients es van cultivar durant 5 hores amb el pèptid consens 3S prèviament al marcatge amb anti-CD4 i anti-NKp44L. Així es va analitzar tant el nivell basal d'expressió de NKp44L en les cèl·lules CMSP dels individus VNP i RP com la seva capacitat d'expressar-l'ho (in vitro) com a resposta al pèptid 3S sintètic.

## **16. Anàlisi de respostes humorals contra l'Env**

### 16.1 Detecció d'anticossos dirigits contra l'epítot 3S de gp41

Per una banda, la quantificació d'anticossos que reconeixien l'epítot 3S de gp41 o bé les seves regions flanquejants en les mostres de plasma de pacients VNP i RP es va realitzar per ELISA. Per altra banda, es va obtenir una mesura funcional de la capacitat dels plasmes dels pacients d'inhibir *in vitro* la inducció de l'expressió de NKp44L a la superfície cel·lular.

#### *16.1.1 Quantificació d'anticossos anti-3S per ELISA*

L'ELISA es va adaptar dels mètodes descrits prèviament [191]. Es van dissenyar un total de cinc pèptids (Covalab, Villeurbanne, França), un d'ells basat en la seqüència consens de l'epítot 3S (pèptid consens 3S) i els altres quatre basats en la seqüència de l'epítot 3S present en les Env dels 4 pacients VNP (pèptids pVNP-8, pVNP-9, pVNP-11 i pVNP-16). Els diferents pèptids sintètics purificats en una solució de PBS es van utilitzar per revestir (100ng/pou) una placa *Nunc EIA/RIA immuno Maxisorp* de 96 pous i fons pla que es va incubar a

4°C tota la nit. L'endemà, les plaques es van rentar quatre vegades amb PBS 0.05% de Tween-20 (Sigma) i es van bloquejar amb una solució de llet desnatada al 3% en PBS a 37°C durant 2 hores. El plasma dels pacients (o bé d'un control negatiu) es va afegir a les plaques en diferents dilucions (1/50, 1/500 i 1/5000) i es van incubar 1 hora a 37°C. Després d'un rentat es va afegir als pous una dilució 1:2000 de l'anticòs anti IgG humana de conill marcant amb biotina (Jackson ImmunoResearch) i es va incubar 1 hora a 37°C. Un cop rentat, la biotina unida va ser avaluada utilitzant una dilució 1:5000 del conjugat *ExtraAvidin* acoblat a peroxidasa durant 1 hora a 37°C. Després d'un últim rentat es va afegir als pous la solució de substrat de la peroxidada desenvolupant-se una reacció colorimètrica que es va mesurar a una densitat òptica de 450 nm. Es van utilitzar diferents concentracions conegudes d'anticossos policlonals purificats anti-3S per a tenir estàndards de calibratge de la quantificació. La quantitat d'anticossos anti-3S es va expressar en unitats arbitràries (UA)/ml amb un límit de detecció de 10 UA/ml.

#### *16.1.2 Avaluació de la capacitat dels plasmes d'inhibir l'expressió de NKp44L in vitro.*

Per obtenir una mesura funcional de la capacitat dels plasmes dels pacients VNP i RP d'inhibir l'expressió de NKp44L es van realitzar els cultius descrits anteriorment entre cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries activades i pseudovirus amb les Env dels pacients en la presència de diverses dilucions (1/50, 1/500 i 1/5000) dels plasmes autòlegs. Els plasmes s'havien tractat prèviament 1 hora a 56°C per tal d'inactivar la resposta del complement i evitar un possible efecte tòxic sobre les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. Transcorregudes les 5 hores de cultiu (a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub>) es va analitzar l'expressió del lligand NKp44L a la superfície de les cèl·lules per citometria de flux (LSRII, BD Biosciences) i es va calcular el valor de la IC<sub>50</sub> dels plasmes tal com es descriu a l'apartat d'anàlisi estadística.

#### 16.2 Quantificació general dels anticossos anti-gp120

La quantificació global dels anticossos anti-gp120 presents als plasmes dels pacients VNP i RP es va realitzar per ELISA i es va expressar en unitats arbitràries (UA/ml). La proteïna gp120 soluble (NIH AIDS Reference and Reagent Program) va ser absorbida en plaques Maxisorb de 96 pous (Nunc) a

una concentració de 50 ng/pou en PBS durant tota la nit (12-14 hores, overnight) a 4°C. Posteriorment, els pous es van rentar i bloquejar durant 3 hores a temperatura ambient amb un tampó de bloqueig que consisteix en PBS que conté un 10% de SBF i un 0,05% de Tween-20 (Sigma). Seguidament els pous es van rentar i es van incubar amb 100 µl de dilucions seriades dels plasmes dels pacients en tampó de bloqueig (dilució màxima: 1/125.000) durant tota la nit a 4°C. Com a control es van utilitzar dilucions seriades de l'anticòs monoclonal anti-gp120 IgGb12 (de 0,1 a 0,00014 µg/ml). Finalment, els pous es van rentar, incubar amb un anticòs anti IgG humanes acoblat a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) a una dilució 1/25.000 durant 1 hora a temperatura ambient, rentar novament i revelar utilitzant TMB com a substrat. L'absorbància es va mesurar a 450 i 620 nm per avaluar el senyal específic i el senyal de fons respectivament. Com a control negatiu de l'assaig es van utilitzar mostres de plasma de quatre donants sans seleccionats aleatòriament.

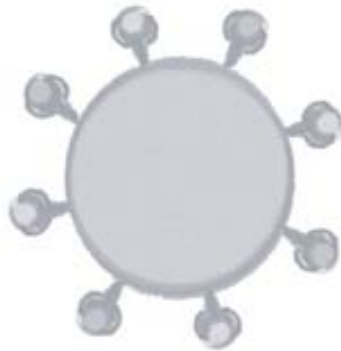
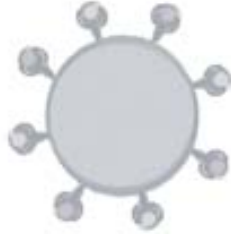
### 16.3 Anàlisi de l'activitat neutralitzant dels plasmes d'individus VIH+

Per a l'assaig de neutralització es van utilitzar pseudovirus construïts amb l'Env envNL4-3, envBaL, SVPB13 i SVPB16. Es van preincubar 200 TCID<sub>50</sub> dels diferents pseudovirus en una placa de 96 pous durant 1 hora a 37°C amb dilucions seriades de les mostres de plasma dels pacients VNP i RP (rang de dilucions d'1/60 a 1/1620) o bé amb els anticossos control: Leu3a (0.25 µg/ml), IgGb12, 4E10 o 2F5 (10 µg/ml). Tots els plasmes havien estat prèviament incubats 1 hora a 56°C per tal d'inactivar la resposta del complement. Seguidament, es van afegir 1x10<sup>4</sup> cèl·lules TZM-bl en medi DMEM-10%SBF que contenia 37,5 µg/ml de DEAE-dextrà (Sigma) a tots els pous. Es van fer duplicats per a cada plasma així com també per als anticossos control. Transcorregudes 48 hores (durant les quals les plaques es van incubar a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>) es va analitzar l'activitat luciferasa dels cultius per luminometria (*Fluoroskan Accent*, Labsystems) utilitzant el substrat *Britelite Reagent (Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System*, Perkin Elmer, Life Sciences) i seguint les instruccions del fabricant.

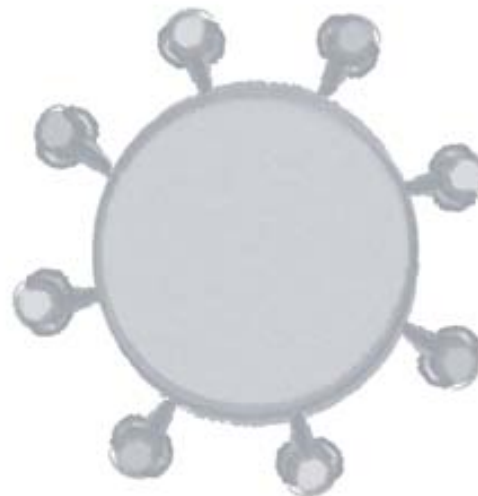
## 17. Anàlisi estadística

Les diferents variables analitzades es van comparar utilitzant tests no paramètrics (test Mann-Whitney). Per a calcular el valor d'IC<sub>50</sub> (de l'anglès *50% Inhibitory Concentration*) en l'assaig de neutralització i d'inhibició de la inducció de NKp44L es va utilitzar un model de regressió no lineal. El valor d'IC<sub>50</sub> representa la concentració d'un inhibidor a la qual la resposta obtinguda (infecciositat en aquest cas) es redueix a la meitat. Els valors de ULR obtinguts es van normalitzar en funció del valor obtingut en absència de plasma i es van ajustar a una corba d'inhibició (*corba d'inhibició d'un sol centre*) amb una pendent de Hill fixa i igual a 1 [192] juntament amb el valor de la dilució inversa de plasma usada en cada punt.

Tota l'anàlisi estadística i les regressions no lineals es van realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism v5.0.



## RESULTATS







Capítol 1: Estudi *in vitro* de la capacitat fusogènica, la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i la inducció d'autofàgia de la glicoproteïna Env del VIH-1.

Diversos treballs han demostrat que l'Env juga un paper important en la destrucció massiva de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que es produeix durant la infecció pel VIH. Concretament, la capacitat fusogènica de la subunitat transmembrana gp41 s'ha relacionat amb el descens en el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en cultius de teixit limfoide *ex vivo* [193], en models animals [194] i en estudis clínics [195, 196]. L'acció de gp41 induïx la formació de sincicis entre cèl·lules infectades (que expressen l'Env a la seva superfície) i cèl·lules no infectades (que expressen el receptor i coreceptor del VIH) [197, 198]. Aquests sincicis tenen una vida mitja curta, de 48 a 72 hores, i moren principalment per activació de la via intrínseca d'apoptosi [199, 200]. L'efecte citopàtic de gp41, a més, afecta també a cèl·lules individuals no infectades [67, 95], l'anomenat efecte *bystander*, el qual s'ha associat al procés d'hemifusió [69, 96]. Durant el contacte entre una cèl·lula infectada i una cèl·lula diana no infectada, l'hemifusió és la interacció transitòria de les capes lipídiques externes de les membranes cel·lulars sense que s'arribi a formar el porus de fusió ni existeixi contacte entre citoplasmes, és a dir sense progressió a sincici. Aquest procés resulta en un intercanvi de lípids entre les dues membranes cel·lulars que pot desencadenar la seva desestabilització induint senyals apoptòtics en la cèl·lula diana [96, 201].

El paper de gp41 en la inducció de mort cel·lular és especialment rellevant quan l'Env s'expressa a la superfície d'una cèl·lula infectada. La mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, almenys en cultius de fins a 24 hores, es detecta quan l'Env s'expressa en la superfície cel·lular i, en canvi, és indetectable quan es troba formant part de partícules víriques lliures [66]. De fet, la inducció de mort en limfòcits T CD4<sup>+</sup> per part de virus lliure requereix cultius molt més llargs (d'entre 7 i 14 dies) assolint nivells més baixos [70] o, fins i tot, s'ha suggerit que els limfòcits T CD4<sup>+</sup> poden ser resistents a la mort induïda per partícules víriques lliures (en cultius de 2 a 7 dies) [202]. En aquest context, el mecanisme de mort cel·lular més estudiat ha estat l'apoptosi [67, 199, 200, 203, 204]. Tot i això, recentment s'ha senyalat l'autofàgia com a via alternativa d'inducció de mort cel·lular programada per part de l'Env [71].

Amb aquestes premisses, en aquesta primera part de la tesi (I) es va dissenyar un model de cocultiu per avaluar la capacitat fusogènica de gp41 de diferents Env; (II) es va valorar la seva capacitat de destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries; (III) es va analitzar la capacitat hemifusogènica de diferents Env i la seva relació amb la inducció d'apoptosi cel·lular; i, finalment, (IV) es va valorar el paper de gp41 en la inducció d'autofàgia en cèl·lules T CD4<sup>+</sup>.

## **1.1 Avaluació de la capacitat fusogènica de l'Env**

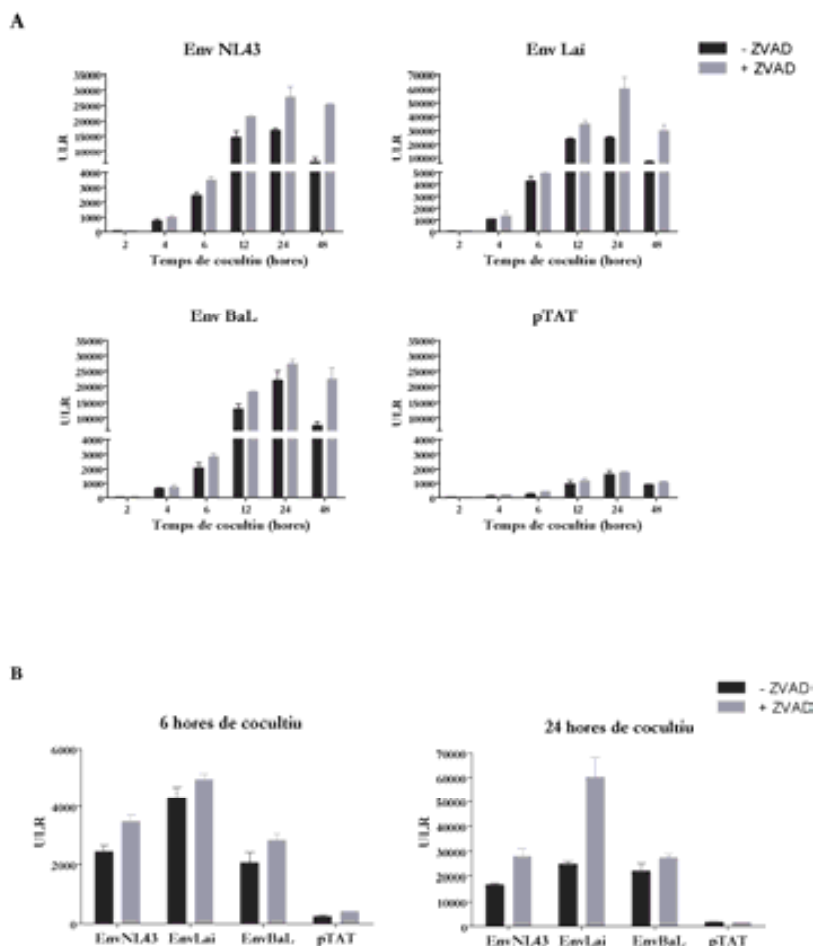
### 1.1.1 Caracterització del model experimental utilitzat

La capacitat fusogènica de l'Env es va avaluar en un model de cocultiu cel·lular. Com a cèl·lules efectores es va utilitzar la línia cel·lular 293T cotransfectada amb un plasmidi que codificava per a la proteïna de l'Env juntament amb un plasmidi que codificava per a la proteïna accessòria Tat. Com a cèl·lules diana es va utilitzar la línia cel·lular TZM-bl, la qual expressa el receptor (CD4) i ambdós coreceptors (CXCR4 i CCR5) del VIH. A més a més, conté integrades dins el seu genoma diferents còpies dels gens de la luciferasa i la  $\beta$ -galactosidasa sota el control del promotor del VIH (activat per la proteïna Tat). La formació de sincicis entre les cèl·lules 293T i TZM-bl, dirigida per la unió de gp120 a CD4 i a CXCR4/CCR5 i pel procés de fusió mediat per gp41, provoca que la proteïna Tat que expressen les cèl·lules 293T activi el promotor del gen de la luciferasa integrat al genoma de les cèl·lules TZM-bl proporcionant una mesura quantitativa de la capacitat fusogènica de l'Env quan s'analitza l'activitat luciferasa per luminometria.

Es va analitzar la cinètica de fusió (de 2 a 48 hores) per tal de determinar el punt òptim d'anàlisi de l'activitat luciferasa. Es va utilitzar l'Env de dos virus de tropisme X4 (NL43 i Lai) i d'un virus de tropisme R5 (BaL). Com a control es van utilitzar cèl·lules 293T transfectades únicament amb el plasmidi que codifica per a la proteïna Tat (Figura 13). La cinètica es va realitzar en paral·lel en dos cocultius, un en absència de droga i un altre en presència de l'inhibidor de caspases ZVAD-fmk. El ZVAD-fmk bloqueja la inducció d'apoptosi al cocultiu permetent, addicionalment, l'avaluació de l'efecte que pot exercir la mort cel·lular sobre la determinació de la capacitat fusogènica de les diferents Env.

L'anàlisi de l'activitat fusogènica de les diverses Env en absència de ZVAD va revelar que la fusogenicitat era detectable a partir de les 4 hores de cocultiu i que el seu valor anava augmentant fins a arribar a les 12 (per les Env NL4-3 i Lai) o 24 hores (per l'EnvBaL) de cocultiu. En tots els casos es va observar una pèrdua de fusogenicitat a les 48 hores de cocultiu (Figura 13A). El fet que a partir de les 12-24 hores de cocultiu els valors de fusió arribessin al seu punt màxim i que disminuïssin a les 48 hores, suggeria que els events de fusió, almenys en el nostre model de cocultiu, tenien lloc entre les primeres 4 i 12 hores de cocultiu. Aquest

fet podria ser degut a la limitada disponibilitat de cèl·lules diana per a la formació de nous sincicis a partir de les 12 hores i, a més, a que els sincicis formats prèviament començaven a morir a partir de les 24 hores, provocant una disminució en la detecció d'activitat luciferasa (Figura 13A).



**Figura 13. Caracterització del model de cocultiu cel·lular per a la determinació de l'activitat fusogènica de l'Env.** A. Es va realitzar un cocultiu utilitzant com a efectores cèl·lules 293T cotransfectades amb el plasmidi pTat juntament amb diverses Env (EnvNL4-3, EnvLai o EnvBaL) i com a diana la línia cel·lular T2M-bl en presència (barres grises) o absència (barres negres) de l'inhibidor de caspases ZVAD. L'activitat luciferasa dels cocultius es va analitzar per luminometria a les 2, 4, 6, 12, 24 i 48 hores de cocultiu. B. Resum de les dades de fusió obtingudes per les diferents Env en presència/absència de ZVAD en cocultius a 6 i 24 hores.

Els resultats representen la mitjana i la desviació estàndard de 2 experiments independents.

L'addició de ZVAD als cocultius va provocar que els nivells de fusogenicitat obtinguts fossin més elevats, efecte especialment rellevant a partir de les 12 hores (Figura 13A). A més a més, en aquest cas els valors de fusogenicitat augmentaven notablement fins a les 24 hores per totes les Env analitzades. Els elevats valors de fusogenicitat obtinguts en un cocultiu en presència de ZVAD en comparació amb un cocultiu realitzat en absència de la droga suggerien, novament, que a partir de les 12 hores de cocultiu l'efecte citopàtic de l'Env sobre cèl·lules T2M-bl individuals està disminuint el nombre de cèl·lules diana disponibles per a la formació de nous sincicis.

La fusogenicitat a 48 hores en presència de ZVAD no va continuar augmentant respecte l'anàlisi a 24 hores, però tampoc va experimentar una disminució tan marcada com la que es va detectar en absència del fàrmac. Aquests resultats reforcen la hipòtesis de que, almenys en el nostre model, a les 48 hores de cocultiu ja no es produeix la formació de nous sincicis i, a més a més, que els sincicis formats fins a les 24 hores estan morint provocant un descens en la detecció d'activitat luciferasa a les 48 hores si el cocultiu es realitza en absència de ZVAD. L'addició de l'inhibidor d'apoptosi cel·lular evita la mort dels sincicis provocant que els valors d'activitat luciferasa detectats a les 24 i 48 hores de cocultiu siguin similars.

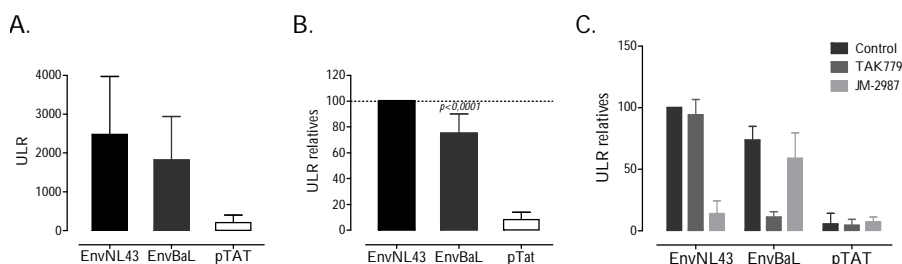
Amb aquestes premisses, el punt òptim de detecció de l'activitat fusogènica de gp41 en el nostre model de cocultiu va ser el de 6 hores. En aquest punt les diferències entre les Env NL4-3, Lai i BaL ja es fan paleses i l'efecte de la mort cel·lular és mínim, representant menys d'un 20% del valor mig (Figura 13B). A les 24 hores de cocultiu, en canvi, la capacitat fusogènica (en absència de ZVAD) de les diferents Env és pràcticament el mateix ja que en tots els casos s'ha arribat al nivell màxim de fusió detectable (Figura 13B) i només s'observen diferències entre les Env si s'utilitza ZVAD, el qual pot modificar en més d'un 100% el valor de fusogenicitat obtingut (Figura 13B). Aquests resultats indiquen que si l'objectiu és analitzar estrictament la capacitat fusogènica de gp41 el millor model per fer-ho és un cocultiu a 6 hores sense necessitat d'utilitzar ZVAD. El cocultiu a 24 hores, en canvi, si es realitza amb i sense ZVAD pot resultar útil per a valorar la inducció de mort cel·lular de les diferents Env, ja que la comparació dels valors de fusió en presència o absència de ZVAD pot proporcionar una idea del nivell de mort cel·lular induïda per la citopaticitat de

l'Env sobre cèl·lules diana. A partir d'ambdós models es demostra que l'EnvLai és més citopàtica que les Env NL43 o BaL, ja que l'EnvLai presenta el valor més alt de fusogenicitat a 6 hores i conseqüentment també presenta una major diferència a 24 hores entre els valors de fusogenicitat obtinguts en presència *versus* absència de ZVAD.

Per validar el model de cocultiu cel·lular per l'anàlisi de la capacitat fusogènica i avaluar-ne la seva reproductibilitat es van analitzar 14 cocultius independents de les EnvNL43 i BaL. Tots els cocultius es van realitzar en absència de ZVAD durant 6 hores. Els resultats van indicar que la mesura directa de luminometria (unitats relatives de luminometria, URL) presentava una variabilitat elevada interexperiments. Diversos factors podien estar contribuint a aquesta variabilitat, com per exemple l'eficiència de la cotransfecció de l'Env i Tat a les cèl·lules 293T o l'estat de les cèl·lules TZM-bl (Figura 14A). Tot i això, quan s'utilitzava una de les Env com a control intern de l'experiment (en aquest cas l'EnvNL4-3) i es normalitzaven tots els valors en funció de la seva fusogenicitat (EnvNL4-3=100%), la variabilitat disminuïa notablement i les Env podien comparar-se aconseguint veure les diferències entre elles de forma significativa (Figura 14B). Per aquesta raó es va decidir que l'assaig de fusogenicitat sempre havia de constar d'un control intern (s'utilitzaria alternativament NL43 o BaL en funció del tropisme de les Env analitzades) per normalitzar els valors de URL de manera que els resultats de diferents experiments fossin comparables.

Finalment, es van realitzar diverses rèpliques dels cocultius de fusió a 6 hores de les EnvNL43 i BaL en presència/absència dels inhibidors de coreceptor TAK-779 i JM-2987. La sensibilitat específica i no creuada de l'EnvNL4-3 a l'inhibidor de CXCR4 JM-2987 i de l'EnvBaL a l'inhibidor de CCR5 TAK-779 va indicar que l'ús d'aquests compostos proporcionava una mesura fenotípica del tropisme de les Env en el mateix assaig de fusió (Figura 14C).

El model de cocultiu a 6 hores entre cèl·lules 293T transfectades amb Env i Tat i cèl·lules TZM-bl com a dianes utilitzant els inhibidors de coreceptor TAK-779 i JM-2987 es va utilitzar posteriorment per a l'avaluació de la capacitat fusogènica i el tropisme d'Env primàries aïllades de pacients VIH<sup>+</sup> (veure Capítol 2 de Resultats).



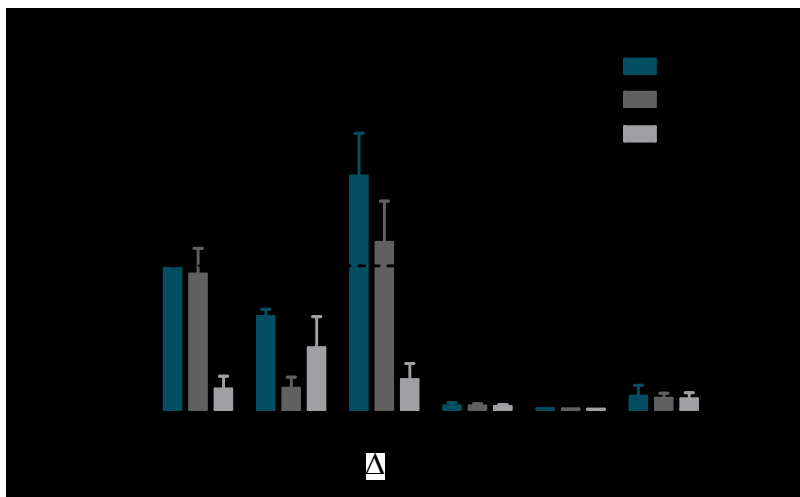
**Figura 14. Validació del model de cocultiu cel·lular a 6 hores per a la determinació de l'activitat fusogènica de l'Env.** A. Anàlisi de la capacitat fusogènica de les EnvNL4-3 i BaL en un cocultiu de 6 hores entre cèl·lules 293T Env+ i Tat+ per transfecció i cèl·lules TZM-bl. El gràfic representa la mesura crua de luminometria expressada en unitats relatives de luminometria (URL). B. Normalització dels valors obtinguts en el cocultiu de fusió en funció de l'EnvNL4-3 (100%). C. Els mateixos cocultius de fusió a 6 hores es van realitzar en presència de l'inhibidor de CCR5 TAK-779 (gris fosc) i de CXCR4 JM-2987 (gris clar) per obtenir addicionalment una mesura fenotípica del tropisme de les Env analitzades.

Els resultats representen la mitjana i la desviació estàndard de 14 experiments independents.

### 1.1.2 Estudi de l'activitat fusogènica de diferents mutants de gp41 (D368R, 41.2 i $\Delta$ CT)

Un cop validat el model de cocultiu de fusogenicitat a 6 hores, es va analitzar la capacitat fusogènica de 3 mutants de l'EnvNL43: l'EnvD368R (que conté una mutació que li impedeix unir-se a la molècula CD4 [185]); l'Env 41.2 (que conté una mutació a la posició 2 del pèptid de fusió de gp41 que li impedeix iniciar el procés de fusió [176]) i l'Env $\Delta$ T (mutant que té deleccionada la regió intracitoplasmàtica de gp41, fet que provoca un augment de la seva citopaticitat [186]). Tal com s'esperava, les Env 41.2 i D368R no van presentar valors detectables de fusogenicitat. L'EnvBaL, corroborant el que s'havia observat prèviament, presentava un  $66 \pm 5\%$  d'activitat fusogènica en comparació amb una EnvNL-43 (a la qual se li va atorgar el valor de 100% en absència de droga) (Figura 15). Confirmant el que està descrit a la literatura, l'Env $\Delta$ T va presentar un augment significatiu de fusogenicitat ( $165 \pm 30\%$ ) en comparació amb l'EnvNL4-3 o EnvBaL (Figura 15). La sensibilitat específica de les soques X4 (EnvNL4-3 salvatge i mutants, EnvLai) a l'antagonista del coreceptor CXCR4

JM-2987 i de la soca R5 EnvBaL a l'antagonista de CCR5 TAK-779 confirmava que la utilització d'aquests compostos proporciona una mesura fenotípica del tropisme de l'Env vírica en el mateix cocultiu de fusió (Figura 15).



**Figura 15. Avaluació de la capacitat fusogènica de l'EnvBaL, l'EnvNL4-3 salvatge i els mutants EnvΔT, EnvD368R i Env41.2.**

La fusogenicitat es va analitzar en un cocultiu de 6 hores entre cèl·lules TZM-bl com a diana i cèl·lules 293T cotransfectades amb el plasmidi de l'Env corresponent juntament amb el plasmidi pTat com a efectores. Els cocultius es van realitzar en absència (barres blanques) o presència de l'inhibidor de CCR5 TAK-779 (barres gris fosc) o de l'inhibidor de CXCR4 JM-2987 (barres gris clar).

Tots els valors de ULR es van normalitzar en funció del valor obtingut utilitzant l'EnvNL4-3 en absència de droga, que va rebre el 100%.

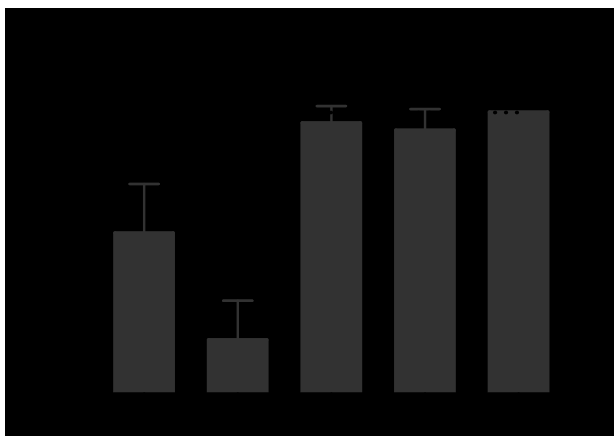
Els resultats representen la mitjana i la desviació estàndard de 3 experiments independents.

## 1.2 Estudi de la mort induïda per l'Env en cèl·lules T CD4+

### 1.2.1 Anàlisi de la pèrdua de cèl·lules T CD4+ induïda per l'Env

Nombrosos estudis han demostrat la relació entre la caiguda de cèl·lules T CD4+ i la capacitat fusogènica de gp41. Per aquesta raó es va decidir avaluar l'efecte dels diferents mutants de l'EnvNL4-3 descrits anteriorment en la destrucció de cèl·lules T CD4+ primàries. Per això es van transfectar cèl·lules 293T amb l'EnvNL4-3 i els 3 mutants (EnvΔT, Env41.2 i EnvD368R) i es van cocultivar amb cèl·lules T CD4+ procedents de donants sans durant 24 hores. El

cocultiu es va realitzar en presència/absència de l'inhibidor de fusió C34. Els cocultius es van analitzar per citometria de flux i es va determinar el nombre absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> presents als diferents cocultius utilitzant microesferes de concentració coneguda. La quantitat de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que desapareixien del cocultiu, ja fos per apoptosi induïda per l'Env vírica o bé perquè havien passat a formar sincicis amb les cèl·lules efectores 293T, es va determinar en funció de la diferència entre el nombre absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> del cocultiu en presència de C34 i el nombre absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> del cocultiu en absència de C34. Els valors obtinguts es van normalitzar al percentatge de desaparició/mort dels cocultius en absència d'Env, en els quals es va considerar que la desaparició era del 0% per tal d'analitzar només els events de destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> deguts a l'Env.



**Figura 16. Destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries per part de diversos mutants d'Env.** Es van cocultivar cèl·lules 293T transfectades (o no) amb l'EnvNL4-3 salvatge o els mutants EnvΔT, EnvD368R o Env41.2 amb limfòcits T CD4<sup>+</sup> primaris en presència/absència de l'inhibidor de fusió C34 durant 24 hores. Posteriorment, es va quantificar el nombre absolut de cèl·lules T CD4 presents als cocultius per citometria de flux utilitzant microesferes de concentració coneguda. La diferència entre el nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> del cocultiu amb C34 i del cocultiu sense C34 es va considerar com el nombre de cèl·lules que havien desaparegut (ja fos per mort o per fusió) del cocultiu. Els resultats es van normalitzar en funció del control negatiu (293T sense Env) on es va considerar que totes les cèl·lules T CD4 estaven vives per tal d'analitzar només l'efecte citopàtic dependent de l'Env.

El gràfic representa la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard de 3 experiments.



Tal com era d'esperar, ni l'Env que no pot unir-se a CD4 (EnvD368R) ni el mutant de fusió (Env41.2) no van provocar nivells detectables de desaparició de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> als respectius cocultius. L'Env NL4-3, en canvi, va provocar que el percentatge de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> vives presents al cocultiu a les 24 hores disminuís fins al  $57 \pm 17\%$  (Figura 16). Pel que fa l'Env $\Delta$ T, aquesta va induir nivells significativament més elevats de fusió/mort cel·lular ja que al cap de 24 hores de cocultiu tant sols es va detectar el  $19 \pm 14\%$  de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> vives (Figura 16).

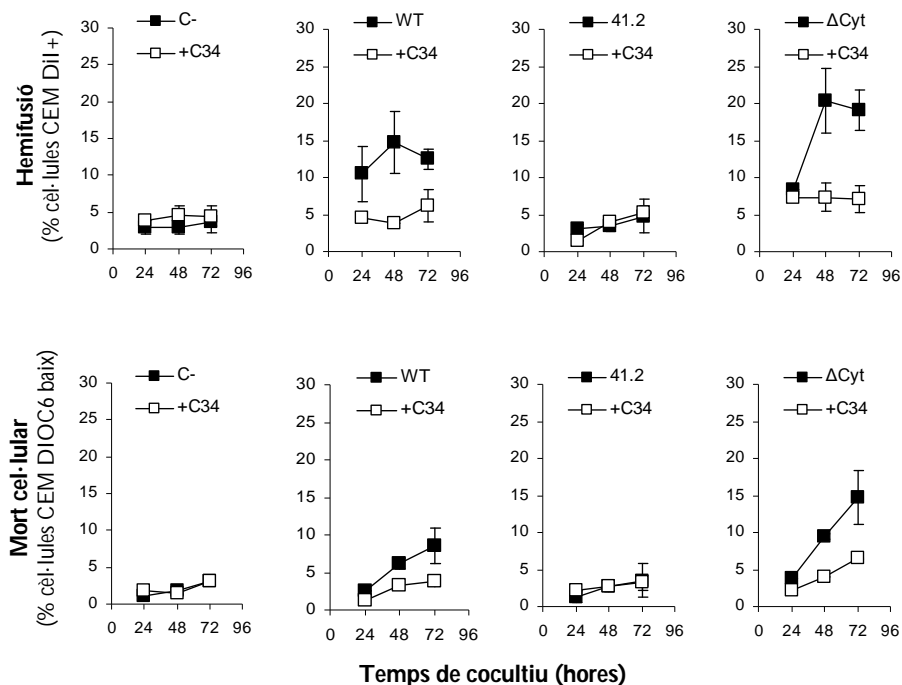
### 1.2.2 Implicació del procés d'hemifusió en la mort cel·lular per apoptosi

A part del procés de fusió, l'acció citopàtica de gp41 s'ha associat a la mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> individuals a través del procés d'hemifusió. L'hemifusió representa el pas previ a la fusió i es caracteritza per una interacció transitòria entre les capes lipídiques externes de la membrana de les cèl·lules dianes i efectores [69, 96]. No s'arriba a formar el porus de fusió i per tant s'evita que es formi un sincici, però l'intercanvi de lípids entre ambdues membranes cel·lulars pot desencadenar la seva desestabilització i induir senyals apoptòtics a la cèl·lula diana [69, 96].

Per avaluar l'hemifusió i la seva relació amb la inducció d'apoptosi es van transfectar les cèl·lules efectores 293T amb l'EnvNL43 salvatge o els mutants Env41.2 i Env $\Delta$ T i es van marcar amb el colorant lipofílic DiI. Posteriorment es van cocultivar durant 3 dies amb la línia cel·lular T CD4<sup>+</sup> CEM A2.01/CD4.403 i, finalment, es va analitzar la transferència de DiI i l'apoptosis mitjançant DIOC en les cèl·lules diana a les 24, 48 i 72 hores de cocultiu.

D'acord amb els resultats obtinguts anteriorment, no es va observar hemifusió ni apoptosi quan l'Env utilitzada va ser el mutant Env41.2. La utilització de l'EnvNL4-3 salvatge, en canvi, sí que va induir hemifusió, detectada ja a les 24 hores de cocultiu ( $10,5 \pm 3,7\%$ ) i que augmentava a 48 hores ( $14 \pm 4\%$ ), mantenint-se més o menys estable fins les 72 hores de cocultiu (Figura 17). Pel que fa a l'apoptosi induïda per l'EnvNL4-3, aquesta no era detectable fins a les 48 hores de cocultiu ( $6,2 \pm 0,7\%$ ) i augmentava lleugerament a les 72 hores de cocultiu ( $8,9 \pm 2\%$ ). Novament, el mutant Env $\Delta$ T va presentar nivells més

elevats tant d'hemifusió ( $20 \pm 4$  %, a les 48 hores de cocultiu) com d'apoptosi ( $9,5 \pm 0,3$  % i  $15 \pm 4$  % a 48 i 72 hores de cocultiu, respectivament) (Figura 17).



**Figura 17. Hemifusió i apoptosi mediada per l'Env.** L'hemifusió mediada per l'Env es va analitzar en un cocultiu entre cèl·lules 293T transfectades (o no) amb l'EnvNL4-3 salvatge o els mutants Env41.2 o EnvΔT i cèl·lules T CD4+ CEM A2.01/CD4.403. Les cèl·lules efectores 293T es van marcar prèviament amb el colorant lipofílic DiI. La transferència del colorant DiI (representativa de l'hemifusió) a les cèl·lules diàna es va avaluar mitjançant citometria de flux a les 24, 48 i 72 hores de cocultiu. Per l'anàlisi de mort cel·lular, es va afegir DIOC6 als cocultius i es va avaluar el percentatge de cèl·lules diàna amb un marcatge baix d'aquest colorant fluorescent (representatiu del percentatge de cèl·lules que patien processos apoptòtics).

Els resultats representen la mitjana i desviació estàndard de 3 experiments independents.

### **1.3 Estudi de la implicació de l'activitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia**

Diversos estudis han demostrat que el principal mecanisme implicat en la mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> durant la infecció pel VIH és l'apoptosi [63, 67, 68, 95, 134]. Tot i això, un estudi recent demostra que l'Env també pot induir autofàgia contribuint a la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades [71]. Aquest procés depèn de la interacció entre gp120 i CD4 i CXCR4 tot i que la senyalització a través d'ambdues molècules no n'és un requeriment [71, 205]. En aquesta part del treball es va investigar el paper de l'activitat fusogènica de gp41 en la inducció de mort de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades a través del procés d'autofàgia.

#### 1.3.1 Rol de la capacitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia

Per estudiar el paper de gp41 en la inducció d'autofàgia es van utilitzar 2 mutants de gp41: la construcció Env41.2 (mutant deficient en fusió) i Env $\Delta$ T (mutant que conté una deleció de 147 aminoàcids dels 152 que formen la regió citoplasmàtica de gp41). Els 2 mutants, juntament amb una construcció de l'EnvNL4-3 salvatge, es van expressar per transfecció en cèl·lules 293T i aquestes es van utilitzar com a cèl·lules efectores en un cocultiu amb una línia cel·lular T CD4<sup>+</sup> (A2.01/CD4.403) que expressa el coreceptor CXCR4 i una versió truncada de CD4 (CD4.403) que no pot participar en la senyalització intracel·lular però en canvi sí que conserva la capacitat d'unir-se a gp120. Per tal de monitoritzar el procés d'autofàgia per microscòpia les cèl·lules diana A2.01/CD4.403 es van transfectar amb la construcció LC3-GFP. Els cocultius es van analitzar a dia 1, 2 i 3.

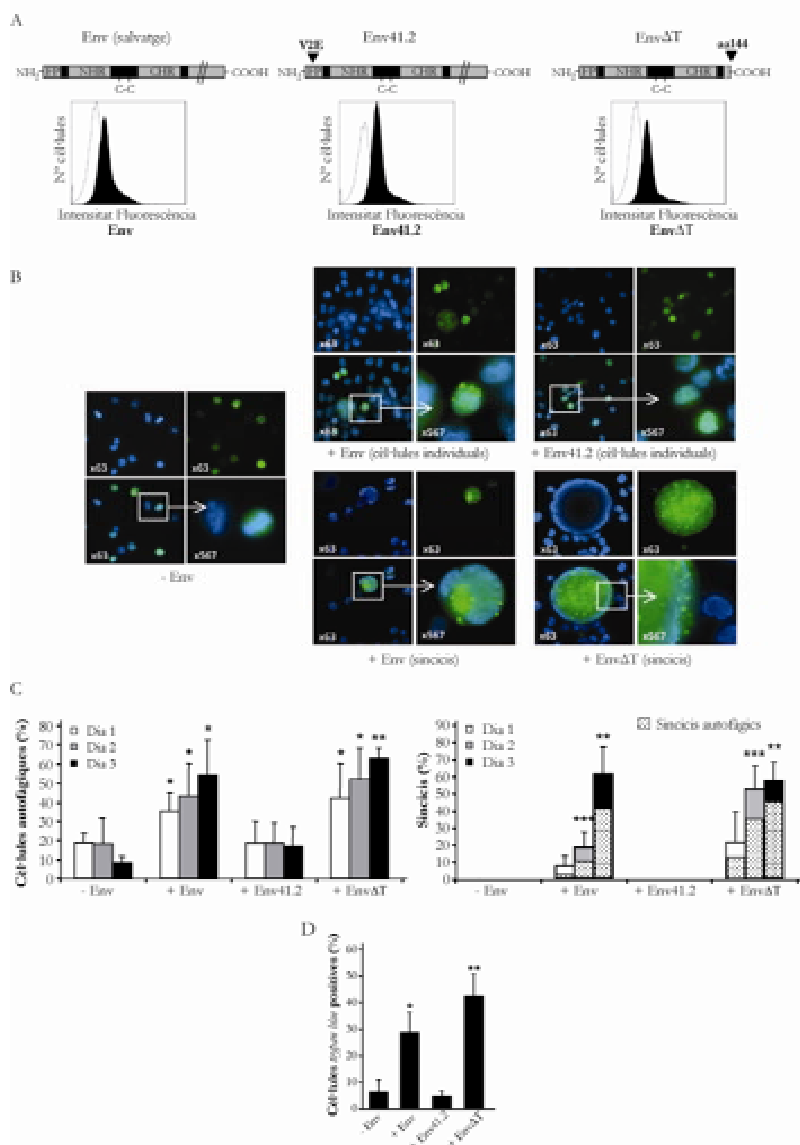
En primer lloc es va avaluar per citometria de flux l'expressió en superfície de les diverses Env (tant les mutades com la salvatge) (Figura 18A). A partir de l'expressió en superfície de les Env es van escollir les condicions experimentals (veure mètodes) que permetien una expressió en superfície idèntica per a totes les Env i així poder comparar les conseqüències de la seva interacció amb les cèl·lules diana en igualtat de condicions.

Als dos dies de cocultiu, les cèl·lules diana A2.01/CD4.403 que havien estat cocultivades amb cèl·lules 293T que expressaven l'EnvNL4-3 salvatge o el

mutant Env $\Delta$ T, presentaven agregats fluorescents de LC3-GFP, indicant que les cèl·lules estaven patint processos autofàgics (Figura 18B). El mutant Env $\Delta$ T, però, induïa nivells més elevats d'autofàgia en comparació amb l'EnvNL4-3 salvatge, especialment durant els dies 2 i 3 de cocultiu (Figura 18C). La utilització del mutant Env41.2, en canvi, va presentar una tinció fluorescent uniforme dins el citoplasma cel·lular, indicant l'absència d'autofàgia en aquests cocultius. El mateix escenari es va detectar en el control negatiu (cocultiu realitzat en absència d'Env) (Figura 18B i C).

En relació amb la formació de sincicis, es va observar que l'expressió en les cèl·lules efectores de l'EnvNL4-3 salvatge provocava que la presència de sincicis als 2 dies de cocultiu fos aproximadament del 20% i augmentés fins més del 60% als 3 dies de cocultiu (Figura 18C). L'expressió del mutant Env $\Delta$ T va accelerar el procés de formació de sincicis. En aquest cas, als 2 dies de cocultiu més del 50% de les cèl·lules diana ja havien format sincicis amb les cèl·lules efectores. En tots els casos, però, entre el 50 i el 75% dels sincicis detectats presentaven indicis d'autofàgia (Figura 18C). Tal com era d'esperar, el mutant deficient en fusió Env41.2 no va ser capaç d'induir la formació de sincicis.

Finalment, es va analitzar la mort de les cèl·lules diana T CD4<sup>+</sup> en els cocultius descrits anteriorment, mitjançant un test d'exclusió de *trypan blue*. L'expressió en les cèl·lules efectores de l'EnvNL4-3 salvatge va provocar pràcticament el 30% de mort en les cèl·lules diana. D'acord amb els resultats d'inducció d'autofàgia, la inducció de mort cel·lular es va veure augmentada utilitzant el mutant Env $\Delta$ T (42%) i, en canvi, no es va detectar utilitzant el mutant Env41.2. (Figura 18D).

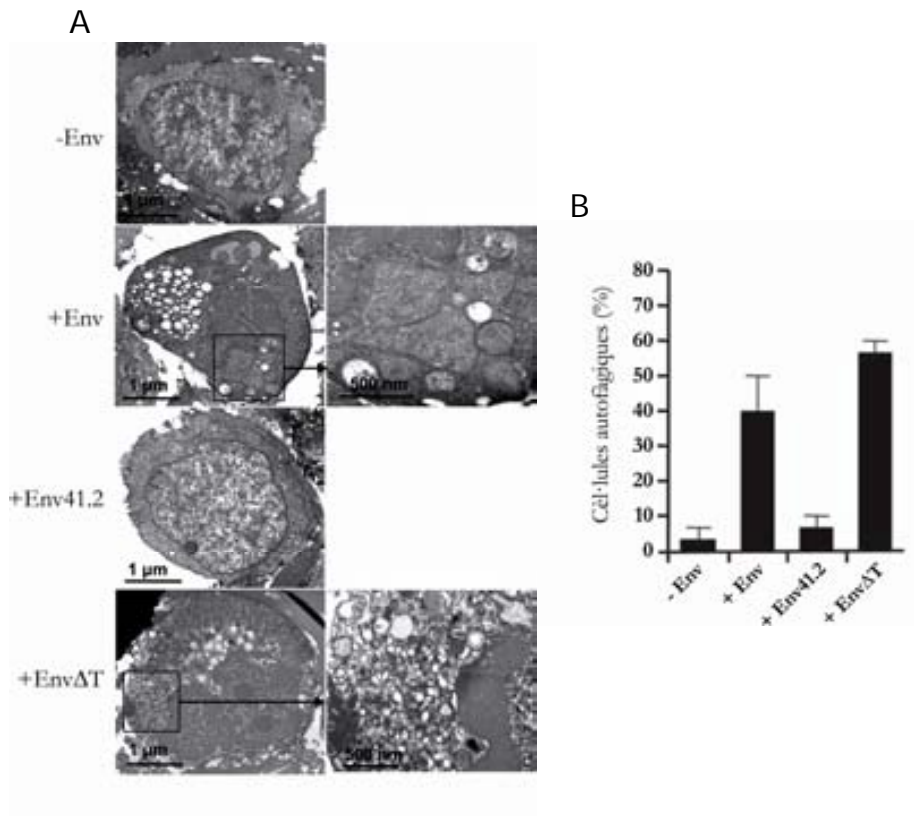


**Figura 18. Anàlisi de l'autofàgia dirigida per les Env envNL4-3 salvatge i els mutants env41.2 i envΔT.**

A. Expressió a la superfície cel·lular de les diferents Env. L'expressió es va analitzar per citometria de flux utilitzant un anticòs policlonal anti-gp120 i un anticòs secundari anti-humà de cabra marcat en FITC en les cèl·lules 293T transfectades amb la diverses construccions de l'Env (histogrames negres) i en les cèl·lules 293T transfectades amb un vector pcDNA3 buit (histogrames blancs). La intensitat de fluorescència es va enregistrar en mode logarímic utilitzant un citòmetre de flux EPICS XL4. B. Les

cèl·lules diana CEM A2.01/CD4.403 es van transfectar amb la construcció LC3-GFP i es van cocultivar durant 2 dies amb les cèl·lules efectores 293T que havien estat transfectades prèviament amb l'EnvNL4-3 salvatge o bé amb els mutants Env41.2 i EnvΔT. La presència d'agregats fluorescents de LC3-GFP (representatius d'autofàgia) es va avaluar per epifluorescència. Les dades són els resultats d'un experiment representatiu de quatre. S'han representat els sincicis o bé les cèl·lules individuals autofàgiques en funció de la disponibilitat. C. Les cèl·lules diana CEM A2.01/CD4.403 transfectades amb LC3-GFP es van cocultivar d'1 a 3 dies amb les cèl·lules efectores 293T que expressaven (o no) l'EnvNL4-3 salvatge, l'Env41.2 o l'EnvΔT. Les dades, de 3 experiments independents on més de 100 cèl·lules van ser contades per 3 investigadors, representen el percentatge total de cèl·lules autofàgiques (diagrama superior) i els sincicis autofàgics i no autofàgics (diagrama inferior). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . D. Representació de la mort cel·lular global de les cèl·lules diana A2.01/CD4.403 mitjançant un test d'exclusió de *trypan blue* després de 3 dies de cocultiu amb les cèl·lules efectores 293T transfectades amb l'EnvNL4-3 salvatge, l'Env41.2 o l'EnvΔT. Com a control negatiu es van utilitzar també cèl·lules 293T transfectades amb un plasmidi pcDNA3 buit. Els resultats provenen de 3 experiments. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

La inducció d'autofàgia per part de les diferents Env també es va analitzar per microscòpia electrònica de transmissió (MET) avaluant la formació d'autofagosomes (formacions intracel·lulars típiques del procés d'autofàgia). Morfològicament, els autofagosomes són vacuoles de doble membrana que contenen material citoplasmàtic. Quan es va utilitzar l'EnvNL4-3 salvatge o el mutant EnvΔT en les cèl·lules efectores es van identificar nombrosos autofagosomes dins les cèl·lules diana T CD4<sup>+</sup> A2.01/CD4.403 als 2 dies de cocultiu. En canvi, la utilització del mutant 41.2 no va induir la formació d'autofagosomes. El mateix resultat negatiu es va observar utilitzant cèl·lules efectores que no expressaven cap Env (Fig19A). La presència de cèl·lules autofàgiques als diversos cocultius, analitzada per MET (Fig19B) va presentar nivells comparables als que s'havien observat prèviament a través de l'anàlisi per microscòpia de fluorescència (Figura 16C).

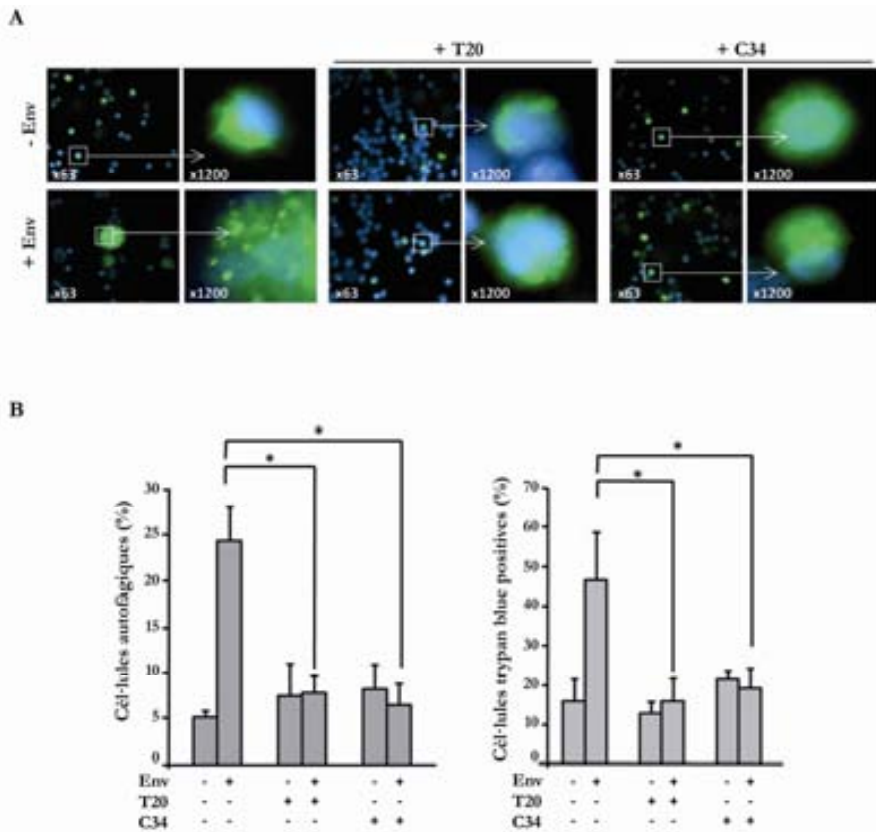


**Figura 19. Anàlisi de la inducció d'autofàgia per MET.** A. Es van cocultivar cèl·lules A2.01/CD4.403 amb les cèl·lules efectores 293T transfectades amb l'EnvNL4-3 salvatge o els mutants Env41.2 i EnvΔT durant 2 dies. Les cèl·lules autofàgiques es van definir com a aquelles cèl·lules que presentaven 5 o més autofagosomes. B. El percentatge de cèl·lules autofàgiques en les seccions de cèl·lules diana A2.01/CD4.403 va ser quantificada per dos investigadors a partir d'almenys 100 camps de MET triats a l'atzar. Escala: 1 μm o 500 nm (en les ampliacions indicades).

### 1.3.2 Estudi de la relació entra la capacitat fusogènica de gp41 i la inducció d'autofàgia en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries

Per analitzar el procés d'inducció d'autofàgia per part de l'Env en un model més fisiològic i representatiu del que podria estar succeint *in vivo*, es van utilitzar cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries (procedents de sang de cordó umbilical) com a cèl·lules diana. En aquest cas les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries també es van transfectar amb la construcció LC3-GFP i les cèl·lules efectores amb les quals es van cocultivar van ser novament cèl·lules 293T transfectades (o no) amb una Env NL4-3 salvatge. Per confirmar el paper de la fusió induïda per gp41 en la inducció d'autofàgia, els cocultius es van realitzar en la presència o absència dels inhibidors de fusió T20 i C34. El 25 ± 4% de les cèl·lules diana que havien estat cocultivades amb cèl·lules 293T Env<sup>+</sup> van presentar la tinció puntejada de LC3 típica del procés d'autofàgia. En canvi, tan sols el 5 ± 1% de cèl·lules diana van presentar signes d'autofàgia quan aquestes es cocultivaven amb cèl·lules efectores 293T que no expressaven l'Env (control negatiu) (Figura 20A i B). L'addició de T20 o C34 als cultius va inhibir fins al nivell del control negatiu la presència de cèl·lules autofàgiques al cultiu, confirmant el rol de la capacitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia. A més a més, la presència de T20 i C34 als cocultius va inhibir també l'aparició de mort cel·lular mesurada mitjançant el test d'exclusió de *trypan blue* (Figura 20B). Els nivells d'autofàgia i de mort cel·lular detectats en els cocultius de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> van ser similars als que s'havien observat prèviament utilitzant la línia cel·lular T CD4<sup>+</sup> A2.01/CD4.403 (Figura 18 i 20), manifestant la rellevància fisiològica del procés d'autofàgia durant la infecció pel VIH.





**Figura 20. Inducció d'autogàfia depenent de l'Env en cèl·lules T CD4+ primàries.** A. Les cèl·lules T CD4+ primàries (procedents de sang de cordó umbilical) van ser transfectades amb la construcció LC3-GFP i cocultivades durant 2 dies amb les cèl·lules 293T transfectades, o no, amb l'EnvNL4-3 salvatge en presència/absència dels inhibidors de fusió T20 i C34 i examinades per epifluorescència. Les dades provenen d'un experiment representatiu de tres. B. Representació del percentatge global de cèl·lules autofàgiques (diagrama esquerre) presents al cocultiu descrit anteriorment. Les dades provenen de 3 experiments i el nombre de cèl·lules autofàgiques va ser determinat per 3 investigadors. Paral·lelament es va determinar el percentatge global de mort cel·lular en les cèl·lules T CD4+ primàries (diagrama dret) que havien estat cocultivades en presència/absència de T20 i C34 amb cèl·lules 293T que expressaven, o no, l'EnvNL4-3 mitjançant un test d'exclusió de *trypan blue*. Les dades provenen de 3 experiments independents. \* $p < 0,05$ .

En resum, l'alteració funcionalment deletèria del pèptid de fusió de gp41 (mutant Env41.2) aboleix la capacitat fusogènica de l'Env així com també la seva capacitat d'inducció d'autofàgia i mort cel·lular. La deleció de la regió intracitoplasmàtica de gp41 (mutant Env $\Delta$ I), en canvi, augmenta la capacitat fusogènica i hemifusogènica de l'Env i paral·lelament també s'incrementa la seva capacitat d'inducció d'autofàgia i mort en cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. Conjuntament, els diferents resultats obtinguts apunten a que la fusió/hemifusió mitjançada per gp41 està involucrada directament en el procés d'autofàgia de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> provocant en última instància la seva mort ja sigui de forma individual o bé formant part d'un sincici.

Capítol 2: Estudi *in vivo* de la citopaticitat de l'Env (fusogenicitat, tropisme i destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> per un mecanisme dirigit per l'Env i mediat per cèl·lules NK) i de la resposta immunitària contra l'Env en individus VNP i RP.

La infecció pel VIH es caracteritza per una dràstica davallada del nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, debilitant el sistema immunitari de l'individu i conduint a l'aparició de signes definitoris de sida com són les infeccions oportunistes. Diverses investigacions han demostrat que la pèrdua de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> és deguda a una combinació de factors immunològics i virològics [139, 142]. Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> infectades tenen una vida mitja molt curta degut als efectes citopàtics directes del VIH [206] i també a la pròpia resposta immune de l'individu [62]. D'altra banda, el nombre de cèl·lules que mor en un individu infectat és notablement superior al nombre de cèl·lules infectades [62] degut a l'efecte nociu de l'activació immune [62], a proteïnes del VIH [134, 207] o a una infecció abortiva [208] en la població de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectada (efecte *bystander*). En relació amb els factors virològics, l'Env constitueix el principal determinant de la patogènesis del VIH, contribuint a la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *in vitro* [65] i *in vivo* [101]. L'efecte citopàtic de l'Env s'exerceix, entre d'altres, a través (1) de la determinació del tropisme víric [65, 103]; (2) de l'activitat fusogènica de gp41 [112, 194] sobre cèl·lules infectades [209] i no infectades [66, 96, 205]; i (3) a través de la inducció de l'expressió del lligand de cèl·lules NK NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4 mitjançant la unió de l'epítot 3S de gp41 al receptor del domini globular de C1q (gC1qR) en aquestes cèl·lules [114, 115]. L'expressió en superfície de NKp44L correlaciona amb la depleció de cèl·lules T CD4 i s'inhibeix per respostes humerals contra l'epítot 3S [116-118]. La desaparició dels anticossos anti-3S durant la progressió a sida, coincideix, a més, amb la depleció de cèl·lules T CD4 i amb un increment de l'expressió de NKp44L a la superfície cel·lular [116, 210].

Tots aquests mecanismes citopàtics del VIH semblen fallar en una espècie en particular de primats (*sooty mangabeys*) infectats pel VIS i en un grup de pacients VIH<sup>+</sup> (virèmics no progressors, VNP) els quals presenten nivells constants de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> tot i tenir alts nivells (>10.000 còpies d'ARN/ml) de replicació vírica [168, 211]. A l'altre extrem hi trobem els pacients ràpid progressors (RP) els quals presenten una dràstica davallada de cèl·lules T CD4 i una progressió a sida en menys de 3 anys després de la seroconversió.

Aquesta part de la tesis s'ha dedicat a la identificació de pacients VNP i RP i a la caracterització dels factors virològics i immunològics relacionats amb l'Env que podrien estar jugant un paper en la protecció dels limfòcits T CD4 en els individus VNP. Així, s'ha avaluat (I) el tropisme, (II) la capacitat fusogènica de gp41, (III) la inducció de l'expressió d'NKp44L a la superfície de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, i (IV) la presència de respostes humerals contra l'Env (gp120 i epítot 3S de gp41).

## 2.1 Caracterització de pacients VNP i RP

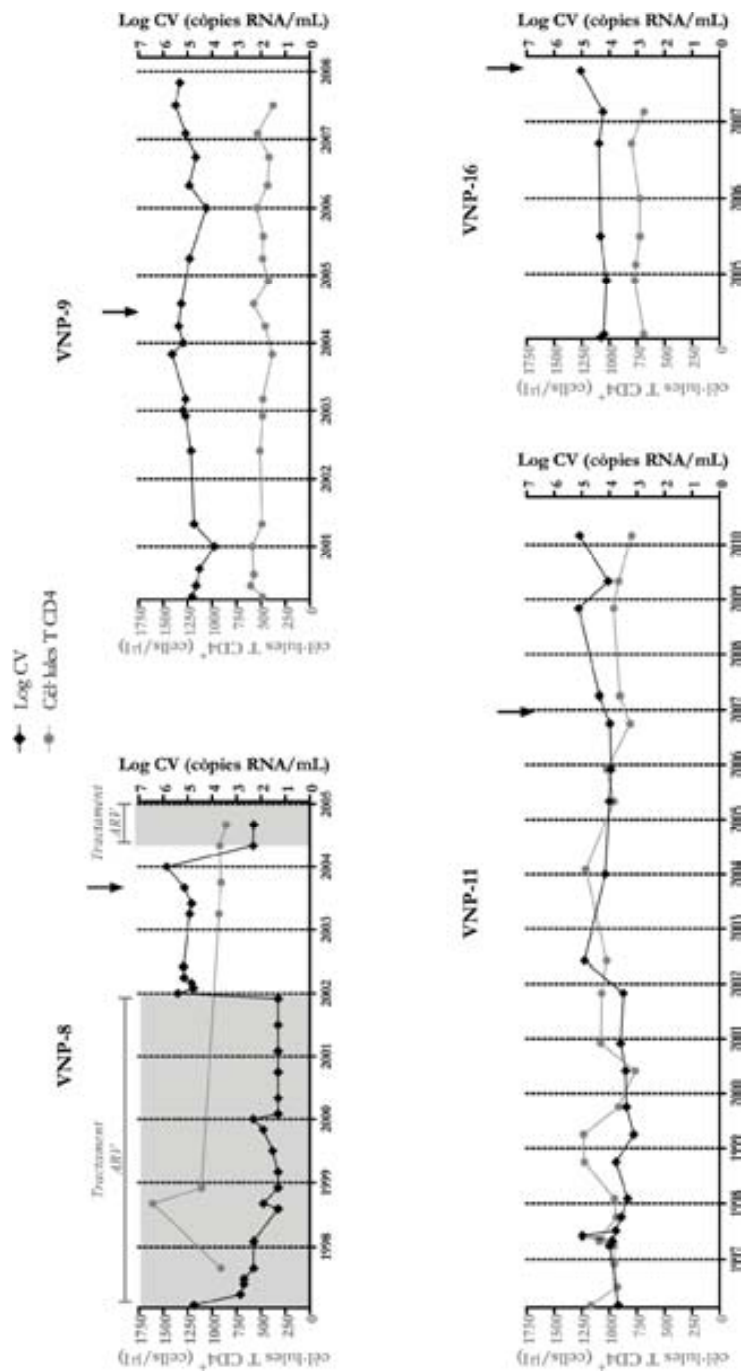
Per l'estudi *in vivo* de la capacitat fusogènica de l'Env i la seva relació amb la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> es van identificar quatre pacients VNP. En tots els casos la mitjana del nombre absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> era superior a les 400 cèl·lules/ $\mu$ l (945, 486, 995 i 735 cèl·lules/ $\mu$ l, pels pacients VNP-8, -9, -11 i -16 respectivament). En relació a la CV, aquesta es va mantenir per sobre de les 10.000 còpies ARN/ml durant tot el període en què els pacients es trobaven sense tractament ARV, excepte pel pacient VNP-11. En aquest cas, el pacient va presentar CV superiors a les 10.000 còpies ARN/ml només durant els últims 5 anys tot i haver estat sempre sense tractament ARV. Per aquesta raó la mostra utilitzada en l'estudi de l'Env correspon a l'any 2007, moment en el qual la seva CV era superior a les 20.000 còpies de ARN/ml (Figura 21). La mitjana de la CV dels pacients VNP-8, -9, -11 i -16 era de 168.193, 126.383, 25.133 i 31.523 còpies d'ARN/ml respectivament (Taula 5). Finalment, complint l'últim criteri d'inclusió del grup de pacients VNP, la caiguda de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no era superior a les 50 cèl·lules/ $\mu$ l/any en cap cas (VNP-8: -48 cèl·lules/ $\mu$ l/any, VNP-9 -14 cèl·lules/ $\mu$ l/any, VNP-11 -6 cèl·lules/ $\mu$ l/any i VNP-16 +4 cèl·lules/ $\mu$ l/any) (Taula 5). El pacient VNP-8 va rebre tractament ARV durant 2 períodes, de l'any 1997 fins a finals del 2001 i a partir de l'any 2004. Tot i això el fet d'estar 2 anys (del 2002 al 2004) sense tractament i complir els criteris d'inclusió dels individus VNP durant aquest període de temps va fer que s'incloués també en aquest grup. La mostra de plasma utilitzada per a l'amplificació i clonatge de l'Env correspon a finals de l'any 2003, moment en el qual portava 22 mesos sense tractament ARV (Figura 21).

Taula 5. Resum de les característiques clíniques dels pacients VNP i RP.

	VNP (n=4)	RP (n=5)	Valor p (Mann-Whitney)
<b>Edat</b> (anys, mediana [AIQ <sup>a</sup> ])	41 [37,75-51]	43 [28,50-48]	NS <sup>b</sup>
<b>Sexe</b> (% d'homes)	100	100	NS
<b>Valor nadir de cèl·lules T CD4<sup>+</sup></b> (cèl·lules/ $\mu$ l, mediana, [AIQ])	726 [454-835]	311 [217-351]	0,0159
<b>Nº absoluts de cèl·lules T CD4<sup>+</sup></b> (cèl·lules/ $\mu$ l, mediana, [AIQ])	840 [548-982]	358 [219-424]	0,0159
<b>Càrrega viral plasmàtica</b> (còpies ARN/ml, mediana, [AIQ])	78.953 [26.739-157.741]	95.960 [65.986-330.934]	NS

<sup>a</sup>AIQ, amplitud interquartílica. <sup>b</sup>NS, no significatiu

Com a grup control per a poder contrastar els resultats es van identificar 5 pacients RP. En aquest cas, tots els individus presentaven recomptes de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> inferiors a les 350 cèl·lules/ $\mu$ l (la mediana de cèl·lules T CD4 presents en la mostra dels 5 pacients utilitzada en l'estudi va ser de 262 cèl·lules/ $\mu$ l) (Taula 5). Pel que fa a la CV aquesta va ser comparable a la CV dels pacients VNP, mantenint-se sempre per sobre de les 10.000 còpies ARN/ml (de mitjana 95.960 còpies ARN/ml). Tots els pacients RP eren pacients naif (mai havien rebut tractament ARV) que es trobaven en els primers 3 anys posteriors a la seroconversió (de mitjana 0,7 anys).



**Figura 21. Evolució de la CV i del recompte de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels pacients VNP seleccionats.** Els gràfics representen la CV en plasma (diamants negres) i el nombre absolut de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (cercles grisos) al llarg del temps per a cada pacient VNP en els períodes en què aquests es trobaven sense tractament ARV. Pel pacient 8 els períodes en què havia estat en tractament s'han marcat en gris. Les fletxes indiquen les mostres de plasma utilitzades per a l'amplificació i el clonatge de l'Env.

## 2.2 Fusió i tropisme d'Env de pacients VNP i RP

### 2.2.1 Amplificació i clonatge d'Env

En primer lloc es va optimitzar l'amplificació de la glicoproteïna Env a partir de mostres de plasma de pacients VIH+. Es van dissenyar quatre parelles d'encebadors, dues per a la reacció de RT-PCR (RNA-exonF/RNA-exonR i 575/571) i dues per a la PCR aniuada (nPCR, de l'anglès *nestedPCR*) (RNA-NestedF/RNA-NestedR i 551/555). Les seqüències de tots els encebadors segueixen la seqüència de la soca vírica NL4-3 i les parelles RNA-exonF/RNA-exonR i RNA-NestedF/RNA-NestedR es van basar en els encebadors descrits per Li et al. [178], amb una lleugera modificació, l'addició de 4 residus nucleotídics a l'extrem N-terminal de l'encebador RNA-NestedF (CACC) per tal de realitzar posteriorment el clonatge direccional dels fragments d'ADN obtinguts en el vector pcDNA3.1/V5Histopo (Invitrogen). Es va realitzar la reacció de RT-PCR, tal com es descriu als mètodes, utilitzant les dues parelles d'encebadors a partir d'ARN extret de plasma de 5 pacients VIH+ i seguidament es va realitzar la nPCR a partir dels productes de la reacció de RT-PCR anterior i utilitzant, en ambdós casos, les dues parelles d'encebadors per a la nPCR descrits anteriorment. La combinació d'encebadors que va mostrar un millor resultat va ser la utilització de la parella RNA-exonF/RNA-exonR (Taula 2) per a la RT-PCR i la parella RNA-NestedF/RNA-NestedR (Taula 2) per a la nPCR (dades no mostrades).

Un cop seleccionades les parelles d'encebadors i per tal de valorar-ne l'eficiència i eficàcia, es va amplificar el gen *env* a partir de 21 mostres de plasma de pacients VIH+ amb CV des de 1100 fins a 540.000 còpies ARN/ml. Es va obtenir un resultat positiu de PCR en el 60% de les mostres de plasma que contenien menys de 10.000 còpies de ARN/ml, el 73 % de les mostres que contenien entre 10.000 i 50.000 còpies de ARN/ml i el 90% de les mostres que presentaven una CV superior a les 50.000 còpies ARN/ml.

### 2.2.2 Tropisme de les Env de pacients VNP i RP

El tropisme de les Env és un dels principals determinants de la seva citopaticitat. Tant en estudis *in vitro* [65] com *in vivo* [101, 103] les Env amb tropisme X4 es caracteritzen per tenir una major citopaticitat i la seva aparició en estats avançats

de la malaltia s'associa a un pitjor pronòstic amb una progressió a sida més ràpida. Per aquesta raó, es va analitzar el tropisme de les Env víriques clonades de pacients VNP i RP.

En primer lloc, es va seqüenciar el llaç V3 de gp120, el principal determinant del tropisme víric [212], de tots els clons d'Env dels pacients VNP i RP. A partir de les seqüències obtingudes es va realitzar una predicció del tropisme de les Env utilitzant en paral·lel dos programes dissenyats a tal efecte, el PSSM [188] i el geno2pheno [189]. Totes les Env analitzades, tan de pacients VNP com RP, van presentar un tropisme R5 *in silico* (Taula 6).

En segon lloc, i per obtenir una mesura fenotípica del tropisme de les Env, es va testar la seva sensibilitat als antagonistes dels coreceptor CCR5 (TAK-779) i CXCR4 (JM-2987) en un cocultiu de cèl·lules TZM-bl com a diana i cèl·lules 293T cotransfectades amb l'Env i Tat com a efectores (cocultiu de fusió a 6 hores descrit a l'apartat 1.1.1 de resultats). Confirmant el tropisme R5 de la predicció *in silico*, totes les Env tant de pacients VNP com RP van ser selectiva i específicament sensibles a la inhibició amb l'antagonista de CCR5 TAK-779 (Taula 6, Figura 22).



Taula 6. Caracterització genotípica i fenotípica del llaç V3.

	Seqüència	In silico		In vitro	
		Freqüència	Pssm <sup>a</sup>	TZM-bl	cells <sup>b</sup>
<b>HXB-2:</b>	CTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKI-GNMRQAHC				
<b>VNP8</b>	. . . . . G . P . - - . . . . . YAT . QVI . DI . . . . .	8/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . H . - - . . . . . YAT . QVI . DI . . . . .	2/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . P . - - . . . . . K . YAT . QVI . DI . . . . .	1/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . H . - - . . . . . YAT . EVI . DI . . . . .	1/12	R5	R5	R5
<b>VNP9</b>	. . . . . RSV . V - - . . . . . Q . LF . T - D . I . DI . . . . .	7/10	R5	R5	R5
	. . . . . RSVHV - - . . . . . Q . LF . T - D . I . DI . R . . . . .	2/10	R5	R5	R5
	. . . . . RGVHV - - . . . . . Q . LF . T - D . I . DI . R . . . . .	1/10	R5	R5	R5
<b>VNP11</b>	. . . . . S . H . - - . . . . . YAP . DI . . DI . K . . . . .	4/9	R5	R5	R5
	. . . . . S . H . - - . . . . . YAP . EI . . . I . K . Y . . . . .	2/9	R5	R5	R5
	. . . . . S . H . - - . . . . . YAP . EV . . KI . . . . .	2/9	R5	R5	R5
	. . . . . RS . H . - - . . . . . YAP . EI . . . I . K . . . . .	1/9	R5	R5	R5
<b>VNP16:</b>	. I . . G . . . . S . SF - - A . . S . . YATQG . I . . I . . . . .	2/4	R5	R5	R5
	. I . . G . . . . S . SF - - A . . S . . YATQ . I . . I . . . . .	1/4	R5	R5	R5
	. . . . G . . . . S . SF - - A . . S . . YATQE . I . DI . . . . .	1/4	R5	R5	R5
<b>RP2</b>	. . . . . S . QV - - . . . . . K . LYAT . A . I . DI . . . . .	6/6	R5	R5	R5
<b>RP6</b>	. I . . . . . RS . HM - - . . . . . ST . F . ADI . . . DI . . . . .	7/10	R5	R5	R5
	. I . . . . . RS . H . - - . . . . . STLF . ADI . . . DI . . . . .	3/10	R5	R5	R5
<b>RP7</b>	. . . . . S . H . - - A . . . . YAT . DI . . DI . . . . .	5/7	R5	R5	R5
	. . . . . S . H . - - A . . K . . YAT . DI . . DI . . . . .	2/7	R5	R5	R5
<b>RP8</b>	. . . . H . . . . G . H . - - . . . . . YAT . D . I . DI . . . . .	7/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . H . - - . . . . . YAT . D . T . DI . . . . .	3/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . H . - - . . . . . YAT . D . I . . I . . . . .	1/12	R5	R5	R5
	. . . . . G . N . - - . . . . . YAT . D . I . DI . . . . .	1/12	R5	R5	R5
<b>RP10</b>	. . . . . G . H . - - . . . . . YAT . DI . . DI . K . . . . .	2/3	R5	R5	R5
	. . . . . GMH . - - . . . . . YAT . DI . . DI . K . . . . .	1/3	R5	R5	R5

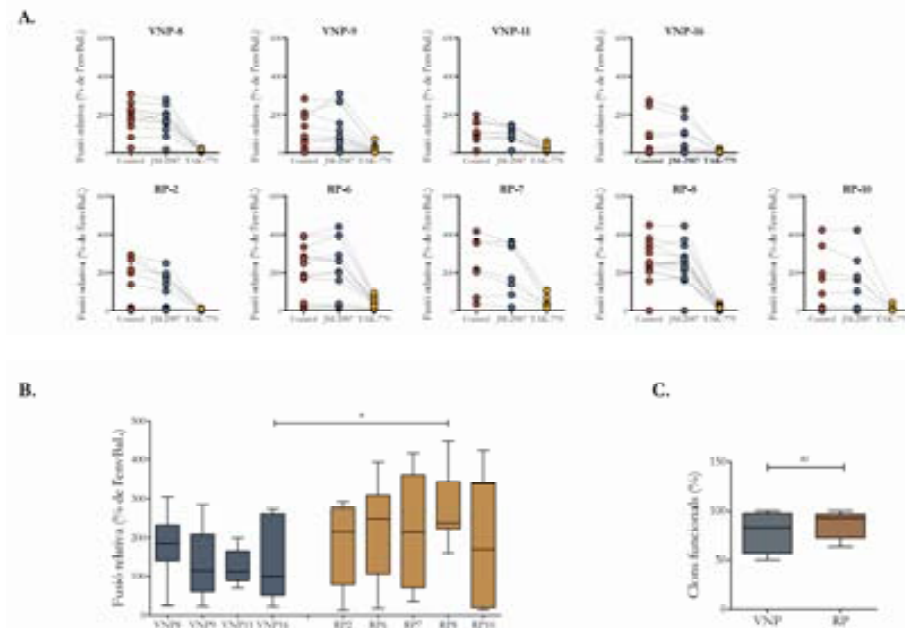
<sup>a</sup> Tropisme avaluat a través del programa PSSM. Es van obtenir els mateixos resultats utilitzant el programa geno2pheno.

<sup>b</sup> Tropisme avaluat a partir de la sensibilitat a JM-2987 i/o TAK779 en cèl·lules TZM-bl cells.

### 2.2.3 Capacitat fusogènica de les Env de pacients VNP i RP

Seguidament es va analitzar la capacitat de fusió de les Env clonades de pacients VNP i RP. Per això, es van cotransfectar les diferents Env amb el plasmidi pTat en cèl·lules 293T, les quals es van utilitzar com a efectores en un cocultiu amb

cèl·lules TZM-bl durant 6 hores, tal com s'ha descrit anteriorment (punt 1.1.1). L'Env utilitzada com a control positiu de fusió va ser l'EnvBaL ja que s'havia comprovat amb anterioritat que el tropisme de totes les Env dels pacients VNP i RP utilitzaven el coreceptor CCR5. Tots els valors de fusió obtinguts per a les diferents Env es van relativitzar a la fusió obtinguda per l'EnvBaL en absència de drogues, la qual va rebre el valor del 100%. El control negatiu utilitzat va ser un cocultiu on les cèl·lules efectores 293T s'havien transfectat únicament amb el plasmidi pTat (0%).

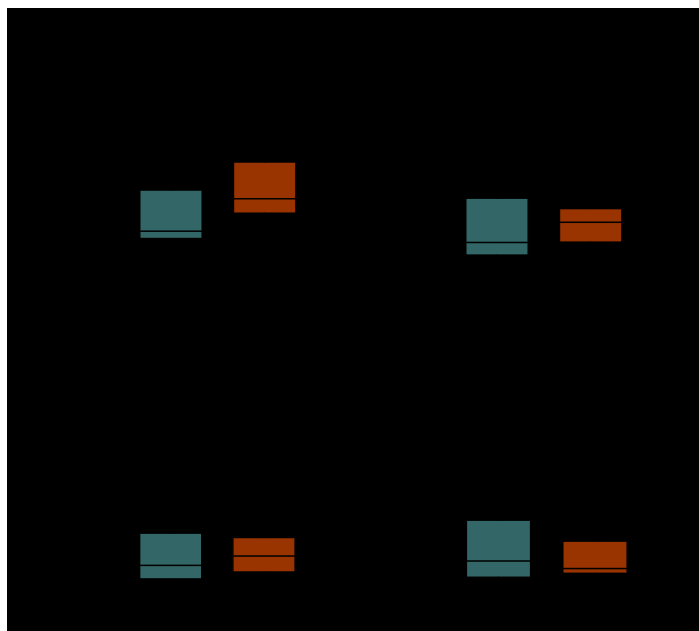


**Figura 22. Avaluació de la capacitat de fusió de les Env clonades de pacients VNP i RP.** A. Els nivells de fusió dels clons d'Env aïllats dels pacients virèmics no progressors (VNP) 8, 9, 11 i 16 i dels pacients ràpid progressors (RP) 2, 6, 7, 8 i 10 es va avaluar en un cocultiu entre 293T-Env+Tat+ i cèl·lules TZM-bl (símbols vermells). L'antagonista de CXCR4 JM-2987 o l'antagonista de CCR5 TAK.779 (símbols blaus i grocs respectivament) es van afegir als cocultius per obtenir una mesura fenotípica del tropisme de les Env. L'activitat fusogènica es va calcular de manera relativa a l'activitat del clon d'Env EnvBaL (100%) el qual es va provar a cadascun dels experiments. Com a control negatiu es van transfectar cèl·lules 293T només amb pTat i el valor obtingut en aquest cocultiu es va restar de totes les mesures. Els valors per a cada clon representen la mitjana de tres experiments independents. B. Representació de la fusió relativa de tots els clons d'Env de cada pacient VNP (barres blaves) i RP (barres taronja). Les barres representen la mitjana i els valors mínim i màxim. C. Comparativa de la freqüència de clons d'Env funcionals entre dels pacients VNP (barres verdes, nombre total de clons testats: = 44) i els pacients RP (barres taronges, nombre total de clons testats=56).

La majoria d'Env van presentar una activitat fusogènica detectable (>10% respecte la fusió de l'Env control BaL, Figura 22A). A més a més, no es va observar cap diferència en el percentatge de clons funcionals entre els pacients VNP i RP (en conjunt, els valors s'emmarcaven en un rang que anava del 50% de clons funcionals pel pacient VNP-16 al 100% de clons funcionals del pacient VNP-8; Figura 22B). La mediana dels valors de fusió pels diferents clons de cada pacient va ser comparable o superior als valors de fusió detectats per al clon EnvBaL (rang: 99, 23-273 (mediana, min-max) % de la fusió de l'EnvBaL per l'individu VNP-16 fins a 248, 18-392 % per l'individu RP-6). Tot i això, la comparació de la mediana dels valors de fusió entre el grup de pacients RP i VNP va presentar una tendència no significativa cap a valors inferiors en els pacients VNP (Figura 22C).

Per analitzar més profundament la possible diferència en fusió entre les Env del grup d'individus VNP i les del grup de RP, es van seleccionar 4 clons representatius de cada pacient i es va caracteritzar més profundament la seva expressió a la superfície cel·lular i la seva capacitat fusogènica. Com ja s'havia vist en l'anàlisi global de tots els clons dels pacients, avaluant els 4 clons seleccionats de cada pacient es va observar novament una tendència no significativa ( $p > 0,05$ ) cap a valors més baixos en el grup de pacients VNP en comparació amb els RP (Figura 23A). Els nivells d'expressió dels clons d'Env a la superfície de les cèl·lules 293T va ser similar per ambdós grups de pacients ja fos mesurant el percentatge de cèl·lules Env+ o bé mesurant la Intensitat de Fluorescència Relativa (IFR) que té en compte, a part del percentatge de cèl·lules Env+, el nivell d'expressió de l'Env en les cèl·lules positives (Figura 23B). Finalment, es va definir un Índex de fusogenicitat per tal de normalitzar els valors de fusió en funció de l'expressió en superfície de les diferents Env. L'anàlisi de l'Índex de fusogenicitat va presentar nivells comparables entre el grup d'individus VNP i el grup de RP (Figura 23C).

En resum, les dades obtingudes suggereixen que el tropisme i la capacitat fusogènica de les Env difícilment podria explicar la gran diferència observada en relació a la dinàmica de pèrdua de cèl·lules T CD4+ entre el grup de pacients VNP i RP.



**Figura 23. Anàlisi de la fusió i l'expressió en Env seleccionades.** Anàlisi comparativa de clons d'Env representatius (n=32) aïllats de pacients VNP (barres blaves, n=15) i RP (barres taronges, n=17). A. Representació dels nivells d'activitat fusogènica de les Env seleccionades tal com es descriu a la Figura 22A. L'activitat fusogènica es va calcular relativa a l'activitat de l'Env control envBaL (100%). B. Comparació del percentatge de cèl·lules efectores 293T Env+. C. Representació de la intensitat de fluorescència relativa (IFR), que constitueix una mesura de l'expressió total de l'Env a la superfície de les cèl·lules 293T ja que té en compte tan el percentatge de cèl·lules Env+ com la intensitat de fluorescència de les cèl·lules Env+ (veure materials i mètodes). E. Finalment es va calcular un Índex de fusogenicitat per a cada clon d'Env seleccionat dividint l'activitat fusogènica de cada clon entre la IFR corresponent. Les caixes representen la mediana i els valors mínim i màxim.

### **2.3 Estudi del mecanisme de pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> mediat per cèl·lules NK. Paper de gp41 en la inducció del lligand NKp44L.**

L'any 2005 el grup de recerca de l'hospital Pitié-Salpêtrière de París dirigit pel Dr. Patrice Debré, va definir un nou mecanisme de destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> durant la infecció pel VIH. Aquest mecanisme depèn de l'expressió del lligand de cèl·lules NK NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, fet que provoca que aquestes últimes puguin ser reconegudes i destruïdes per una cèl·lula NK activada [114]. La inducció de l'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> depèn de la interacció entre un epítot molt conservat de gp41 (anomenat 3S) i el receptor del domini globular de C1q (gC1qR) de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> [115]. Així doncs, per estudiar una funció alternativa de l'Env implicada en la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> es va analitzar genotípica i fenotípicament el motiu 3S de gp41, format pels aminoàcids 613-618 de l'Env (numeració de l'Env de la soca de referència HXB-2)[114]. En primer lloc, es va seqüenciar la regió de l'epítot 3S dels diferents clons d'Env dels individus VNP i RP. L'anàlisi de les seqüències va posar de manifest l'absència de mutacions que teòricament podrien impedir la inducció de l'expressió en la superfície cel·lular de la molècula NKp44L (Taula 7). La petita variació observada en l'epítot 3S va ser específica de cada pacient.

Pel que fa als pacients VNP, dos d'ells (els pacients VNP-8 i VNP16) van presentar seqüències salvatges de l'epítot 3S (SWSNKS) en tots els clons analitzats. Els pacients VNP-9 i VNP-11, en canvi, van presentar els canvis conservatius K→R i S→T, respectivament, en tots o alguns dels clons analitzats. En referència als pacients RPs, tots, excepte el pacient RP-2, van presentar un epítot 3S salvatge, sense mutacions. En el cas del pacient 2, però, es van identificar les substitucions conservadores (K/R i S/T) descrites anteriorment a tots els clons i a més, un clon minoritari també contenia una mutació puntual no conservativa (S→G).

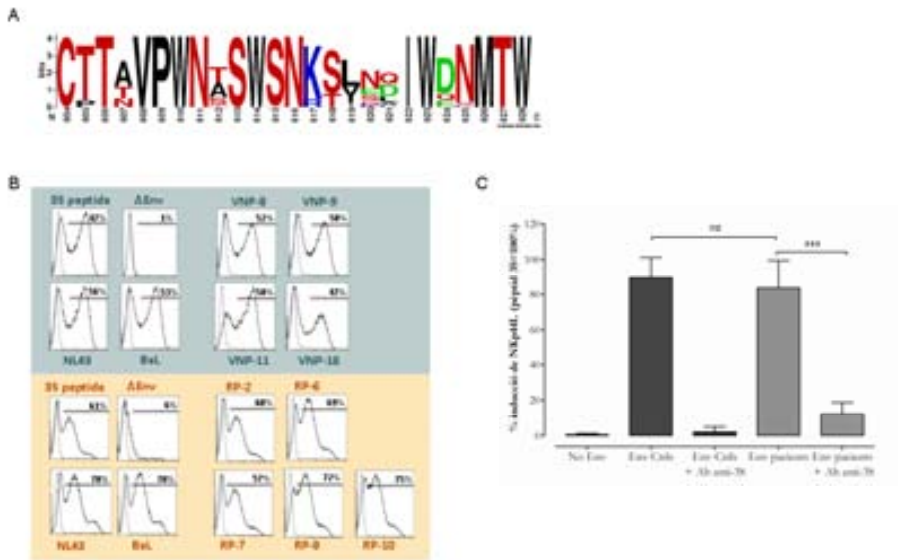
**Taula 7.** Caracterització genotípica de la regió de l'epítot 3S de gp41.

	600	610	620	630	Freqüència
<i>HXB-2</i> :	.....A.....	.....	.EQ..NHT.....	...D...N....	
Cons. B	QLLGIWGCSGKLICTTTPWNA	SWSNKS	LDEIWDNMTWMEWEREIDNYTS		
<b>VNP-8</b>	.....R.....A....S	.....	YEQ.....	.....R	55 % (6/11)
	.....	.....	YKQ.....	.....R	18 % (2/11)
	.....	S	QKQ..E.....	.....	9 % (1/11)
	.....R.....A....S	.....	YEQ..E.....	.....R	9 % (1/11)
	.....R.....A....S	.....	YEQ.....K.....	.....R	9 % (1/11)
<b>VNP-9</b>	.....A.....	.....T	.ND.....Q..K.....	.....N	50 % (5/10)
	.....A.....	.....T	.ND.....	.....N	40 % (4/10)
	.....A.....	.....T	.ND.....Q.....	.....N	10 % (1/10)
<b>VNP-11</b>	.R.....V...N.....	.....	.ND...S...Q..K.....	.....G	33 % (3/9)
	.R.....V...N.....	.....	.ND...K...Q..K.....	.....G	22 % (2/9)
	.R.....N.....	.....	.ND...S...Q..K.....	.....G	22 % (2/9)
	.R.....V...N.....	.....R	.ND...N...Q..K.....	.....G	11 % (1/9)
	.R.....V...N.....	.....	.NA...N...Q..K.....	.....G	11 % (1/9)
<b>VNP16</b>	.....T	.....	YNK.....LQ.....	.....D	80 % (4/5)
	.....T	.....	YK...N...LQ.....	.....G	20 % (1/5)
<b>RP-2</b>	.....A.....	.....RT	.GD.....Q..K.....	.....D	88 % (7/8)
	.....A.....	.....G.RT	.GD.....Q..K.....	.....D	12 % (1/8)
<b>RP-6</b>	R.....P.A....T	.....	.SQ.....Q.....	.....G	44 % (4/9)
	.....P.A....I	.....	.SQ.....IQ.....	.....G	22 % (2/9)
	.....P.A....T	.....	.SQ.....IQ.....	.....G	11 % (1/9)
	.....P.A....T	.....	.SQ.....Q.....	.....N	11 % (1/9)
	...V.....P.A....T	.....	.SQ.....Q.....	.....	11 % (1/9)
<b>RP-7</b>	.....A....T	.....	.SQ.....Q....N...N	.....	29 % (2/7)
	.....A....T	.....	.NQ.....Q....N...	.....	29 % (2/7)
	.....A....T	.....	.NQ.....Q....N...N	.....	14 % (1/7)
	.....P.A....T	.....	.SQ.....Q....N...N	.....	14 % (1/7)
	.....A....T	.....	.NQ..N...Q....N...N	.....	14 % (1/7)
<b>RP-8</b>	.....T	.....	YNL..Q...Q.....	.....G	75 % (9/12)
	.....T	.....	YNL..Q...IQ.....	.....G	8 % (1/12)
	.....N	.....	YNL..Q...Q.....	.....G	8 % (1/12)
	.....N	.....	YNL..Q...Q.....	.....D	8 % (1/12)
<b>RP-10</b>	...L.....N...S	.....	IEA..E...Q..K..G..SE	.....	80% (4/5)
	...L.....N...S	.....	IKA..E...Q..K..G..SE	.....	20% (1/5)

Tot i que està descrit que la seqüència de l'epítop 3S és altament conservada (l'estudi de més de 250 seqüències de gp41 va demostrar que el 77% dels aïllats de VIH-1 estudiats presentaven la seqüència salvatge SWSNKS [114]), els polimorfismes K→R i S→T a les posicions 5 i 6 de l'epítop 3S són relativament freqüents, trobant-se presents, en el 10 i 13%, respectivament, d'aïllats de VIH-1 tan de soques amb tropisme X4 com R5 [114]. Ambdues variacions de l'epítop conserven la funció de la seqüència salvatge d'inducció del lligand de cèl·lules NK NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4+ [114]. Un anàlisi més extens va mostrar que l'epítop 3S estava envoltat per una regió amb una elevada variabilitat tan inter- com intra-pacients (Taula 7), on la majoria dels canvis estaven localitzats als residus 607, 612 i 619-621 de l'Env, tots ells adjacents a l'epítop 3S (Taula 7 i Figura 24A). Per avaluar l'efecte que aquests canvis podrien exercir en la capacitat de les Env d'induir l'expressió d'NKp44L a la superfície cel·lular, es van construir pseudovirus cotransfectant les Env amb el plasmidi pSG3 ( $\Delta$ Env) i es va provar la seva capacitat d'induir el lligand *in vitro* incubant-los amb cèl·lules T CD4+ primàries activades procedents de donants sans (DS). Per a la construcció dels pseudovirus, es va escollir el clon d'Env majoritari de cada pacient en relació a la seqüència de l'epítop 3S i les seves regions adjacents. Com a controls positius de l'experiment es van construir pseudovirus amb les envBaL i envNL4-3 i com a control negatiu es va utilitzar un pseudovirus sense Env ( $\Delta$ Env).

Tal com era d'esperar, els virions  $\Delta$ Env no van ser capaços d'induir l'expressió d'NKp44L, mentre que els pseudovirus amb les Env BaL i NL4-3 sí que van induir l'expressió d'NKp44L a alts nivells, comparables amb els que es van obtenir utilitzant un pèptid sintètic de la regió 3S de gp41 (Figura 24B). Els clons d'Env seleccionats dels pacients VNP van induir nivells d'expressió d'NKp44L comparables als controls positius en tots els casos i el mateix escenari es va observar per a les Env derivades dels pacients RP (Figura 24B). L'addició als cultius d'un anticòs anti-3S policlonal va inhibir significativament ( $p=0,0003$ ) l'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4+ tant quan s'utilitzaven per a la seva inducció pseudovirus amb Env derivades dels pacients com pseudovirus amb les Env control BaL o NL4-3. Aquests resultats van confirmar el rol específic de l'epítop 3S en l'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4+ (Figura 24C) i van descartar un defecte en la

capacitat d'inducció del lligand de les diferents Env tot i presentar una elevada variabilitat en les regions adjacents a l'epítot 3S.



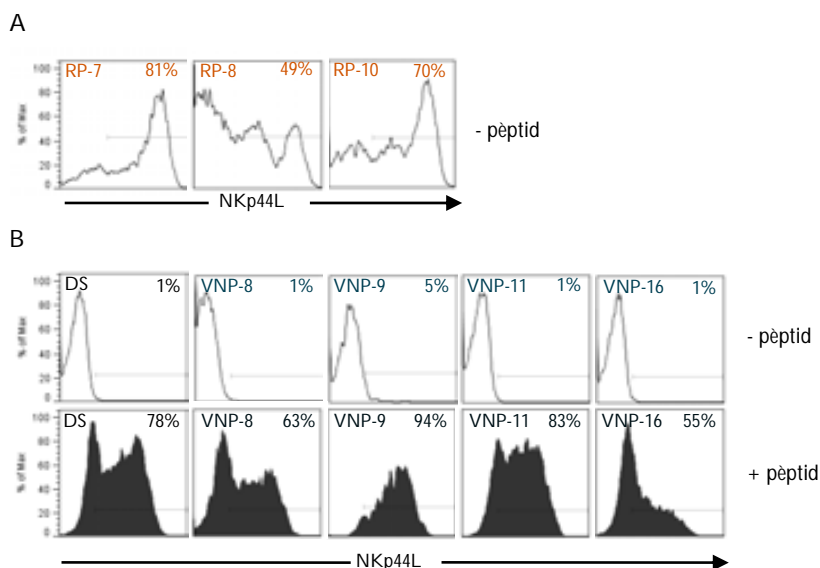
**Figura 24. Anàlisi de la capacitat de les diferents Env clonades d'induir NKp44L.**

A. Representació gràfica de la variabilitat de seqüència de l'epítot 3S de gp41 (SWSNKS) i les zones juxtaposades. El dibuix es va generar utilitzant el programa weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Els aminoàcids polars estan representats en vermell, els bàsics en blau els àcids en verd i els hidrofòbics en negre. B. Expressió del lligand NKp44L a la superfície de cèl·lules T CD4 procedents de donants sans després de ser incubades amb pseudovirus ΔEnv (psG3, control negatiu), un pèptid sintètic amb la seqüència consens de l'epítot 3S (3S pèptid, control positiu) o bé pseudovirus construïts amb les Env següents: envNL43 i envBaL (controls positius) o Env aïllades de pacients VNP (panells superiors) o pacients RP (panells inferiors). Els pics grisos corresponent a un marcatge control realitzat en cèl·lules T CD4 no tractades. C. Anàlisi de l'efecte d'un anticòs policlonal anti-3S sobre l'expressió de NKp44L induïda per diferents clons d'Env (Env Ctrl, envNL4-3 i envBaL; i 9 clons d'Env derivades de pacients VNP i RP). Els valors representen l'expressió relativa de Nkp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4 normalitzada a l'efecte del pèptid 3S sintètic (100%).



Un cop demostrada la capacitat de les Env de tots els pacients VNP i RP d'induir l'expressió d'NKp44L, es va analitzar l'expressió del lligand a la superfície de les CMSP criopreservades de tots els pacients VNP i dels pacients RP que tenien mostres disponibles (RP-7, RP-8 i RP-10). Pel que fa a les CMSP procedents dels individus RP, es van detectar nivells elevats (d'entre el 49 i el 81%) d'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en tots els casos (Figura 25A). En relació amb les CMSP de pacients VNP, l'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> va ser indetectable en tots els casos excepte en un pacient (VNP-9) on l'expressió tot i ser detectable va ser molt baixa, tant sols del 5% (Figura 25B).

Per avaluar la capacitat de les CMSP dels pacients VNP d'expressar NKp44L en superfície i descartar un defecte de les pròpies cèl·lules per expressar el lligand, aquestes es van incubar amb un pèptid sintètic de 15-mer corresponent a la regió 3S de gp41 durant 5 hores. El tractament de les cèl·lules amb el pèptid 3S va provocar la translocació del lligand a la seva superfície, tal com es va observar també utilitzant CMSP procedents de donants sans (Figura 25B). A més a més, els nivells d'expressió d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels pacients VNP després d'estar en contacte amb el pèptid 3S sintètic va ser comparable al nivell d'expressió basal d'NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels individus RP (Figura 25A i B). Aquestes observacions, en combinació amb la plena capacitat de les Env clonades dels pacients VNP d'induir NKp44L, van suggerir que un dels factors que estarien contribuint a la protecció de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en els pacients VNP podrien ser respostes humorals que impedirien la inducció, per part de l'Env, de l'expressió del lligand a la superfície cel·lular. De fet, es coneix que l'expressió en superfície de NKp44L en certs individus pot ser inhibida per respostes humorals contra l'epítot 3S [116-118] i que la desaparició d'aquests anticossos durant la progressió a sida, coincideix, a més, amb la depleció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i amb l'increment en l'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules [116, 210].



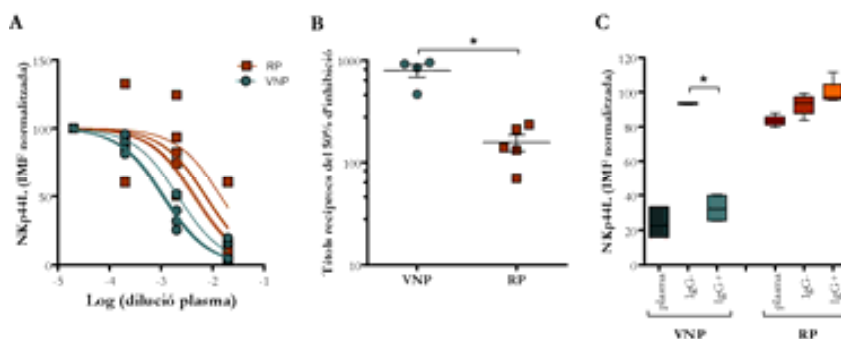
**Figura 25. Expressió d'NKp44L a la superfície de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> d'individus RP i VNP.** L'expressió *in vivo* de NKp44L es va avaluar en cèl·lules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> seleccionades per citometria de flux després de marcar amb anti-NKp44L, anti-CD3 i anti-CD4 les CMSP descongelades de pacients RP (panell A) i pacients VNP (panell B, diagrames superiors). Un donant sà (DS) representatiu també va ser analitzat (diagrama esquerre, panell B). Les CMSP dels pacients VNP i del DS també van ser incubades durant 5 hores amb un pèptid que conté la seqüència consens de l'epítot 3S (diagrames inferiors, panell B). En cada diagrama s'indica el percentatge de cèl·lules NKp44L positives.

## 2.4 Estudi de la resposta humoral dels pacients VNP i RP

### 2.4.1 Estudi de la resposta humoral contra la regió 3S de gp41

Per avaluar les respostes humorals funcionals contra l'epítot 3S de gp41 es va analitzar la capacitat dels plasmes dels pacients VNP i RP de bloquejar la inducció de l'expressió de NKp44L *in vitro*. A tal efecte, es van incubar durant 5 hores cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries purificades procedents de donants sans amb pseudovirus construïts amb les Env derivades dels pacients i diverses dilucions seriades (1/50, 1/500 i 1/5000) dels plasmes autòlegs dels quals es va calcular el títol d'inhibició (Figura 26A i B). Totes les mostres de plasma tant de pacients VNP com RP van ser capaces de bloquejar l'expressió d'NKp44L induïda per virus autòlegs. Tot i això, quan es van comparar els títols d'inhibició, les mostres dels pacients VNP van presentar una potència de bloqueig molt més elevada en

comparació amb les mostres de plasma dels pacients RP ( $p=0,016$ ) (Figura 26B). Per comprovar el paper dels anticossos anti-3S de les mostres de plasma en el bloqueig de l'expressió d'NKp44L observada anteriorment, es va induir l'expressió del lligand en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de donants sans mitjançant un pèptid sintètic de 15-mer que cobria la regió de l'epítot 3S (amb una seqüència consens basada en la soca de referència HXB-2) i es va analitzar la capacitat d'inhibició del plasma total, del plasma deplecionat en IgG i de les preparacions d'IgG purificades del plasma dels diversos pacients. En concordança amb els resultats obtinguts anteriorment, els plasmes dels pacients VNP van presentar elevats nivells d'inhibició de l'expressió d'NKp44L ( $77\% \pm 9\%$ ). Aquest efecte es va observar a nivells similars utilitzant les purificacions d'IgG ( $67 \pm 8\%$ ) i, en canvi, es perdia quan s'utilitzava la fracció de plasma que havia estat deplecionada en IgG ( $6,6 \pm 0,5\%$ ) (Figura 26C). Els pacients RP, en canvi, van presentar uns nivells d'inhibició molt més modestos ( $16 \pm 3\%$  per les mostres de plasma total) i, a més a més, aquest efecte no es va poder atribuir de forma clara a la fracció d'IgG purificades de plasma, almenys en les condicions experimentals utilitzades (Figura 26C).



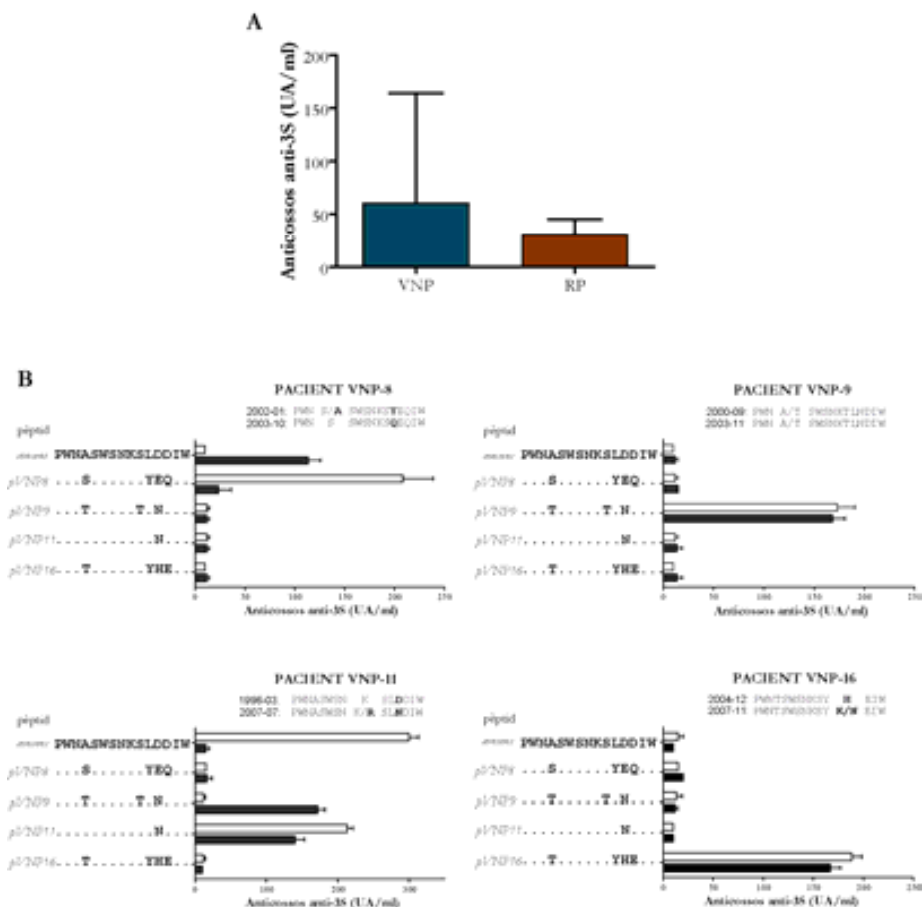
**Figura 26. Anàlisi funcional de la resposta anti-3S.** La capacitat de les mostres de plasma de pacients VNP (símbols blaus) i RP (símbols taronges) d'inhibir l'expressió de NKp44L induïda per pseudovirus autòlegs en cèl·lules T CD4 es va testar utilitzant diferents dilucions de plasma (rang: 1/50 - 1/5000). Per tal de normalitzar les dades, el valor de 100% es va atorgar a l'expressió de NKp44L obtinguda en absència de plasma (control positiu). El gràfic s'hi han representat les corbes normalitzades de dosi-resposta. B. Valors d'IC<sub>50</sub> dels plasmes dels pacients VNP i RP calculats a partir de les corbes representades al panell A i aplicant un model de regressió no lineal. C. Anàlisi de la capacitat de mostres de plasma total (dilució 1/100), plasma deplecionat en IgG (IgG<sup>-</sup>, dilució 1/100) i IgG purificades (IgG<sup>+</sup>, concentració 10 µg/ml) de pacients VNP (n=4) i RP (n=5), d'inhibir l'expressió de NKp44L induïda per un pèptid 3S consens. El valor de 100% correspon a l'expressió de NKp44L en absència de plasma. L'estrella significa un valor  $p < 0,05$  utilitzant la comparació Mann-Whitney.

Les respostes humorals es van caracteritzar també mitjançant la tècnica d'ELISA contra el pèptid amb la seqüència consens de l'epítot 3S. En aquests experiments es va comparar la presència d'anticossos anti-3S de les mostres de plasma dels pacients RP (dels quals es disposava d'una única mostra per pacient) amb la primera i última mostra de plasma disponible dels pacients VNP cobrint, d'aquesta manera, tot el període en què aquests van presentar una replicació no citopàtica del VIH-1. D'acord amb els resultats funcionals obtinguts anteriorment, els pacients RP van presentar un reconeixement molt limitat del pèptid 3S en ELISA, mentre que els pacients VNP van mostrar una prevalença superior d'anticossos contra aquesta regió de gp41 (Figura 27A). Tot i això, algunes mostres de pacients VNP van presentar una pobre reactivitat en ELISA contra el pèptid 3S consens. La incongruència entre aquesta darrera observació i l'elevada resposta funcional de les fraccions IgG dels plasmes dels pacients VNP bloquejant la inducció d'NKp44L induïda per pseudovirus autòlegs juntament amb l'elevada variabilitat de les regions adjacents a l'epítot 3S, suggeria que hi podria haver anticossos amb una especificitat alternativa al core central de l'epítot (SWSNKS) els quals estarien jugant un paper actiu en el bloqueig de l'expressió en superfície d'NKp44L en els pacients VNP. Per provar si la variabilitat de les seqüències adjacents a l'epítot 3S conferia certa especificitat a anticossos que podrien bloquejar la funció de l'epítot, es van dissenyar 4 pèptids (pVNP-8, pVNP-9, pVNP-11 i pVNP-16) de la regió 3S d'acord amb la seqüència específica de la gp41 de cada pacient VNP. Novament, la primera i la darrera mostra de plasma disponible del període de replicació no citopàtica de cada pacient VNP es va analitzar mitjançant la tècnica d'ELISA contra tots els pèptids sintetitzats i es va seqüenciar l'ectodomini de gp41 de cada mostra de plasma testada (Figura 27B). Els resultats de l'ELISA van demostrar que el plasma de cada pacient era capaç de reconèixer les seqüències autòlogues (Figura 27B). Les mostres de plasma dels pacients VNP-9 i -16 van reconèixer única i específicament el pèptid que contenia la seva seqüència autòloga (pVNP-9 i pVNP-16 respectivament). El pacient 8, però, va canviar la seva reactivitat al llarg del temps, de manera que la mostra inicial reconeixia la seva seqüència autòloga (pVNP-8) però la mostra final (amb la mutació Y→Q a la posició 11 del pèptid) va passar a reconèixer el pèptid 3S consens. El pacient 11, en canvi, va mostrar canvis paral·lels entre les mutacions en la seva seqüència autòloga i la resposta humoral present a les mostres de plasma. Inicialment, la seqüència del

---

seu ectodomini de gp41 coincidia amb la seqüència del pèptid 3S consens i és aquest el que era reconegut en major grau en l'assaig d'ELISA per part de la mostra de plasma inicial, tot i que aquesta mostra també reconeixia en menor mesura el pèptid pVNP-11. La mostra final, amb el canvi a la posició 12 D→N respecte el pèptid consens, ja no reconeixia la seqüència consens i en canvi sí que reconeixia tant el pèptid pVNP-11 com el pèptid pVNP-9, ambdós amb una arginina a la posició 12 del pèptid (Figura 27B). La reactivitat creuada entre els pèptids amb la seqüència adaptada als diferents pacients va ser pràcticament inexistent ja que la majoria de mostres de plasma reconeixien tan sols els pèptids amb la seva seqüència autòloga i tan sols la mostra final del pacient pVNP-11 va ser capaç de reconèixer el pèptid pVNP-9, probablement a través d'anticossos que reconeixien el fragment C-terminal del pèptid ja que en aquesta zona les seqüències d'ambdós pèptids coincidien (Figura 27B).

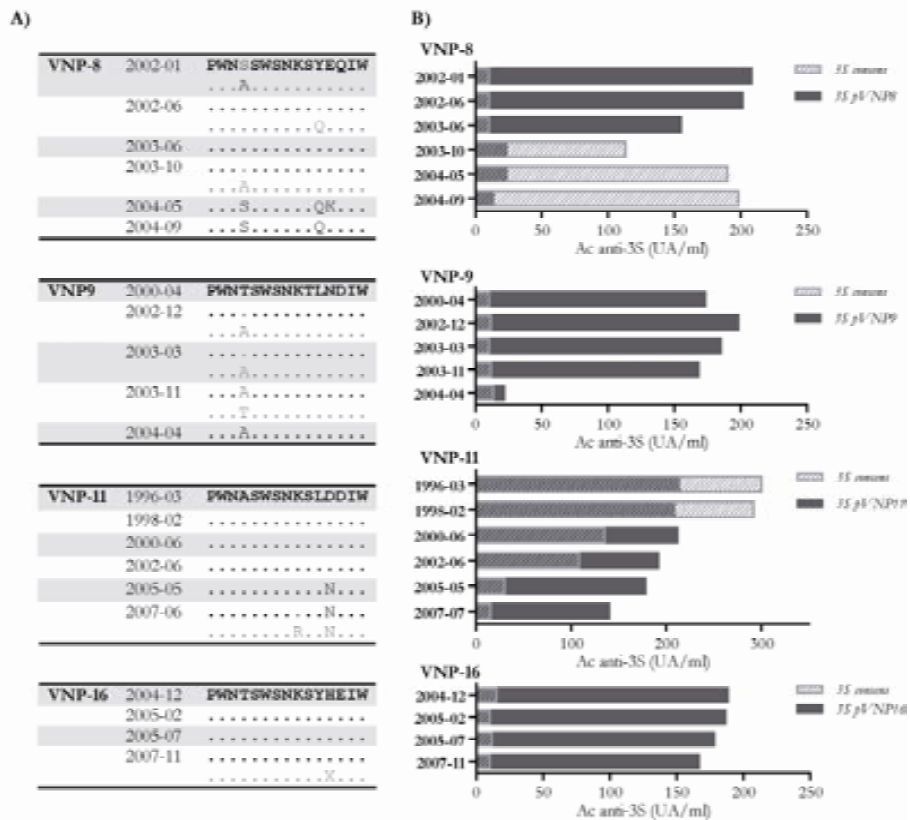
En referència als pacients RP, cap mostra de plasma de cap pacient va ser capaç de reconèixer alguna de les seqüències d'aquest set de pèptids (dades no mostrades).



**Figura 27. Caracterització per ELISA de les respostes humoral anti-3S.** A. Avaluació en triplicat de la capacitat del plasma de pacients VNP (n=8) i RP (n=5) de reconèixer el pèptid consens 3S en ELISA. Les dades s'expressen en unitats arbitràries d'absorbància per ml de plasma i les barres representen els valors mitjans +/- la desviació estàndard. B. Anàlisi del reconeixement de cinc pèptids diferents amb la seqüència consens de l'epítot 3S i la seva regió juxtaposada (residus 609-624 de gp41) o bé una seqüència basada en la seqüència majoritària dels diferents pacients, per part de mostres de plasma dels pacients VNP-8 (panell superior esquerre), VNP-9 (panell superior dret), VNP-11 (panell inferior esquerre) i VNP-16 (panell inferior dret). Es van avaluar dues mostres de cada pacient, la mostra disponible més primerenca (barres blanques) i la mostra utilitzada per al clonatge de l'Env (barres negres). La seqüència dels pèptids utilitzats en ELISA es representa a l'eix vertical de cada panell. Les seqüències poblacions autòlogues de cada pacient, obtingudes en les dates indicades (any-mes) també s'han representat a la part superior de cada panell. Els canvis observats intra-pacient s'han ressaltat en negreta. Les dades representen la mitjana i la desviació estàndard de triplicats de cada mostra.

#### 2.4.2 Evolució de l'epítotop 3S i la resposta humoral associada

Per analitzar més detalladament l'evolució de l'epítotop 3S i la resposta humoral associada en els pacients VNP, es van seleccionar diverses mostres de forma longitudinal per tal de cobrir tot el període de replicació no citopàtica del VIH i es va analitzar en paral·lel la seqüència de gp41 a nivell poblacional i la resposta humoral anti-3S a cada punt. Els pacients VNP-8, -9 i -16 van presentar una seqüència de l'epítotop 3S constant al llarg del temps però en canvi sí que es van observar canvis puntuals en les regions adjacents a l'epítotop en tots els casos. El pacient VNP-11 va presentar també canvis en les regions que envolten l'epítotop 3S i a més a més es va detectar el canvi conservador  $K \rightarrow R$ , descrit anteriorment, dins el propi 3S (Figura 28A). L'anàlisi per ELISA dels plasmes va revelar que els pacients VNP conservaven la capacitat de produir anticossos contra l'epítotop 3S al llarg de tot el període estudiat (Figura 28B). Els anticossos anti-3S detectats van ser específics de seqüència ja que, en la majoria de mostres de tots els pacients, l'ELISA només presentava un resultat positiu quan es realitzava amb un pèptid que contenia la seqüència autòloga i contemporània a l'epítotop 3S de cada mostra. El pacient VNP-11, per exemple, va presentar un ELISA positiu contra el pèptid 3S consens en les mostres compreses entre els anys 1996 i 2002, moment en el qual la seva seqüència autòloga de gp41 coincidia amb la del pèptid consens. A partir de l'any 2002 la seqüència de gp41 del pacient va presentar el canvi  $D \rightarrow N$  a la posició 620 que es va mantenir fins l'any 2007. Les mostres de plasma del període 2002-2007 van presentar un ELISA negatiu davant del pèptid 3S consens però en canvi l'ELISA realitzat contra el pèptid pVNP-11 que contenia l'esmentada mutació, sí que va mostrar la presència d'anticossos específics (Figura 26).



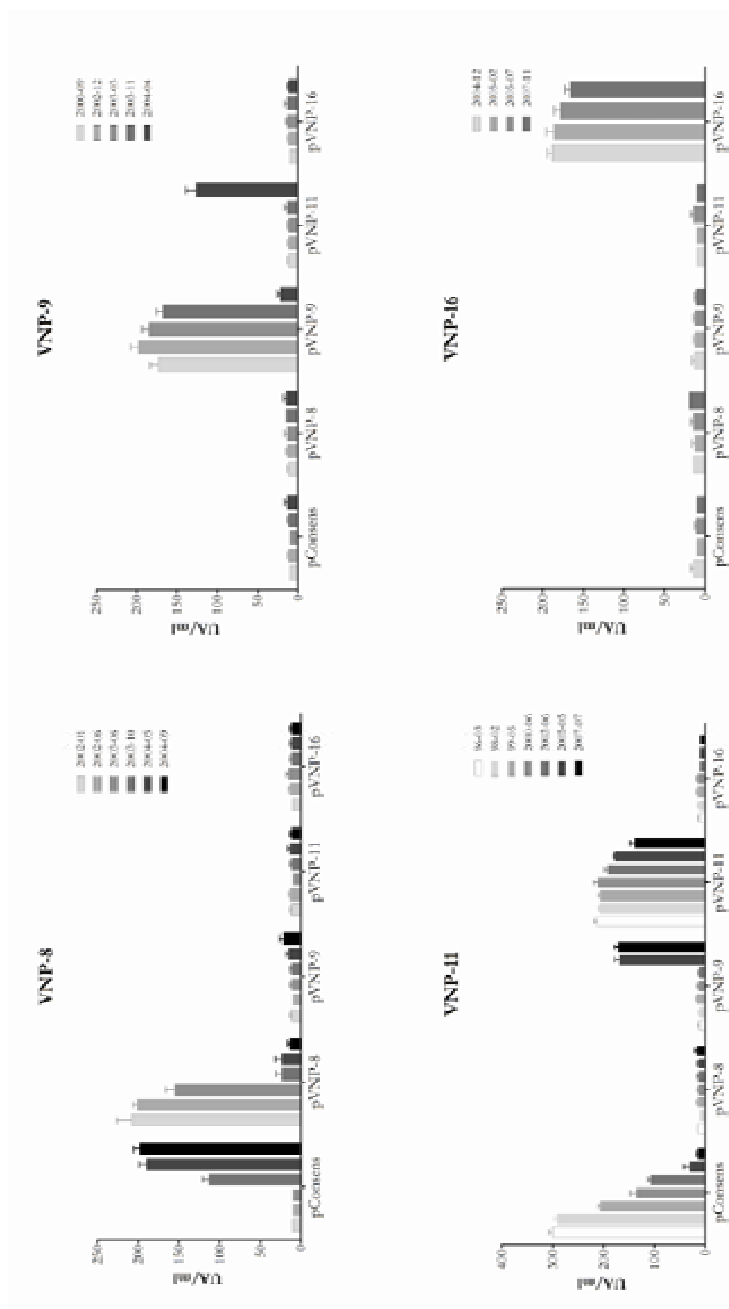
**Figura 28. Evolució de l'epítot 3S de gp41 i la resposta humoral associada.** A. Evolució de l'epítot 3S. Alineament de les seqüències d'aminoàcids de l'epítot 3S i la seva regió juxtaposada (residus 609-624 de l'Env, segons la nomenclatura de la soca de referència HXB-2) de cada pacient (VNP-8, VNP-9, VNP-11 i VNP-16) obtingudes a partir de mostres a diferents temps. B. Representació de la quantificació per ELISA de la presència d'anticossos anti-3S en les mostres longitudinals de plasma dels pacients VNP. L'ELISA es va realitzar contra un pèptid 3S amb la seqüència consens (barres ratllades) i també contra el pèptid basat en la seqüència pròpia de cada pacient (pVNP-8, pVNP-9, pVNP-11 i pVNP-16, barres grises). Les dades estan expressades en unitats arbitràries (UA) d'absorbància per ml de plasma i les barres representen els valors mitjans de 3 determinacions.

El pacient VNP-8 també va presentar un ELISA positiu durant tot el període, però en aquest cas les mostres del període 2002-2003 només van ser positives quan es va utilitzar el pèptid pVNP-8 i, en canvi, les mostres del període 2003/10 - 2004/09 van presentar diverses mutacions (Y→Q, E→K o S→A) diferenciant-se de la seqüència del pèptid pVNP-8, fet que va provocar que



l'ELISA realitzat contra aquest pèptid es tornés negatiu i, sorprenentment, es detectés un ELISA positiu davant del pèptid 3S consens (Figura 28). Finalment, la presència d'anticossos anti-3S en els pacients VNP-9 i VNP-16 només es va detectar utilitzant els pèptids amb les seqüències autòlogues corresponent i mai davant del pèptid 3S consens. En el cas del pacient VNP-9, però, la última mostra estudiada (2004-04) va presentar un ELISA negatiu utilitzant el pèptid pVNP-9. En aquest punt la seqüència de gp41 presentava la mutació A→T a la posició 612 diferint així de la seqüència del pèptid pVNP-9 (Figura 28A).

Per analitzar més exhaustivament l'especificitat dels anticossos anti-3S dels pacients VNP es van testar totes les mostres de plasma dels diferents pacients en ELISA contra tots els pèptids disponibles (3S consens, pVNP-8, pVNP-9, pVNP-11 i pVNP-16). Tal com s'observa a la figura 29, l'anàlisi de la reactivitat creuada va posar de manifest l'elevada especificitat dels anticossos detectats ja que va confirmar que la presència d'anticossos anti-3S en la majoria de mostres tant sols era possible quan l'ELISA es realitzava utilitzant un pèptid 3S amb la seqüència contemporània de cada pacient. D'un total de 22 mostres, tan sols es va observar reactivitat creuada en tres mostres del pacient VNP-8 que, com ja s'havia observat anteriorment, reaccionaven contra el pèptid 3S consens i dues mostres del pacient VNP-11 (mostres 2005-05 i 2007-07) que van reaccionar contra el pèptid pVNP-9. Les seqüències d'aquest pèptid i de les mostres esmentades, però, tan sols difereixen en la posició 612 (A vs T) conservant idèntica la regió C-terminal. Notablement, la mostra 2004-04 del pacient VNP-9 que havia presentat un resultat negatiu anteriorment va resultar ser positiva quan l'ELISA es va realitzar utilitzant el pèptid pVNP-11 (Figura 29) el qual, casualment, tenia una seqüència que coincidia amb la seqüència del pacient VNP-9 en aquest moment, demostrant, novament, que els pacients VNP presenten una resposta humoral sostinguda i específica davant l'epítot 3S.

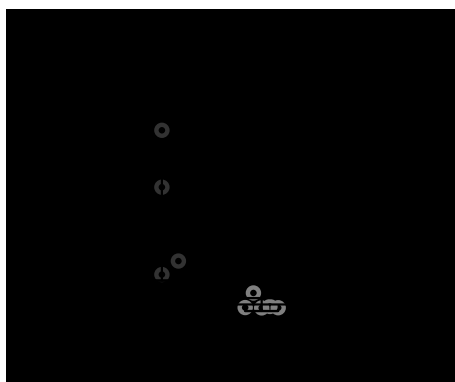


**Figura 29. Estudi longitudinal de la reactivitat creuada dels plasmes de pacients VNP contra diferents seqüències de l'epítot 3S de gp41.** Avaluació de la capacitat de les mostres longitudinals de plasma dels pacients VNP de reconèixer els diferents pèptids 3S (consens, pVNP-8, pVNP-9, pVNP-11 i pVNP-16) en ELISA. Les dades s'expressen en unitats arbitràries (UA) d'absorbància per ml de plasma i les barres representen els valors mitjans  $\pm$  la desviació estàndard de tres determinacions. Les barres més clares (blanc, gris clar) representen les mostres més primerenques de cada pacient mentre que les barres més fosques (gris fosc-negre) representen les mostres més tardanes.

### 2.4.3 Estudi de la resposta humoral anti-gp120 i de la capacitat de neutralització.

Per avaluar si la diferència en la resposta humoral observada entre els pacients VNP i RP era exclusiva de la via anti-3S o bé si tenia un efecte més general en la proteïna Env, es va analitzar la resposta anti-gp120 i també la resposta humoral amb capacitat neutralitzant dels plasmes dels diferents pacients.

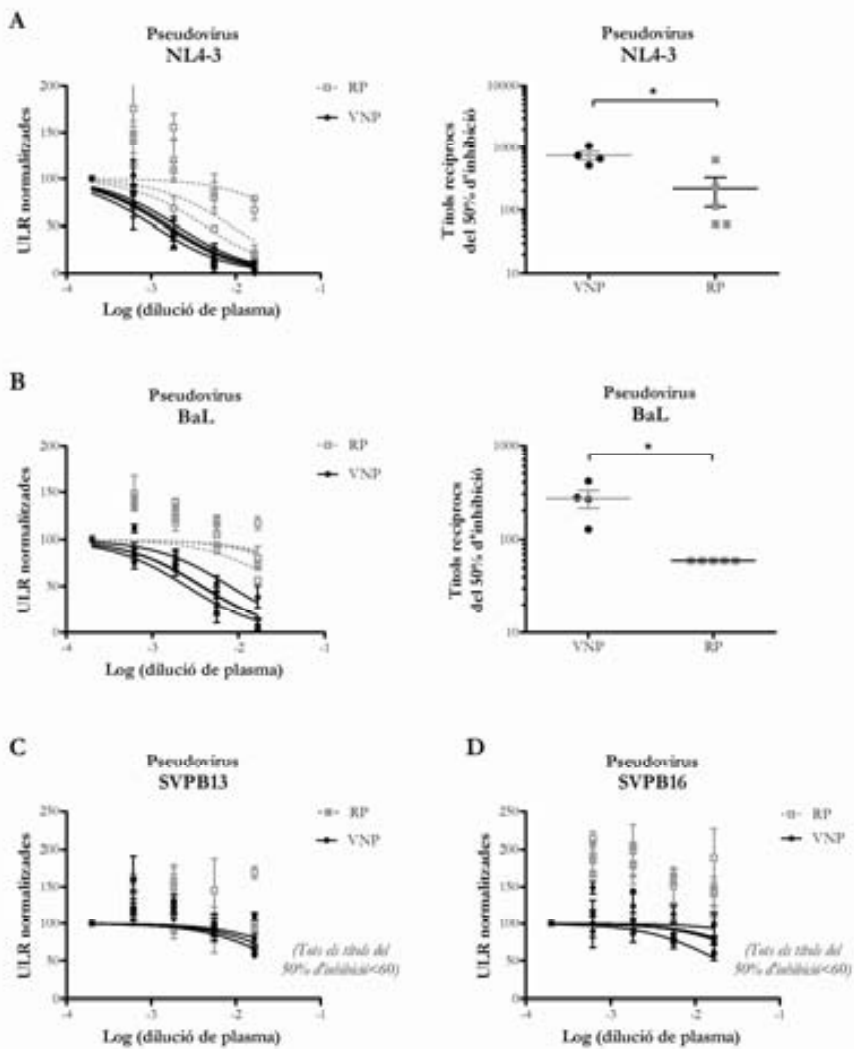
La resposta anti-gp120 es va valorar en un assaig d'ELISA utilitzant una proteïna gp120 recombinant i una recta patró realitzada amb concentracions conegudes de l'anticòs monoclonal IgGb12. Novament, la resposta humoral anti-gp120 dels plasmes dels pacients VNP va ser significativament superior ( $p=0,0159$ ) a la resposta detectada en els plasmes dels pacients RP (Figura 30).



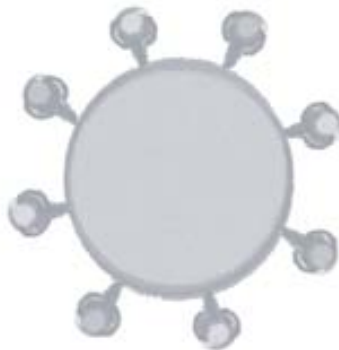
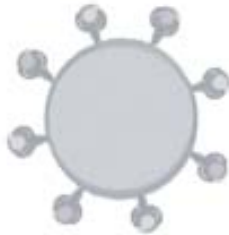
**Figura 30. Quantificació d'anticossos anti-gp120.** La presència d'anticossos anti-gp120 es va avaluar per ELISA en mostres de plasma de pacients VNP (símbols gris fosc), pacients RP (símbols gris clar) i donants sans (DS, símbols negres). Les dades s'expressen en unitats arbitràries (UA) de densitat òptica.

Pel que fa a l'activitat neutralitzant dels plasmes, els pacients VNP van presentar nivells més elevats de neutralització contra les soques víriques NL4-3 i BaL que els pacients RP. Tot i això, els títols de neutralització detectats no van mostrar una activitat potent (els valors eren molt moderats) ni d'ampli espectre (els plasmes no van presentar en cap cas una activitat neutralitzant detectable ( $>60$ ) davant dels aïllats primaris SVBP13 o SVBP16) (Figura 31).

En resum, els individus VNP van presentar una eficient resposta humoral amb una elevada especificitat de seqüència contra les regions adjacents a l'epítot 3S de gp41 en el context d'una resposta neutralitzant molt moderada contra la replicació del VIH.



**Figura 31. Anàlisi de l'activitat neutralitzant dels plasmes de pacients VNP i RP.** La capacitat neutralitzant del plasma de pacients VNP i RP es va testar contra pseudovirus amb les Env envNL43 (A) i envBaL (B) o contra pseudovirus amb Env procedents dels aïllats primaris SVPB13 (C) i SVPB16 (D) utilitzant la línia cel·lular TZM-bl. Als panells A i B, el panell de l'esquerra representa les corbes d'URL normalitzades per a cada dilució de plasma en escala logarítmica; els panells de la dreta representen els títols recíprocs del 50% d'inhibició (IC50) calculats a partir d'una regressió no lineal de les corbes normalitzades. Pels pseudovirus amb Env SVPB13 i SVPB16 no es van obtenir nivells detectables d'activitat neutralitzant (tots els títols recíprocs d'IC<sub>50</sub> eren inferiors al llindar de detecció de l'assaig, ≤60).



## **DISCUSSION**





La capacitat fusogènica de la subunitat gp41 de l'Env s'ha associat clarament amb la depleció de cèl·lules T CD4 *in vitro* [66, 68, 96, 113] esdevenint, potencialment, un dels principals determinants virològics de la citopaticitat de la infecció pel VIH. Per aquesta raó, el desenvolupament d'un mètode que permeti avaluar i comparar *in vitro* la capacitat fusogènica de diferents Env, especialment Env procedents d'aïllats primaris, és de gran interès. El model proposat en aquesta tesi consisteix en el cocultiu de cèl·lules 293T cotransfectades amb un plasmidi que codifica per l'Env objecte d'estudi i el plasmidi pTat amb cèl·lules TZM-bl com a dianes. Aquestes últimes contenen diverses còpies, integrades dins el seu genoma, dels gens de la luciferasa i la  $\beta$ -galactosidasa sota el control del promotor del VIH (activat per la proteïna Tat). D'aquesta manera, quan es produeix la fusió entre les cèl·lules 293T Env+/Tat+ i les cèl·lules TZM-bl la proteïna Tat expressada per les cèl·lules 293T activa el promotor del gen de la luciferasa i la seva activitat, mesurada per luminometria, proporciona una mesura quantitativa de la capacitat fusogènica de l'Env. A més a més, les cèl·lules TZM-bl expressen el receptor (CD4) i ambdós coreceptors (CCR5 i CXCR4) del VIH permetent l'estudi d'Env amb tropisme tant R5 com X4.

La cinètica va mostrar que, almenys en el nostre model, la fusió era detectable entre les 4 i les 12 hores de cocultiu ja que els valors luminomètrics augmentaven durant aquest interval de temps arribant a un màxim generalment a les 12 hores. A partir d'aquest punt els valors es mantien més o menys constants fins a les 24 hores i disminuïen clarament quan es mesuraven a les 48 hores de cocultiu. L'estancament a les 24 hores (i posterior disminució) dels valors de luminometria podria ser degut a la limitada disponibilitat de cèl·lules diana per a la formació de nous sincicis a partir de les 12 hores i a que, a més a més, els sincicis formats prèviament, els quals se sap que tenen una vida mitja curta [113, 199], poden començar a morir a partir de les 24 hores de cultiu.

Per avaluar l'efecte que exercia la mort cel·lular en la mesura de l'activitat fusogènica, els cocultius es van realitzar en presència de l'inhibidor general de caspases ZVAD-fmk. En aquest cas els valors de luminometria augmentava clarament fins a les 24 hores i es mantien més o menys constant a les 48 hores de cocultiu. Aquests resultats van reforçar la hipòtesis de que, almenys en el nostre model, a les 48 hores ja no es produïa la formació de nous sincicis i també que a les 24 hores alguns del sincicis preformats estaven morint, fent

disminuir la detecció d'activitat luciferasa, efecte contrarestat per l'inhibidor de caspases.

En conjunt, els resultats obtinguts apunten a que el punt òptim per a la detecció de fusió és a les 6 hores de cocultiu, ja que en aquest punt la fusogenicitat ja és detectable i no està influenciada per la mort cel·lular (l'efecte de l'addició de ZVAD representa menys del 20% del valor mitjà). En canvi, a les 24 hores de cocultiu els valors de fusió es normalitzen arribant a un màxim similar en la majoria dels casos. En aquest cas la utilització de ZVAD-fmk proporciona una mesura addicional de la citopaticitat induïda per l'Env, si hom compara la magnitud de la diferència entre els valors luminomètrics del cocultiu amb i sense inhibidor realitzat amb una mateixa Env. Com és gran sigui aquesta diferència més citopàtica serà l'Env estudiada.

Malgrat l'ús d'una línia cel·lular estable com a diana, la necessitat d'expressar les Env de manera transitòria genera una variabilitat experimental excessiva. Per aquesta raó és molt important utilitzar un control intern de l'experiment com pot ser l'anàlisi de l'EnvNL4-3 o l'EnvBaL (en funció del tropisme de les Env avaluades) i així poder normalitzar els valors obtinguts. De fet, la variabilitat observada en la mesura de luminometria entre diferents experiments es redueix notablement si els valors són normalitzats, permetent així la correcta comparació entre diversos experiments independents.

El model de fusió desenvolupat es complementa amb la utilització en els cocultius dels compostos JM-2987 i TAK-779 (antagonistes dels coreceptors CXCR4 i CCR5, respectivament), la qual cosa ens proporciona, addicionalment, una mesura fenotípica del tropisme de les Env analitzades. Així, la susceptibilitat de les Env a un o altre antagonista ens indica un ús preferencial del coreceptor CXCR4 o CCR5 en la interacció i posterior fusió d'una cèl·lula que expressa l'Env a la seva superfície i una cèl·lula no infectada, reflectint l'ús d'un o altre coreceptor durant el procés d'entrada viral. La determinació del tropisme víric és un factor important clínicament ja que s'ha associat al pronòstic i a la progressió de la infecció [101] i, a més a més, recentment s'han incorporat en la teràpia antiretroviral antagonistes de CCR5 com ara el Maraviroc [213-216]. L'eficàcia d'aquestes teràpies depèn de la presència en el pacient de soques víriques únicament amb tropisme R5 i, per tant, es recomana fer un test d'ús de coreceptor abans de la seva prescripció. Actualment, l'únic assaig validat



clínicament per identificar el tropisme víric és l'anomenat Trofile (Monogram Biosciences, Inc) el qual es basa en la construcció de pseudovirus utilitzant l'Env dels pacients. En el cas del nostre assaig no es construeixen pseudovirus, però igualment sí que s'avaluen les Env senceres dels pacients, assegurant la valoració de tots els determinants del tropisme víric, ja que tot i que aquest s'ha associat majoritàriament al llaç V3 es coneix que altres regions de l'Env poden modular l'ús d'un o altre coreceptor [37, 38]. A més a més, el model proposat s'ha utilitzat per a l'anàlisi de 100 Env procedents d'aïllats primaris del VIH i els resultats de tropisme obtinguts (R5 en tots els casos) concorden al 100% amb les prediccions de tropisme *in silico* realitzades utilitzant els programes *pssm* [188] i *geno2pheno* [189].

Per valorar la contribució de la capacitat fusogènica de gp41 en la inducció de mort en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> es van construir els mutants env41.2 (que conté una mutació en la posició 2 del PF de gp41 que li impedeix iniciar el procés de fusió [176]) i envΔT (mutant que té delecionada la regió intracitoplasmàtica de gp41, fet que s'ha descrit que implica un augment en la seva citopaticitat [186, 217]). Es va avaluar la capacitat fusogènica, la inducció de mort en cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, la relació entre l'hemifusió i la inducció d'apoptosi i el procés d'autofàgia dels diferents mutants i de l'Env salvatge envNL43.

Tal com era d'esperar, el mutant envΔT va presentar un augment de més del 150% en la fusogenicitat en comparació amb la versió salvatge de l'Env i el mutant env41.2 no va presentar valors detectables de fusió, de manera que el nostre model de fusió reproduïa els resultats obtinguts a través d'altres models d'estudi que havien estat descrits anteriorment a la literatura per aquestes mateixes variants de l'Env [176, 186]. En relació amb la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries, vam observar que l'envΔT provocava els nivells més elevats de mort cel·lular, els quals arribaven a ser fins a un 67% superiors als observats utilitzant l'envNL4-3 salvatge, comprovant novament la major citopaticitat de l'Env envΔT. En relació amb el mutant env41.2, la manca de capacitat d'induir fusió entre dues membranes cel·lulars es reflectia també en l'absència d'inducció de mort cel·lular en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries. Finalment, també es va utilitzar (com a control negatiu) el mutant envD368R, incapaç d'unir-se a la molècula CD4, el qual no va mostrar ni activitat fusogènica ni inducció de mort cel·lular, tal com era d'esperar.

Nombrosos estudis han relacionat el procés d'hemifusió amb la inducció d'apoptosi en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> individuals no infectades [66, 69, 96]. Per això vam estudiar també l'efecte de la deleció de la regió intracitoplasmàtica de l'Env i la mutació del PF en el procés d'hemifusió i en la inducció d'apoptosi en cèl·lules individuals. Novament, el mutant env $\Delta$ T va presentar un augment significatiu en la inducció d'hemifusió que correlacionava amb un augment també en la inducció d'apoptosi, suggerint que la hemifusió és suficient per transmetre senyals proapoptòtics a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> individuals, tal com està descrit a la literatura [69, 96]. L'alteració del PF de gp41 (mutant env41.2) abolia completament la capacitat d'induir hemifusió i, conseqüentment, també apoptosi cel·lular.

La regió citoplasmàtica de gp41 conté diversos motius implicats en el tràfic intracel·lular i l'expressió en superfície de l'Env [39, 41, 43, 218]. Entre ells el més extensament caracteritzat és el motiu GYXX $\Phi$  situat a les posicions 711-715 de l'Env de la soca de referència HXB-2 [39, 41, 44], a part d'altres motius que contenen tirosina (com el motiu YW situats a les posicions 802-803 l'Env HXB-2 [43]) o un motiu dileucina a les posicions 855-856 [218]. En conjunt, s'ha vist que tots ells estan implicats en l'endocitosi [39-41], la distribució polaritzada [42] i el reciclatge cap a l'aparell de Golgi [43] de l'Env a través d'interaccions amb diversos components de la maquinària de tràfic endocític incloent-hi els adaptadors de clatrina AP-1 i AP-2 [44, 45] i la proteïna TIP47, involucrada en el transport de certs receptors dels endosomes a l'aparell de Golgi [43]. Així, almenys en part, la major citopaticitat descrita pel mutant env $\Delta$ T, podria relacionar-se amb el fet que no conté cap dels motius d'endocitosi esmentats anteriorment i, per tant, podria torbar-se incrementada la seva expressió en superfície.

Tot i que, en general, la via de mort cel·lular més estudiada en relació amb la citopaticitat de l'Env del VIH-1 és l'apoptosi, treballs previs han demostrat que l'Env expressada a la superfície d'una cèl·lula infectada també pot induir mort cel·lular a través de la via autofàgica. De fet, s'ha demostrat que l'autofàgia induïda per l'Env requereix la unió a CD4 i a CXCR4 però els resultats apunten a que la senyalització a través d'ambdós coreceptors no és necessària [71, 205]. Així, la utilització d'un mutant de CD4 (CD4.403) incapaç de transmetre senyals intracel·lulars o bé de diferents mutants de CXCR4 amb variacions a la seva regió intracitoplasmàtica que l'inhabiliten per induir diverses senyals específiques,

no impedeix la inducció d'autofàgia per part de l'Env [71, 205]. Per aquesta raó, ja que la interacció entre gp120 i CD4 i CXCR4 és necessària per a induir autofàgia però no a través de la seva senyalització intracel·lular, ens va semblar interessant explorar el paper del procés de fusió en aquest context. Partint del nostre interès per caracteritzar els mecanismes citopàtics associats a la capacitat fusogènica de gp41 i a l'experiència del grup de la Dra. Biard-Piechanczyk en l'estudi de l'autofàgia en el camp de la infecció pel VIH, vam establir una col·laboració per tal d'avaluar el possible paper de l'activitat fusogènica de gp41 en la inducció d'autofàgia utilitzant els mutants env $\Delta$ T i env41.2.

En primer lloc, utilitzant el mutant env41.2 es va observar que la mutació puntual del segon aminoàcid del PF de gp41 suprimia completament la inducció d'autofàgia mediada per l'Env. Tot i això, la utilització de T20 o C34, els quals bloquegen el pas posterior de reorganització de les hèlix HR-1 i HR-2 formant una estructura en feix (*6-helix bundle*), va inhibir completament l'autofàgia mediada per l'Env envNL4-3 salvatge en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries, suggerint que la inserció del PF no era suficient per promoure autofàgia. Així, es va observar, en segon lloc, que a part de la inserció del PF a la membrana de la cèl·lula diana, la formació de l'estructura en feix de les hèlix HR-1 i HR-2 de gp41 era necessària per promoure l'autofàgia. Aquesta conclusió es reforça pel fet que el mutant env $\Delta$ T, el qual, tal i com hem vist, presenta una deleció de la regió citoplasmàtica de gp41 que accelera el procés de fusió entre les membranes [186], accelerava també el procés d'autofàgia. Cal ressaltar que la possible major expressió en superfície de l'env $\Delta$ T respecte l'Env salvatge deguda a una menor endocitosis i reciclatge descrita anteriorment no és suficient, en aquest cas, per explicar la major citopaticitat de l'Env $\Delta$ T, ja que tots els experiments d'autofàgia es van realitzar en unes condicions en les quals s'havia normalitzat els nivells d'expressió de totes les Env avaluades. Així, tot i que sí que vam comprovar que el mutant env $\Delta$ T s'expressava en major mesura a la superfície cel·lular (ja que es va haver de reduir a la meitat la quantitat de plasmidi env $\Delta$ T utilitzat en la transfecció de les cèl·lules efectores per tal d'igualar la seva expressió en superfície a la de la resta de les Env), un cop normalitzats els nivells d'expressió, l'env $\Delta$ T continuava essent més patogènica, presentant una formació accelerada de sincicis i una major inducció d'autofàgia i apoptosi cel·lular. Cal destacar que tant les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> individuals com els sincicis presentaven autofàgia dependent de l'Env, suggerint que el procés d'hemifusió ja és suficient per induir

l'autofàgia. Els mecanismes que acabaran conduint posteriorment a la inducció d'autofàgia en les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> no infectades poden ser diversos. Per una banda, certs lípids bioactius involucrats en la organització de les membranes, com el colesterol, les ceramides o els esfingolípidis, així com les proteïnes del citoesquelet podrien contribuir en la inducció d'autofàgia ja que se sap que es troben implicats en el procés de fusió i que, a més a més, juguen un paper clau en la regulació tant de la supervivència com de la mort cel·lular i en les interaccions entre el VIH i les cèl·lules hoste [47, 219, 220]. Per altra banda, no es pot excloure la possibilitat de que la pròpia la fusió cel·lular, un tret característic dels organismes multicel·lulars involucrat en la diferenciació i el desenvolupament i responsable de la patogènesis en resposta a infeccions víriques i bacterianes, pugui actuar directament en la ruta autofàgica. Tot i això, cada model patològic s'hauria d'analitzar individualment degut a la complexitat i la multiplicitat dels fenòmens que es produeixen en el context de la infecció tant en les cèl·lules infectades com en les no infectades, i a les capacitats específiques de cada patogen per redirigir l'autofàgia cap al seu propi benefici [221]. Concretament, pel VIH-1, s'ha demostrat que les espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*) s'incrementen tan en cèl·lules mononuclears primàries no infectades com en una línia cel·lular CD4<sup>+</sup> després de ser cocultivades amb una cèl·lula que expressa l'Env a la seva superfície [222]. Diferents estudis han demostrat que l'acumulació de ROS forma part del procés d'autofàgia [223-225], suggerint que la funció fusogènica de gp41 podria provocar una situació d'estrès oxidatiu cel·lular que conduiria a l'autofàgia com a resposta immediata. Per altra banda, recentment s'ha descrit que gp41 interacciona a través de l'epítip 3S amb el receptor gC1qR a la superfície de les cèl·lules T CD4, provocant en última instància, l'expressió en superfície del lligand per a cèl·lules NK NKp44L [115]. Remarcablement, la via de senyalització activada en la interacció entre gp41 i gC1qR implica l'activació seqüencial de diverses proteïnes, entre elles la NADPH-oxidasa que produeix H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un tipus de ROS [115]. Així, podríem especular que un dels mecanismes pels quals gp41 podria contribuir a la inducció d'autofàgia seria també la seva interacció amb el receptor gC1qR a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. Actualment no podem discernir si l'autofàgia induïda per gp41 va dirigida a protegir les cèl·lules T CD4 de la mort cel·lular, com s'ha vist en diferents models biològics [226], o bé si l'autofàgia s'activa amb el propòsit final de

destruir les cèl·lules, però la conseqüència final de l'autofàgia desencadenada *in vitro* per gp41 és la mort dels limfòcits T CD4+.

En resum, s'han proporcionat evidències per afirmar que l'activitat fusogènica/hemifusogènica de gp41 està involucrada en la inducció d'autofàgia un cop gp120 s'ha unit a CD4 i CXCR4.

Per estudiar la contribució dels diferents mecanismes citopàtics de l'Env en la depleció de cèl·lules T CD4+ *in vivo*, es va caracteritzar el tropisme, la capacitat fusogènica de gp41 i les respostes immunes relacionades amb l'Env en pacients VIH+ que presenten una dinàmica de pèrdua de cèl·lules T CD4+ marcadament diferent. Amb aquest propòsit, es van seleccionar dos grups de pacients els quals presentaven una elevada replicació vírica (amb CV superiors a les 10.000 còpies d'ARN/ml) i, per una banda, una pèrdua ràpida i dràstica de cèl·lules T CD4 (individus RP), o bé, per altra banda, uns nivells paradoxalment elevats i constants al llarg del temps de les cèl·lules T CD4+ (individus VNP). L'estudi dels mecanismes de mort cel·lular associats a l'Env en aquest darrer grup de pacients, els quals presenten una replicació no citopàtica del VIH, en combinació amb una caracterització de la resposta immunològica generada, pot ajudar a descriure la contribució individual de diferents mecanismes implicats en la pèrdua de cèl·lules T CD4+ observada durant el curs de la infecció pel VIH, tot i la limitació que implica l'extraordinària excepcionalitat d'aquests pacients [160, 168].

Treballs previs havien descrit diferències en la capacitat fusogènica d'Env clonades de pacients controladors d'elit o bé pacients en etapes presida en comparació amb pacients que progressaven a fases de sida [187, 227]. En el nostre estudi, també s'ha abordat la qüestió de la capacitat fusogènica de les Env avaluant diferents paràmetres funcionals d'Env clonades de pacients VNP i RP. En cap cas, però, no vam ser capaços de detectar diferències significatives entre ambdós grups d'individus. De fet, el percentatge de clons d'Env funcionals, el nivell d'expressió de les Env (tant mesurat com a percentatge de cèl·lules Env+ com per la Intensitat Relativa de Fluorescència) i l'índex de fusogenicitat van mostrar valors similars per als pacients VNP i RP. El paper irrellevant de l'activitat fusogènica en els pacients VNP i RP estudiats en comparació amb els resultats previs de Lassen et al [227] podria dependre de l'elevada evolució

observada en les Env dels nostres pacients VNP, els quals presenten CV superiors als LTNP "habituals" (10.000 *versus* 2.000 còpies d'ARN/ml). Per altra banda, i en concordança amb els nostres resultats, un estudi on es comparava la citopaticitat de clons vírics aïllats de pacients progressors o bé de pacients VNP va mostrar nivells similars de replicació i depleció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> en cultius de teixits limfoide i, a més a més, els aïllats procedents de pacients LTNP amb CV baixes no van presentar efectes citopàtics significatius i replicaven pobrement en els cultius [160], reforçant la idea del canvi d'escenari dins del propi grup de pacients LTNP en funció de la seva CV.

L'estudi del tropisme dels clons d'Env aïllats dels diferents individus VNP i RP va mostrar un ús homogeni de CCR5 com a coreceptor víric (avaluat tant fenotípicament com *in silico*) exclouent un paper potencial de l'ús del coreceptor CXCR4 en la nostra petita cohort de pacients.

Així, tot i que els assajos de fusió *in vitro* utilitzant línies cel·lulars poden diferir de les funcions de l'Env *in vivo*, els nostres resultats suggereixen que el tropisme víric o bé defectes en la capacitat fusogènica no poden explicar la diferència en relació amb la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> observada entre els pacients VNP i els RP. Tot i això, en un estudi recent realitzat pel nostre grup de recerca on s'avaluava la pèrdua total o la inducció d'apoptosi en cultius de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries, vam demostrar que, en algun cas, Env amb fusogenicitats similars podien presentar diferències en termes de citopaticitat [228]. Per descartar una possible diferència en la citopaticitat de les Env dels pacients VNP en comparació amb les Env dels pacients RP no relacionada amb la seva capacitat fusogènica, s'està duent a terme actualment un estudi detallat de la citopaticitat de les Env en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries.

A part de la capacitat fusogènica, l'any 2005 el grup liderat pel Pr. Patrice Debré a París va descriure un nou mecanisme que relacionava la gp41 amb la destrucció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de manera indirecta a través de l'activitat citotòxica de les cèl·lules NK [114]. Així, es va veure que el contacte entre l'epítip 3S, situat al llaç de gp41 entre les 2 regions helicoidals, i el receptor pel domini globular del component 1q del complement (gC1qR) a la superfície de les cèl·lules T CD4 no infectades provoca l'expressió en superfície del lligand

NKp44L [115] el qual condueix a la destrucció de l'esmentada cèl·lula quan és reconegut per una cèl·lula NK activada [114]. Considerant el rol deleteri de l'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4, posteriorment vam analitzar el potencial paper citopàtic de gp41 a través de la inducció de l'expressió de NKp44L. Els clons d'Env d'ambdós grups de pacients van presentar seqüències conservades de l'epítip 3S i, conseqüentment, van mostrar una plena capacitat d'induir, *in vitro*, l'expressió de NKp44L a la superfície de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries procedents de donants sans. Tot i això, l'avaluació de l'expressió del lligand NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels pacients VNP i RP va mostrar un perfil diferent ja que, sorprenentment, l'expressió en superfície era nul·la o molt baixa (5%) en el cas dels pacients VNP i en canvi era molt alta (50-80%) en el cas dels pacients RP. No obstant, les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels pacients VNP no van presentar un defecte inherent en l'expressió del lligand, ja que quan s'estimulaven amb un pèptid sintètic corresponent a la regió 3S de gp41 la detecció de NKp44L a la superfície de les seves cèl·lules T CD4<sup>+</sup> assolia nivells comparables als detectats en les cèl·lules dels pacients RP sense tractar (74% *versus* 67% de mitjana). A més a més, la translocació en superfície del lligand NKp44L va ser inhibida, *in vitro*, pel plasma dels pacients VNP amb una eficiència significativament superior en comparació amb el plasma dels pacients RP, essent la fracció IgG la responsable d'aquest efecte. Un anàlisi més profund de la resposta humoral anti-3S en els pacients VNP va revelar que, sorprenentment, tant sols alguns sèrums de pacients VNP testats reconeixien un pèptid amb la seqüència consens de l'epítip 3S, mentre que la resta no presentaven nivells d'anticossos detectables contra aquest pèptid. La incongruència entre aquests resultats i la manca d'expressió *in vivo* de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels pacients VNP juntament amb l'elevada capacitat d'inhibició presentada pels plasmes autòlegs dels pacients de l'expressió de NKp44L *in vitro* ens va suggerir que hi havia algun factor que influenciava negativament el resultat de l'ELISA anti-3S. Així, partint de l'elevada variabilitat intra i inter-pacient detectada en les regions juxtaposades a l'epítip 3S, vam pensar que potser l'especificitat dels anticossos que inhibien *in vitro* (i possiblement *in vivo*) l'expressió del lligand podria estar modulada per les seqüències adjacents a l'epítip 3S i no anar dirigits contra la regió central d'aquest (SWSNKS). Per avaluar-ho, es van dissenyar 4 pèptids sintètics amb una seqüència basada en la seqüència vírica majoritària de cadascun dels pacients.

Utilitzant els 4 pèptids específics (pVNP8, pVNP9, pVNP11 i pVNP16) vam observar que tots els pacients VNP presentaven títols elevats d'anticossos, i vam comprovar que aquests anaven dirigits no contra el core central de l'epítot sinó contra les seves regions juxtaposades. Consistentment, el pacient VNP-16, el virus del qual presenta una seqüència YKE en les posicions 620-622, reconeix específicament el pèptid pVNP-16 el qual conté la seqüència YHE en aquestes posicions. El pacient VNP-8, el virus del qual conté la seqüència YEQ als mateixos residus esmentats anteriorment, reconeix intensament el pèptid pVNP-8 en el qual hi trobem la mateixa seqüència. De forma interessant, no es va observar reactivitat creuada entre ambdós pacients ja que el pacient VNP-16 no va reconèixer el pèptid pVNP-8 ni a l'inversa. Un escenari similar es va observar pels pacients VNP-9 i VNP-11, en els quals el canvi D621N determinava el reconeixement en ELISA del pèptid corresponent, tot i que en aquest cas es va observar una reactivitat creuada i no recíproca. El virus autòleg del pacient VNP-9 presentava una mescla d'alanina i treonina en aquesta posició i el seu plasma reconeixia el pèptid pVNP-9 (el qual conté una treonina en aquesta posició) però en canvi no reconeix el pèptid pVNP-11 que conté una alanina. Possiblement, tot i observar-se una mescla d'ambdós aminoàcids a la seqüència poblacional, la treonina pot ser més representativa de la població vírica contemporània o bé podria ser l'aminoàcid present en mostres anteriors de manera que el pacient presentaria principalment anticossos que reconeixien aquest aminoàcid. En el cas del pacient VNP-11, en canvi, la seqüència poblacional revelava la presència d'una alanina a la posició 612 però tot i això, el plasma d'aquest pacient va reconèixer de manera pràcticament similar ambdós pèptids, tant el que conté l'alanina (pVNP-11) com el que conté la treonina (pVNP-9) en aquesta posició.

Amb tot això, cal recalcar que l'anàlisi longitudinal de les respostes anti-3S en els pacients VNP va mostrar la presència durant tot el període de replicació vírica no citopàtica de diversos anticossos amb especificitats úniques contra la regió juxtaposada a l'epítot 3S de gp41, de manera que no sembla que aquesta resposta humoral pugui ser la conseqüència d'una estimulació antigènica constant i de llarga durada de les cèl·lules B. L'observada evolució de la seqüència de les regions juxtaposades a l'epítot 3S de gp41 i de la resposta humoral específica va ser un resultat sorprenent, ja que en principi una regió de l'Env que no és diana d'anticossos neutralitzants no esperaríem que estigués

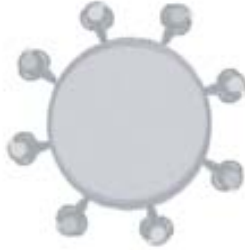
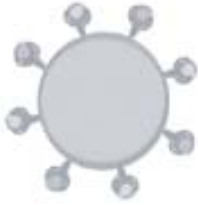


sotmesa a una pressió immunològica elevada. Així doncs, la relativa elevada variabilitat de la regió de gp41 que conté l'epítot 3S al llarg del temps i sobretot la presència durant tot el període d'anticossos específics contra les seves regions flanquejants, que van variant la seva especificitat en funció de la seqüència vírica majoritària i contemporània, suggereixen un possible rol d'aquesta regió de l'Env en la patogènesis vírica. Actualment s'està duent a terme un estudi més acurat de l'evolució de la seva seqüència, basat en seqüències clonals i no poblacionals, per tal de caracteritzar correctament la possible evolució d'aquest epítot i valorar si aquesta es produeix de forma independent o bé si els canvis observats depenen de l'evolució d'una altra regió de l'Env sotmesa a una elevada pressió immunològica.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, s'ha demostrat que l'epítot 3S de gp41 induïx la translocació de NKp44L a la superfície cel·lular activant sensors cel·lulars d'estrès oxidatiu. L'epítot 3S interacciona amb el receptor gC1qR a la membrana de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> activant una via de senyalització dependent de la PI3K/NADPH oxidasa i de la GTPasa p190 RhoGAP que culmina amb la translocació del lligand NKp44L a la superfície cel·lular [115]. Així, els anticossos contra l'epítot 3S actuarien obstaculitzant la unió de l'epítot al seu receptor. Els resultats obtinguts suggereixen que els anticossos específics anti-gp41 dirigits contra la regió variable adjacent a l'epítot 3S detectats en els pacients VNP podrien limitar la capacitat de gp41 d'induir l'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> d'aquests individus, tot i que el seu mecanisme concret d'actuació roman indefinit. Els esmentats anticossos podrien representar una defensa compensatòria contra la patogenicitat de gp41 i la depleció de cèl·lules T CD4 quan els anticossos dirigits contra l'epítot 3S de 6 aminoàcids altament conservats (SWSNKS) estan disminuint, tal com succeeix normalment durant la progressió de la malaltia [114, 116-118]. Conseqüentment, els nivells d'expressió de NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> aïllades dels individus VNP van ser pràcticament inexistent, tot i presentar una plena capacitat de resposta davant de l'epítot 3S i la seva exposició continuada a Env totalment funcionals *in vivo*, amb CV > 10.000 còpies d'ARN/ml durant més de 2 anys.

Suprimint l'expressió de NKp44L, els anticossos contra l'epítot 3S o les seves regions flanquejants podrien contribuir més a la protecció de les cèl·lules

T que els anticossos neutralitzants ja que, en el nostre estudi, els individus VNP no són capaços de desenvolupar una resposta neutralitzant àmplia contra el VIH. De fet, tot i que alguns estudis suggereixen que la presència d'anticossos neutralitzants és superior en individus LTNP en comparació amb altres individus infectats pel VIH [229, 230], la seva rellevància *in vivo* roman controvertida ja que diversos grups han descrit un reduït, sinó inexistent, impacte de les respostes neutralitzants en les condicions clíniques o la progressió a sida [231, 232]. En canvi, els anticossos anti-3S, els quals en principi són independents de la neutralització ja que aquest epitop no s'ha identificat com a diana d'anticossos neutralitzants contra el VIH [233], podrien tenir efectes favorables indirectes en la supervivència de les cèl·lules T CD4+ [114].



## **CONCLUSIONS**





## Conclusions

1. El cocultiu durant 6 hores de cèl·lules 293T que expressen l'Env i Tat per cotransfecció i cèl·lules TZM-bl constitueix un model adequat per a l'avaluació de la capacitat fusogènica de l'Env del VIH-1. La utilització dels antagonistes dels coreceptors CCR5 i CXCR4 (TAK-779 i JM-2987 respectivament) proporciona, a més, una mesura fenotípica del tropisme de les Env estudiades.
2. L'anàlisi dels mutants env $\Delta$ T', env41.2 i envD368R proporciona evidències de la relació entre la capacitat fusogènica de l'Env i la seva citopaticitat contra cèl·lules T CD4<sup>+</sup> primàries així com també de la relació entre el procés d'hemifusió i la inducció d'autofàgia/apoptosi en les cèl·lules individuals no infectades.
3. Les Env procedents de virus aïllats d'individus VNP són funcionalment similars a les Env aïllades de pacients RP en termes d'expressió, tropisme, fusió i inducció del lligand de cèl·lules NK NKp44L. Per tant, la diferent dinàmica de pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> observada en els pacients VNP en comparació amb els RP no pot ser explicada per defectes de l'Env relacionats amb les funcions enumerades anteriorment.
4. La presència d'anticossos altament específics en els pacients VNP dirigits contra la regió juxtaposada a l'epítotop 3S de gp41 pot obstaculitzar l'expressió del lligand de cèl·lules NK NKp44L a la superfície de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> contribuint a la seva protecció en aquest reduït grup de pacients. La resposta humoral neutralitzant en pacients VNP presenta un ventall reduït i poca potència, suggerint un paper residual d'aquesta resposta en el fenotip de VNP.

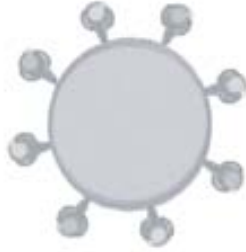
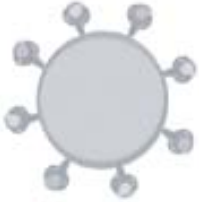


## ARTICLES PUBLICATS

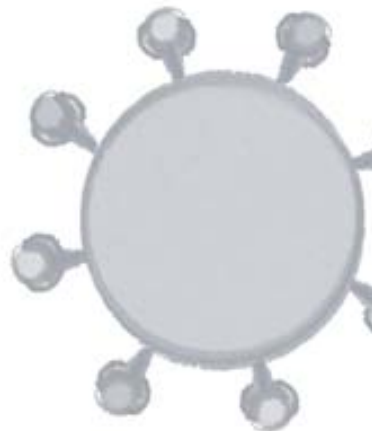
- 1. Susceptibility of human lymphoid tissue cultured *ex vivo* to xenotropic murine leucemia virus-related virus (XMRV) infection.**  
Curriu M, Carrillo J, Massanella M, Garcia E, Cunyat F, Peña R, Wienberg P, Carrato C, Areal J, Bofill M, Clotet B, Blanco J, Cabrera C. PLoS One. 2012;7(5):e37415.
- 2. Evaluation of the Cytopathicity (Fusion/Hemifusion) of Patient-Derived HIV-1 Envelope Glycoproteins Comparing Two Effector Cell Lines.**  
Cunyat F\*, Curriu M\*, Marfil S, García E, Clotet B, Blanco J, Cabrera C. J Biomol Screen. 2012 Jul;17(6):727-37. Epub 2012 Mar 16.
- 3. The HR2 polymorphism N140I in the HIV-1 gp41 combined with the HR1 V38A mutation is associated with a less cytopathic phenotype.**  
Cunyat F, Marfil S, García E, Svicher V, Pérez-Alvárez N, Curriu M, Perno CF, Clotet B, Blanco J, Cabrera C. Retrovirology. 2012 Feb 14;9:15.
- 4. Viremic HIV infected individuals with high CD4 T cells and functional envelope proteins show anti-gp41 antibodies with unique specificity and function.**  
Curriu M, Fauster-Bovendo H, Pernas M, Massanella M, Carrillo J, Cabrera C, López-Galíndez C, Clotet B, Debré P, Vieillard V, Blanco J. PLoS One. 2012;7(2):e30330. Epub 2012 Feb 1.
- 5. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells.**  
Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, Curriu M, Mamoun R, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. Autophagy. 2008 Nov;4(8):998-1008. Epub 2008 Nov 1.
- 6. HIV transfer between CD4 T cells does not require LFA-1 binding to ICAM-1 and is governed by the interaction of HIV envelope glycoprotein with CD4.**  
Puigdomènech I, Massanella M, Izquierdo-Useros N, Ruiz-Hernandez R, Curriu M, Bofill M, Martinez-Picado J, Juan M, Clotet B, Blanco J. Retrovirology. 2008 Mar 31;5:32.







## **BIBLIOGRAFIA**





1. <http://www.hiv.lanl.gov/>
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
3. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
4. Tebit, D.M. and E.J. Arts, *Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease*. Lancet Infect Dis. **11**(1): p. 45-56.
5. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
6. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
7. Erickson-Viitanen, S., et al., *Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1989. **5**(6): p. 577-91.
8. Henderson, L.E., et al., *Gag precursors of HIV and SIV are cleaved into six proteins found in the mature virions*. J Med Primatol, 1990. **19**(3-4): p. 411-9.
9. Schneider, J. and S.B. Kent, *Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease*. Cell, 1988. **54**(3): p. 363-8.
10. Loeb, D.D., et al., *Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 111-21.
11. von Schwedler, U.K., et al., *Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly*. EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1555-68.
12. Cheng, Y.C., et al., *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs*. J Biol Chem, 1987. **262**(5): p. 2187-9.
13. Starnes, M.C. and Y.C. Cheng, *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated RNase H activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(12): p. 7073-7.
14. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
15. Kozarsky, K., et al., *Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989. **2**(2): p. 163-9.
16. Stein, B.S. and E.G. Engleman, *Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex*. J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2640-9.
17. Helseth, E., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein*. J Virol, 1991. **65**(4): p. 2119-23.
18. Wyatt, R. and J. Sodroski, *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1884-8.

19. Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff, *Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol. **91**(Pt 1): p. 1-12.
20. Miller, R.J., et al., *Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7187-95.
21. Hsu, K., et al., *Membrane potential depolarization as a triggering mechanism for Vpu-mediated HIV-1 release*. Biophys J. **99**(6): p. 1718-25.
22. Schubert, U., et al., *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2280-8.
23. Foti, M., et al., *Nef-mediated clathrin-coated pit formation*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 37-47.
24. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 338-42.
25. Kogan, M. and J. Rappaport, *HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention*. Retrovirology. **8**: p. 25.
26. Goff, S.P., *Death by deamination: a novel host restriction system for HIV-1*. Cell, 2003. **114**(3): p. 281-3.
27. Checkley, M.A., B.G. Luttge, and E.O. Freed, *HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation*. J Mol Biol. **410**(4): p. 582-608.
28. Freed, E.O., D.J. Myers, and R. Risser, *Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160*. J Virol, 1989. **63**(11): p. 4670-5.
29. Willey, R.L., et al., *Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): p. 5038-42.
30. Starcich, B.R., et al., *Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS*. Cell, 1986. **45**(5): p. 637-48.
31. Leonard, C.K., et al., *Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10373-82.
32. Lasky, L.A., et al., *Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein*. Science, 1986. **233**(4760): p. 209-12.
33. Cann, A.J., et al., *The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 305-9.
34. Hwang, S.S., et al., *Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1*. Science, 1991. **253**(5015): p. 71-4.
35. Verrier, F., et al., *Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **15**(8): p. 731-43.

36. Groenink, M., et al., *Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration*. Science, 1993. **260**(5113): p. 1513-6.
37. Groenink, M., et al., *Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain*. J Virol, 1992. **66**(10): p. 6175-80.
38. Huang, W., et al., *Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5584-93.
39. Rowell, J.F., P.E. Stanhope, and R.F. Siliciano, *Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 473-88.
40. LaBranche, C.C., et al., *A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5217-27.
41. Bowers, K., et al., *The simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein contains multiple signals that regulate its cell surface expression and endocytosis*. Traffic, 2000. **1**(8): p. 661-74.
42. Lodge, R., et al., *The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells*. EMBO J, 1997. **16**(4): p. 695-705.
43. Blot, G., et al., *Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6931-45.
44. Berlioz-Torrent, C., et al., *Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1350-61.
45. Boge, M., et al., *A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15773-8.
46. Caffrey, M., *HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors*. Trends Microbiol. **19**(4): p. 191-7.
47. Jacobs, A., et al., *HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and pathogenesis: implications for therapy and vaccine development*. Vaccine, 2008. **26**(24): p. 3026-35.
48. Han, Y., et al., *Experimental approaches to the study of HIV-1 latency*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(2): p. 95-106.
49. Berzofsky, J.A., et al., *Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 450-62.
50. Peliska, J.A. and S.J. Benkovic, *Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1992. **258**(5085): p. 1112-8.
51. Engelman, A., K. Mizuuchi, and R. Craigie, *HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1211-21.

52. *Pneumocystis pneumonia*--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(21): p. 250-2.
53. Durack, D.T., *Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1465-7.
54. *Persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982. **31**(19): p. 249-51.
55. Ziegler, J.L., et al., *Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1984. **311**(9): p. 565-70.
56. UNAIDS/WHO. Report on the global AIDS Epidemic 2010.
57. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. 2007, Philadelphia: Saunders Elsevier. viii, 566 p.
58. Fauci, A.S., *The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis*. Science, 1988. **239**(4840): p. 617-22.
59. Hazenberg, M.D., et al., *T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 285-9.
60. Varbanov, M., L. Espert, and M. Biard-Piechaczyk, *Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins*. AIDS Rev, 2006. **8**(4): p. 221-36.
61. Wood, R., et al., *Quantification and comparison of HIV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells and isolated CD4+ T cells*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. **6**(3): p. 237-40.
62. McCune, J.M., *The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 974-9.
63. Finkel, T.H., et al., *Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes*. Nat Med, 1995. **1**(2): p. 129-34.
64. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 471-84.
65. Blanco, J., et al., *CD4(+) and CD8(+) T cell death during human immunodeficiency virus infection in vitro*. Virology, 2001. **285**(2): p. 356-65.
66. Blanco, J., et al., *R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(4): p. 804-11.
67. Blanco, J., et al., *The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling*. AIDS, 1999. **13**(8): p. 909-17.
68. Garg, H. and R. Blumenthal, *HIV gp41-induced apoptosis is mediated by caspase-3-dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 351-62.
69. Garg, H., et al., *Site-specific mutations in HIV-1 gp41 reveal a correlation between HIV-1-mediated bystander apoptosis and fusion/hemifusion*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 16899-906.

70. Holm, G.H., et al., *Apoptosis of bystander T cells induced by human immunodeficiency virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure*. J Virol, 2004. **78**(9): p. 4541-51.
71. Espert, L., et al., *Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2161-72.
72. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
73. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 63-7.
74. Arnoult, D., et al., *The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection*. Semin Immunol, 2009. **21**(4): p. 223-32.
75. Gougeon, M.L., *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 392-404.
76. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1542-52.
77. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1032-6.
78. Canu, N., et al., *Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1228-42.
79. Guimaraes, C.A., et al., *Alternative programs of cell death in developing retinal tissue*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41938-46.
80. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
81. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 conjugation system in mammalian autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2503-18.
82. Kihara, A., et al., *Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 330-5.
83. [www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com)
84. Wang, J., et al., *The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells*. Virology, 2007. **359**(2): p. 243-52.
85. Geleziunas, R., et al., *HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 834-8.
86. Wolf, D., et al., *HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1217-24.
87. Xu, X.N., et al., *Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1489-96.
88. Ewart, G.D., et al., *The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 7108-15.
89. Casella, C.R., E.L. Rapaport, and T.H. Finkel, *Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 92-100.

90. Konvalinka, J., et al., *An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity.* J Virol, 1995. **69**(11): p. 7180-6.
91. Weichold, F.F., et al., *HIV-1 protease inhibitor ritonavir modulates susceptibility to apoptosis of uninfected T cells.* J Hum Virol, 1999. **2**(5): p. 261-9.
92. Sloand, E.M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor modulates activation of peripheral blood CD4(+) T cells and decreases their susceptibility to apoptosis in vitro and in vivo.* Blood, 1999. **94**(3): p. 1021-7.
93. Phenix, B.N., et al., *Decreased HIV-associated T cell apoptosis by HIV protease inhibitors.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(6): p. 559-67.
94. Negredo, E., et al., *Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications.* Clin Infect Dis. **50**(9): p. 1300-8.
95. Ahr, B., et al., *Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins.* Retrovirology, 2004. **1**: p. 12.
96. Blanco, J., et al., *Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events.* Virology, 2003. **305**(2): p. 318-29.
97. Tateyama, M., et al., *CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway.* Blood, 2000. **96**(1): p. 195-202.
98. Banda, N.K., et al., *Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis.* J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1099-106.
99. Hoxie, J.A., et al., *Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV.* Science, 1986. **234**(4780): p. 1123-7.
100. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1.* Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
101. Tersmette, M., et al., *Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality.* Lancet, 1989. **1**(8645): p. 983-5.
102. Tersmette, M., et al., *Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates.* J Virol, 1989. **63**(5): p. 2118-25.
103. Rudensey, L.M., et al., *Progression to AIDS in macaques is associated with changes in the replication, tropism, and cytopathic properties of the simian immunodeficiency virus variant population.* Virology, 1995. **207**(2): p. 528-42.
104. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population.* J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.



105. Paxton, W.A., et al., *Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 412-7.
106. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
107. Ballana, E., et al., *HLA class I protective alleles in an HIV-1-infected subject homozygous for CCR5-Delta32/Delta32*. Immunobiology.
108. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
109. Barretina, J., et al., *Anti-HIV-1 activity of enfuvirtide (T-20) by inhibition of bystander cell death*. Antivir Ther, 2003. **8**(2): p. 155-61.
110. Chernomordik, L.V. and M.M. Kozlov, *Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 175-207.
111. Melikyan, G.B., *Driving a wedge between viral lipids blocks infection*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(40): p. 17069-70.
112. Karlsson, G.B., et al., *The envelope glycoprotein ectodomains determine the efficiency of CD4+ T lymphocyte depletion in simian-human immunodeficiency virus-infected macaques*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1159-71.
113. Garg, H. and R. Blumenthal, *Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(20): p. 3134-44.
114. Vieillard, V., J.L. Strominger, and P. Debre, *NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10981-6.
115. Fausther-Bovendo, H., et al., *HIV gp41 engages gC1qR on CD4+ T cells to induce the expression of an NK ligand through the PIP3/H2O2 pathway*. PLoS Pathog, 2010. **6**: p. e1000975.
116. Vieillard, V., et al., *Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection*. AIDS, 2006. **20**(14): p. 1795-804.
117. Vieillard, V., et al., *CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NKp44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques*. AIDS, 2008. **22**(2): p. 185-92.
118. Vieillard, V., et al., *A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2100-4.
119. Vieillard, V., et al., *Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **53**(5): p. 564-73.
120. <http://www.hiv.lanl.gov/>
121. Hazenberg, M.D., et al., *Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation*. AIDS, 2003. **17**(10): p. 1419-24.

122. Hazenberg, M.D., et al., *Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1881-8.
123. Bofill, M., et al., *Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients*. AIDS, 1996. **10**(8): p. 827-34.
124. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load*. Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
125. Leng, Q., et al., *Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **27**(4): p. 389-97.
126. Resino, S., et al., *CD4(+) T-cell immunodeficiency is more dependent on immune activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **42**(3): p. 269-76.
127. Massanella, M., et al., *CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART*. AIDS. **24**(7): p. 959-68.
128. Hunt, P.W., et al., *T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2003. **187**(10): p. 1534-43.
129. Appay, V. and D. Sauce, *Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 231-41.
130. Betts, M.R., et al., *Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 11983-91.
131. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
132. Pabst, R., M.W. Russell, and P. Brandtzaeg, *Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut*. Trends Immunol, 2008. **29**(5): p. 206-8; author reply 209-10.
133. Sharpstone, D., et al., *Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea*. Gut, 1999. **45**(1): p. 70-6.
134. Badley, A.D., et al., *Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis*. Blood, 2000. **96**(9): p. 2951-64.
135. Badley, A.D., et al., *Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 199-206.
136. Carrington, M. and G. Alter, *Innate Immune Control of HIV*. Cold Spring Harb Perspect Med. **2**(7): p. a007070.
137. Liu, J. and M. Roederer, *Differential susceptibility of leukocyte subsets to cytotoxic T cell killing: implications for HIV immunopathogenesis*. Cytometry A, 2007. **71**(2): p. 94-104.
138. Munoz, A., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men*.

- Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol*, 1989. **130**(3): p. 530-9.
139. Dalmau, J., et al., *Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV type 1 infection*. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(2): p. 229-38.
140. Cao, Y., et al., *Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(4): p. 201-8.
141. Pantaleo, G., et al., *Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(4): p. 209-16.
142. Casado, C., et al., *Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression*. *PLoS One*. **5**(6): p. e11079.
143. Rey-Cuille, M.A., et al., *Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 3872-86.
144. Broussard, S.R., et al., *Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease*. *J Virol*, 2001. **75**(5): p. 2262-75.
145. Chakrabarti, L.A., *The paradox of simian immunodeficiency virus infection in sooty mangabeys: active viral replication without disease progression*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 521-39.
146. Dang, Q. and V.M. Hirsch, *Rapid disease progression to AIDS due to Simian immunodeficiency virus infection of macaques: host and viral factors*. *Adv Pharmacol*, 2008. **56**: p. 369-98.
147. Hirsch, V.M., et al., *Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication*. *J Virol*, 1995. **69**(2): p. 955-67.
148. Letvin, N.L., et al., *Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III*. *Science*, 1985. **230**(4721): p. 71-3.
149. Baskin, G.B., et al., *Necropsy findings in rhesus monkeys experimentally infected with cultured simian immunodeficiency virus (SIV)/delta*. *Vet Pathol*, 1988. **25**(6): p. 456-67.
150. Lafeuillade, A., et al., *Correlation between surrogate markers, viral load, and disease progression in HIV-1 infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1994. **7**(10): p. 1028-33.
151. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia*. *Immunity*, 2003. **18**(3): p. 441-52.
152. Gordon, S.N., et al., *Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys*. *J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 3026-34.
153. Sumpter, B., et al., *Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1680-91.
154. Harris, L.D., et al., *Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of*

- natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques.* J Virol. **84**(15): p. 7886-91.
155. Kaur, A., et al., *Identification of multiple simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL epitopes in sooty mangabeys with natural and experimentally acquired SIV infection.* J Immunol, 2000. **164**(2): p. 934-43.
156. Paiardini, M., et al., *Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4(+) T cells are associated with limited CCR5 expression.* Nat Med. **17**(7): p. 830-6.
157. Beaumier, C.M., et al., *CD4 downregulation by memory CD4+ T cells in vivo renders African green monkeys resistant to progressive SIVagm infection.* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 879-85.
158. Liu, Z., et al., *CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **18**(4): p. 332-40.
159. Liu, Z., et al., *Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **16**(2): p. 83-92.
160. Choudhary, S.K., et al., *Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease.* J Virol, 2007. **81**(16): p. 8838-42.
161. Hunt, P.W., et al., *Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy.* J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 126-33.
162. Kanya, P., et al., *T cell Activation does not drive CD4 decline in longitudinally followed HIV-infected Elite Controllers.* AIDS Res Ther. **8**(1): p. 20.
163. Gao, X., et al., *AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis.* Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1290-2.
164. Gao, X., et al., *Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS.* N Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1668-75.
165. Carrington, M. and S.J. O'Brien, *The influence of HLA genotype on AIDS.* Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 535-51.
166. Berger, C.T., et al., *High-functional-avidity cytotoxic T lymphocyte responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associated with relative HIV control.* J Virol. **85**(18): p. 9334-45.
167. Mothe, B., et al., *CTL responses of high functional avidity and broad variant cross-reactivity are associated with HIV control.* PLoS One. **7**(1): p. e29717.
168. Rotger, M., et al., *Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque.* J Clin Invest. **121**(6): p. 2391-400.
169. Sandler, N.G., et al., *Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection.* J Infect Dis. **203**(6): p. 780-90.
170. Pear, W.S., et al., *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8392-6.

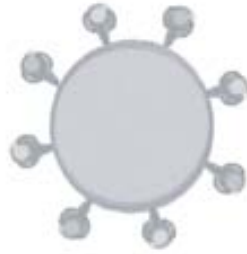
171. Platt, E.J., et al., *Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2855-64.
172. Foley, G.E., et al., *Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia*. Cancer, 1965. **18**: p. 522-9.
173. Bedinger, P., et al., *Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 162-5.
174. Benkirane, M., K.T. Jeang, and C. Devaux, *The cytoplasmic domain of CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells*. EMBO J, 1994. **13**(23): p. 5559-69.
175. Freed, E.O., D.J. Myers, and R. Risser, *Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4650-4.
176. Freed, E.O., et al., *A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 70-4.
177. Li, Y., et al., *Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1414-26.
178. Li, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10108-25.
179. Purvis, S.F., et al., *HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(4): p. 443-50.
180. Patki, A.H. and M.M. Lederman, *HIV-1 Tat protein and its inhibitor Ro 24-7429 inhibit lymphocyte proliferation and induce apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors*. Cell Immunol, 1996. **169**(1): p. 40-6.
181. Wei, X., et al., *Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(6): p. 1896-905.
182. De Clercq, E., et al., *Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 668-74.
183. Baba, M., et al., *A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5698-703.
184. Gallo, S.A., et al., *The stability of the intact envelope glycoproteins is a major determinant of sensitivity of HIV/SIV to peptidic fusion inhibitors*. J Mol Biol, 2004. **340**(1): p. 9-14.
185. Olshevsky, U., et al., *Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 5701-7.
186. Wilk, T., T. Pfeiffer, and V. Bosch, *Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product*. Virology, 1992. **189**(1): p. 167-77.

187. Sterjovski, J., et al., *Asn 362 in gp120 contributes to enhanced fusogenicity by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with AIDS*. *Retrovirology*, 2007. **4**: p. 89.
188. Jensen, M.A., et al., *A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences*. *J Virol*, 2006. **80**(10): p. 4698-704.
189. Sing, T., et al., *Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates*. *Antivir Ther*, 2007. **12**(7): p. 1097-106.
190. Montefiori, D.C., *Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV, and SHIV in luciferase reporter gene assays*. *Curr Protoc Immunol*, 2005. **Chapter 12**: p. Unit 12 11.
191. Cardoso, R.M., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41*. *Immunity*, 2005. **22**(2): p. 163-73.
192. Blanco, J., et al., *Characterization of adenosine receptors in brush-border membranes from pig kidney*. *Br J Pharmacol*, 1992. **107**(3): p. 671-8.
193. Meissner, E.G., et al., *Fusion-induced apoptosis contributes to thymocyte depletion by a pathogenic human immunodeficiency virus type 1 envelope in the human thymus*. *J Virol*, 2006. **80**(22): p. 11019-30.
194. Etemad-Moghadam, B., et al., *Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2001. **75**(12): p. 5646-55.
195. Koot, M., et al., *Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(2): p. 349-54.
196. Spijkerman, I., et al., *Emergence of syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 variants coincides with a transient increase in viral RNA level and is an independent predictor for progression to AIDS*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(2): p. 397-403.
197. Lifson, J.D., et al., *Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein*. *Nature*, 1986. **323**(6090): p. 725-8.
198. Sodroski, J., et al., *Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity*. *Nature*, 1986. **322**(6078): p. 470-4.
199. Ferri, K.F., et al., *Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1081-92.
200. Castedo, M., et al., *Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope*. *EMBO J*, 2002. **21**(15): p. 4070-80.
201. Kemble, G.W., T. Danieli, and J.M. White, *Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 383-91.
202. LaBonte, J.A., N. Madani, and J. Sodroski, *Cytolysis by CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins is dependent on membrane*

- fusion and can be inhibited by high levels of CD4 expression.* J Virol, 2003. **77**(12): p. 6645-59.
203. Roumier, T., et al., *Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1321-9.
204. Gougeon, M.L. and L. Montagnier, *Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **887**: p. 199-212.
205. Denizot, M., et al., *HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells.* Autophagy, 2008. **4**(8): p. 998-1008.
206. Gandhi, R.T., et al., *HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism.* J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1113-22.
207. Gougeon, M.L. and M. Piacentini, *New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis.* Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 501-8.
208. Doitsh, G., et al., *Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue.* Cell. **143**(5): p. 789-801.
209. LaBonte, J.A., et al., *Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells.* J Virol, 2000. **74**(22): p. 10690-8.
210. Vieillard, V., et al., *Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers.* J Acquir Immune Defic Syndr. **53**(5): p. 564-73.
211. Paiardini, M., et al., *Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses.* Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 485-95.
212. Basmaciogullari, S., et al., *Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding.* J Virol, 2002. **76**(21): p. 10791-800.
213. Fatkenheuer, G., et al., *Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1.* Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1170-2.
214. Walker, D.K., et al., *Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV.* Drug Metab Dispos, 2005. **33**(4): p. 587-95.
215. *FDA approves maraviroc tablets.* AIDS Patient Care STDS, 2007. **21**(9): p. 702.
216. *Maraviroc approved in the European Union.* AIDS Patient Care STDS, 2007. **21**(10): p. 779.
217. Helseth, E., et al., *Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants.* J Virol, 1990. **64**(5): p. 2416-20.
218. Byland, R., et al., *A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 414-25.
219. Kubo, Y., et al., *Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) proteins function as pleiotropic regulators of human immunodeficiency virus type 1 infection.* Virology, 2008. **375**(1): p. 130-40.

220. Matarrese, P. and W. Malorni, *Human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: partners in viral life and host cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 1**: p. 932-41.
221. Espert, L., P. Codogno, and M. Biard-Piechaczyk, *Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(8): p. 811-23.
222. Molina, L., et al., *Proteomic analysis of the cellular responses induced in uninfected immune cells by cell-expressed X4 HIV-1 envelope*. Proteomics, 2007. **7**(17): p. 3116-30.
223. Chen, Y., et al., *Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 23): p. 4155-66.
224. Liu, Z. and M.J. Lenardo, *Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 484-5.
225. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
226. Scarlatti, F., et al., *Does autophagy have a license to kill mammalian cells?* Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 12-20.
227. Lassen, K.G., et al., *Elite suppressor-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000377.
228. Cunyat, F., et al., *The HR2 polymorphism N140I in the HIV-1 gp41 combined with the HR1 V38A mutation is associated with a less cytopathic phenotype*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 15.
229. Pilgrim, A.K., et al., *Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection*. J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 924-32.
230. Cecilia, D., et al., *A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects*. J Infect Dis, 1999. **179**(6): p. 1365-74.
231. Doria-Rose, N.A., et al., *Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables*. J Virol. **84**(3): p. 1631-6.
232. Euler, Z., et al., *Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression*. J Infect Dis. **201**(7): p. 1045-53.
233. Pietzsch, J., et al., *Anti-gp41 antibodies cloned from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity*. J Virol. **84**(10): p. 5032-42.





# AGRAÏMENTS





Han estat cinc anys intensos, amb els seus alts i baixos, però la veritat és que finalment tinc la sensació de que el temps ha passat volant. Arribats fins aquí ja només em queda agrair a tots els que d'alguna manera o altra heu contribuït a fer el camí molt més fàcil.

En primer lloc vull mencionar especialment al **Julia**, el meu director de tesi. Per donar-me la oportunitat de formar part dels teus projectes i estar avui escrivint aquestes línies, per la paciència, per tot el que m'has ensenyat, pel teu gran entusiasme (científic) que s'encomana i, sobretot, per no deixar-me rendir. Moltes gràcies.

I en paral·lel a la **Ceci**, la meva directora de tesi. Pels bons consells, per la comprensió i l'afecte, per ser un bon model de dona treballadora (a vegades exagerat...;) i per fer-me participar en un projecte intens que ens ha fet travessar "el charco" més d'una vegada i que, tot i que al final ha tingut un final inesperat, ha estat una gran aventura on he après moltíssim. Moltes gràcies.

També vull agrair a tots els altres membres del *grup VIC*, on m'he sentit realment com a casa i no pas pel fet de ser de la comarca d'Osona. A la **Isa**, per totes les converses de ciència i de vida (i d'hipocondria maniàtica), per la companyia, per una bona amistat i perquè possiblement sense el teu bon criteri de ja fa més de cinc anys tot això ni tan sols hauria començat. A la **Silvia**, per la confiança, per saber escoltar, per lluitar contra la meua hipocondria, per ser una bona companya i haver-te convertit en una gran amiga durant aquests últims anys, per la teua valentia, moltes gràcies!

A la **Eli** per tot el que hem compartit ( a part de l'ordinador, la taula, la poiatà...) i per tot el que m'has ensenyat, he après moltes coses amb tu, des de tècniques de laboratori fins a com tenir una taula meticulosament ordenada (tot i que això últim em costa posar-ho en pràctica). Pel *corasoncito* que tens amagat, moltes gràcies.

A la **Marta (Massanella)**, per l'entusiasme, per estar disposada sempre a tot (i més!), pels consells tècnics, per les classes magistrals de citometria i sobretot d'Il·lustrador, perquè sense el teu criteri els nostres gràfics i figures no serien el mateix, gràcies!

Al **Francesc**, per haver patit amb mi tardes i tardes de fusió cel·lular, pels seus excels minuciosament detallats, pels clonatges compartits (amb tots els seus problemes), gràcies!

Al **Jorge**, l'home enciclopèdia, per deixar-nos consultar tots els dubtes immunològics i per tenir sempre una resposta a punt (tot i que a vegades això impliqués el doble de feina...;p). Pels gomets i les etiquetes de les alíquotes d'anticossos en tubs de 0,2 ul, i sobretot pel bon humor que sempre ajuda a passar els dies llargs. Moltes gràcies.

I finalment a les noves incorporacions, la **Lucía**, l'**Eli** i el **Dan**, que ara comencen i els puc assegurar que han anat a parar a un grup de recerca fantàstic que fa més fàcil el camí. Benvinguts i molta sort!

També per proximitat (física, entre d'altres....) als **GRECS**. A la **Maria José** pels bons consells científics, per totes les escapades a fer un piti que es convertien sovint en teràpia de grup i per ser una gran amfitriona Bostoniana, a la **Judith** per la paciència i tot el suport que en molts moments ha estat clau, a la **MariCarmen**, primer premi de l'ordre impol-lut, per la seva disponibilitat, pels seus consells i per tenir-ho sempre tot a punt!; a la **MariaTeresa**, la reina de la wikipedia i del frikisme més fi, per deixar-nos amb la boca oberta amb les seves troballes a la xarxa internàutica i per ajudar-me a no passar mai per alt les avaluacions de l'UAB; a la **Nuria** pels consells i per facilitar-me l'arribada a Irsi durant l'últim any i mig i a la **Itziar** (Visca el Delicatessen!) i a la **Maria**, la reina de la wikipedal, la resta d'integrants indispensables d'aquest minibús Irsi-Monumental, perquè arribar a Irsi sempre és una aventura (en aquest cas amb pany forçat i denúncia als mossos inclosa). Al **Gerard**, pel bon humor, pel "bon rotllo" i per haver-me fet un regal increïble, a la **Júlia**, per la calma i per ajudar-te a tenir els peus a terra, i finalment al **Javier** per prendre'm el pols i confiar plenament en la meua capacitat d'oratoría tant en castellà com en anglès.... Moltes gràcies!

A les més MOLones, a la **Sandra** pels viatges amunt i avall i pels bons consells, a la **Maria** per les reunions de la RIS (i pel viatge a Sevilla, per l'Escorial i per compartir amb mi el patiment al festival de Sitges), a la **Gloria**, per mantenir-nos al dia de les noves tendències de moda actual i per tenir una energia que fa tremolar. Gràcies!

Finalment, i amb menció especial, a la **Mariona**, l'**Ester** i l'**Elena** amb qui (a part dels dies de feina) també hi he compartit partits de futbol, algun que altre sopar, concert, excursió a la Garriga, alguna llagrimeta i sobretot molts somriures! A la **Mariona**, coratge i valor, pels viatges a la Garriga, per la força i perquè, encara que no ho sembli, tenir una gran família essent una dona

treballadora és possible! A l'**Ester**, perquè arribar a l'rsi al matí i trobar-se amb el teu somriure d'orella a orella no té preu...m'encantaria tenir ni que fos un 10% de la teva vitalitat, energia i sobretot alegria! Per portar-me a les OhDiosas i fer un bon exercici de desconexió mental durant i després del partit! I finalment, moooolt especialment a l'**Elena**, la companya, la veïna, l'amiga...per haver estat sempre al meu costat i haver-me ajudat a passar per moltes coses, tan a la feina com a casa! Pels vermuts a la platja, les cervesetes al "castell", les teves paelles d'arròs amb "batxoqueta i garrofó", la teva paciència, els teus bons consells, les ganes de menjar-te el món (encara que de vegades no les trobis, les tens!), per tot i més... Moltes gràcies!

Als Bio MOLons III, a l'**Ester**, el **Marc**, i l'**Alba** per "patir" els Westerns amb mi i fer-los més amens i interessants, a l'**Emmanuel**, per voler aprendre català i sortir-se'n molt bé, a l'**Encarna** per tenir valor i al **Jordi Senserich** perquè com ja vam dir "Senserich no hi ha joke" i és que l'rsi no hagués estat el mateix sense el *Western Boy* amenitzant totes les vetllades. I a l'**Eva** i el **Roger** amb els quals no he coincidit massa, però tot i això sí que hem compartit algunes converses interessants a la biblio de P3 a l'hora del cafè.

Als **Epidemiòlegs Moleculares** (em sembla que ara us dieu així, que amb tan canvi de personalitat em teniu marejada), al **Roger**, pel suport mèdic, a la **Maria** perquè ja era hora que arribés algú que fos més del nord i sapigués parlar com cal...que a la capital de vegades no m'entenen!, a la **Rocío** pels seus comentaris sorprenents, al **Mattia** per una altra visió del món que no sempre s'entenia..., a la **Cristina** per donar-nos una lliçó de voluntat, al **Marc** pels ninotets llança missils i la seva visió de 0 i 1, a la **Susanna**, per saber el que és realment significatiu i, sobretot, al **Christian**, per haver estat una espatlla on recolzar-se quan l'Analia ens feia veure dramons a les classes d'anglès, per saber-te arrencar sempre un somriure, per haver compartit tots aquests anys des del principi. Gràcies!

A les floretes, la **Ruth** i l'**Ester**, al **Ferdinand** i la **Margarita**, un grup heterogeni i molt divertit, a la **Ruth**, per les converses durant les anades i vingudes d'l'rsi, a l'**Esther** per l'alegria i l'entusiasme, per les reunions de la RIS, per "Casa Anselma" i ... OLÉ!, al **Ferdinand** per descobrir-nos la vida al

Camerun i a la **Margarita** per l'experiència i els consells d'immunologia, i per les situacions més rocambolesques. Gràcies.

Als "Branders", al **Pep** per acostar-nos sempre a la visió mèdica, pràctica i al punt de vista del pacient ajudant-nos així a ser més realistes i comprensius (ah! I per aquelles fantàstiques sobrassades amb denominació d'origen); i també a l'**Anuska**, la **Jenni**, la **Bea** i la **Vanessa** per compartir la cabina i les tan preuades llicències de Flow-Jo i Diva; a la **Al** per les classes japoneses (incloent bones recomanacions de restaurants); a l'**Àlex** i la **Marta**, pel bon humor, i, finalment al **Javi** *por la fuerza del anillo!* Gràcies!

A l'indispensable equip de mostres, a la **Rafi** pels seus ficols perfectes (encara que les mostres arribessin a l'hora de dinar...); a la **Tània** per haver-nos vingut a visitar des d'un altre planeta (com a mínim) perquè cada història és millor que l'anterior, per arrencar somriures i per la RIS (on res no hauria estat igual sense tu!); a l'**Eulàlia**, per tenir la paciència d'organitzar un màster *estupendu!*; i a la **Lídia** pels seus remeis alternatius. També a les reines de la seqüenciació, a la **Teresa** perquè compartir un dinar amb ella és com llegir-se tres diaris, consultar l'enciclopèdia i navegar hores per internet, i a la **Crisitna** perquè res és el que sembla, allò més surrealista de vegades passa! A la **Samandhy**, per les seves receptes exòtiques i per proporcionar-nos tota classe de drogues (classificades). Gràcies!

A la **Rosina** i a l'**Elisenda** per deixar-me participar en projectes de divulgació i comunicació, que em van fer patir una mica però al final també vaig disfrutar-ho molt. Gràcies!

Al **Julián**, per aguantar contra viento y marea totes les nostres crítiques al sistema informàtic (i trobar bones solucions) i al **Bonaventura**, a la **Lourdes**, a la **Cristina** i a la **Penélope** per dirigir, gestionar i administrar (respectivament) tot aquest "tinglado"! Gràcies.

I, finalment, a tots els investigadors d'altres institucions que han col·laborat en aquest projecte, al **Vincent** i a l'**Hugues** per rebre'm a París i per tota la feina feta, a la **Martine** per l'autofàgia, a la **María** i el **Cecilio**, per tota la col·laboració i el suport i per ajudar a entendre l'evolució de seqüència i al **Manel** i al **Jordi** per les últimes aportacions. Gràcies!

Per altra banda, vull agrair a la família i als amics la seva contribució i, sobretot, el seu suport i la seva paciència.

A la **Bea**, la **Susanna**, l'**Anna**, la **Laia**, la **Núria** i l'**Alba**, les biòlogues de la Pompeu, per les hores i hores de facultat, d'estudi, de feina, de festa, de viatge... en resum, per 5 anys indispensables d'alegries i penes i perquè sense la vostra ajuda en moments clau potser no seria ni biòloga a hores d'ara! Gràcies!

A la **Ju**, la **Maria**, l'**Eva**, la **Bruna**, l'**Ari**, la **Mònica**, la **Carme**, els respectius i els descendents, perquè amb alguns ja fa més de mitja vida que ens coneixem ( i amb els altres poc en falta), per tot el que hem viscut mentre ens anàvem fent grans i per continuar junts malgrat la distància, les complicacions, els compromisos, les responsabilitats... Per ajudar a desconnectar de la feina (tot i que la majoria ens hem dedicat a la branca científica)! Gràcies!

Al **meu pare** i a la **meva mare**, per saber quan cal donar un copet a l'esquena o estirar les d'orelles, per estar al peu del canó, per fer-me costat, per la paciència, la constància i l'esforç. Moltes gràcies!

Als **meus germans**, **Oleguer i Marçal**, perquè a casa un mai s'avorreix, per ser els petits i tenir les coses més clares que jo, perquè al final la diferent manera de veure la vida de cadascú ens enriqueix a tots. Moltes gràcies!

I finalment, a en **Jordi**, per ser sempre al meu costat, per fer-me riure, per ser més valent que jo, per l'inesgotable paciència, per una vida nova, pels somnis. Moltes gràcies!

**MOLTES GRÀCIES A TOTS!!!**